



Universidade
Federal
de Pernambuco

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação –
PROPESQ
Centro de Ciências da Saúde

TEREZINHA TENÓRIO DA SILVA

**FATORES DE RISCO PARA NEOPLASIA
INTRA-EPITELIAL CERVICAL EM PACIENTES
SUBMETIDAS À AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E
PESQUISA DE DNA-HPV**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de
Pernambuco para obtenção do título de
Doutor em Medicina Tropical

**RECIFE
2004**



Universidade
Federal
de Pernambuco

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação –
PROPESQ
Centro de Ciências da Saúde

TEREZINHA TENÓRIO DA SILVA

**FATORES DE RISCO PARA NEOPLASIA
INTRA-EPITELIAL CERVICAL EM PACIENTES
SUBMETIDAS À AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E
PESQUISA DE DNA-HPV**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de
Pernambuco para obtenção do Título de
Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Doenças
Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Márcio Lobo Jardim

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

**RECIFE
2004**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Celso Pinto de Melo

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Tadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Prof^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

CORPO DOCENTE

Prof^ª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof^ª. Elizabeth Malagueño de Santana

Prof^ª. Gerusa Dreyer Vieira

Prof^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof. Joaquim Alves Norões

Prof^ª. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^ª. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^ª. Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen

Prof^ª. Vera Magalhães da Silveira



RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA DOUTORANDA
TEREZINHA TENÓRIO DA SILVA

No dia 29 de outubro de 2004, às 08h30, na Sala Prof. Murilo LaGreca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – C.C.S./UFPE, os Professores: **Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho (Depto. de Fisiologia e Farmacologia – Membro Interno)**, **Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (Depto. de Medicina Clínica – Membro Interno)**, **Prof^ª. Dr^ª. Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen (Depto. de Medicina Tropical – Membro Interno)**, **Prof. Dr. Petrus Augusto Dornelas Câmara (Depto. Materno Infantil – Membro Externo)** e **Prof^ª. Dr^ª. Emília Pessoa Perez (Depto. Materno Infantil – Membro Externo)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **TEREZINHA TENÓRIO DA SILVA** sobre a sua Tese intitulada **"Fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical em pacientes submetidas à avaliação morfológica e pesquisa de DNA-HPV"**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen

Aprovada

Prof. Dr. Petrus Augusto Dornelas Câmara

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. Emília Pessoa Perez

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^ª. Dr^ª. Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen

Prof. Dr. Petrus Augusto Dornelas Câmara

Prof^ª. Dr^ª. Emília Pessoa Perez

EPÍGRAFE

Você tem uma amiga que nunca se submeteu a uma colpocitologia oncótica ou o fez há mais de três anos.

Encaminhe-a a um serviço de prevenção de câncer ginecológico. Assim você estará contribuindo para melhor qualidade de vida de sua amiga.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Davino e Maria,
Pelo amor que nos uniu
Pelo exemplo de vida que me deixaram
E pelos esforços que dedicaram a minha formação
humana e profissional.

AGRADECIMENTOS

Nas minhas inúmeras idas e vindas entre Recife e Maceió, costumava contemplar a paisagem através da janela do ônibus. Durante aproximadamente quatro horas, minha mente divagava, enquanto visualizava a imensa plantação de cana-de-açúcar. Mesmo assim, eram horas amargas, durante as quais, com meu jeito irrequieto de ser, era obrigada a esperar sentada, que chegasse o momento de entregar o material biológico para a pesquisa do *Papilomavirus* humano e, imediatamente, retornar e continuar o estudo. Por duas ocasiões, o tempo de viagem foi prolongado por mais duas ou três horas, durante as quais, esperou-se o desbloqueio da rodovia, palco de manifestações de protesto de alguns participantes do movimento dos sem terra.

Vendo agora o trabalho pronto, concluo que o esforço não foi só meu. Reconheço que o mérito deste final satisfatório, deve-se à ação conjunta de pessoas de boa vontade, pacientes, persistentes, que de forma direta, indireta e por vezes discreta, me indicaram o rumo certo.

Tornam-se, portanto, indispensáveis os agradecimentos. O verdadeiro significado do agradecimento jamais será completamente expresso com palavras, por mais reconhecida e erudita que seja a pessoa beneficiada. Um trabalho como este, não se faz sozinha ou com a ajuda de tão poucas pessoas, que o limitado espaço a este registro me permite nomear.

Por isso, em primeiro lugar, agradeço a Deus, de quem recebi forças para enfrentar e vencer os obstáculos encontrados em todas as etapas desta tese.

Registro agradecimento especial aos meus orientadores:

Prof. Márcio Lobo, detentor de inquestionável espírito universitário, pelo estímulo inicial que proporcionou à elaboração do projeto de pesquisa e à firme decisão de concorrer a uma vaga no Doutorado.

Ao Prof. Ricardo Ximenes, também Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Mestrado e Doutorado em Medicina Tropical da UFPE, que participou diretamente de todas as fases do curso de Pós-Graduação, ensinando, passo a passo, os caminhos que levam à verdade científica.

Às pacientes, participantes voluntárias desta pesquisa, meu respeito e gratidão, com a certeza de que o aprendizado adquirido será utilizado na melhor assistência e ensino.

Mesmo na rotina do seu dia-a-dia, aos profissionais que integram os setores de colposcopia, colpocitologia oncótica e histopatologia do Hospital das Clínicas da UFPE - os médicos Mariléa Guimarães, Fátima Pinheiro, Isabel Castro, Angelina Maia, Jefferson Valença, Deyse Lima e Telma Campelo, que contribuíram, de modo indispensável, para a realização desta pesquisa.

À equipe que integra o Serviço de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, chefiada pelo Prof Eduardo Ramalho, cujo trabalho foi fundamental na identificação de *Papilomavirus*.

À equipe que integra LGV Assessoria em Pesquisa Médica, chefiada pela Dra Laís Vieira, pela análise estatística, que permitiu as conclusões desta tese e também pelo trabalho de digitação, formatação e encadernação.

RESUMO

Apesar da possibilidade do diagnóstico das lesões precursoras – neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) – o câncer cervical invasivo ainda representa problema de saúde pública. Na última década, a maior descoberta sobre a etiologia da carcinogênese humana foi o reconhecimento de que o carcinoma cervical é uma rara consequência da infecção persistente por tipos oncogênicos de *Papillomavirus* humano (HPV). O desconhecimento da magnitude da associação entre HPV e NIC, numa região com elevada incidência da expressão clínica da infecção, motivou esta pesquisa. Com o objetivo principal de identificar os fatores de risco para NIC, realizou-se estudo tipo caso-controle, no qual foram incluídas 132 portadoras de NIC (casos) e 96 pacientes com colo normal (controles), atendidas no Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, no período de novembro de 2001 a agosto de 2002. O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição onde foi realizado. Os possíveis fatores de risco para NIC foram investigados por meio de formulário padronizado, aplicado a todas as pacientes, para pesquisa de idade, estado civil, grau de instrução, idade ao primeiro coito, número de gestações, número de parceiros sexuais, método contraceptivo utilizado, referência de DST anterior, soropositividade para HIV e tabagismo. Seguiram-se coletas de material para colpocitologia oncótica e para pesquisa de HPV por PCR-RFLP com *primers consensus* MY09/MY11, exame colposcópico e biópsia com exame histopatológico, nos casos indicados. Para análise estatística de associação de NIC com os fatores de risco, utilizaram-se o Odds Ratio com intervalo de confiança e os testes qui quadrado e Fisher, ao nível de significância de 0,05. Para ajuste do efeito de cada uma das variáveis pelas demais, empregou-se a regressão logística pelo modelo *backwards*, testado com significância expressa pelo valor de p com grau de máxima verossimilhança. Para análise de concordância, aplicou-se o teste Kappa. No modelo final de regressão múltipla, permaneceram as seguintes variáveis: a infecção por HPV de alto risco oncogênico (OR=12,32 IC95% 3,79-40,08), referência de DST anterior (OR=8,23 IC95% 2,82-24,04), idade ao primeiro coito (OR=4,00 IC95% 1,70-9,39) e tabagismo (OR=3,94 IC95% 1,73-8,98). A soropositividade para HIV comportou-se como fator de proteção para NIC (OR=0,04 IC95% 0,01-0,13). Dentre as 78 amostras com positividade para HPV por PCR-RFLP, houve predomínio de HPV16 ou variante 16 (46,9% do grupo caso), com maior frequência nas pacientes portadoras de lesões de alto grau. A análise dos aspectos morfológicos no diagnóstico da infecção cervical por HPV demonstrou que a colposcopia apresentou boa concordância com o exame histopatológico, em presença de positividade de DNA-HPV. Dentre os achados colposcópicos mais relevantes para o diagnóstico de lesões cervicais de alto grau e positividade de HPV, destacaram-se o epitélio acetobranco acentuado e mosaico áspero. Considerando os fatores de risco identificados no presente trabalho, concluiu-se que deve haver programas de rastreamento dos grupos com maior probabilidade de desenvolver NIC, por colpocitologia, colposcopia e histopatologia, associadas, quando possível, à biologia molecular, prevenindo o surgimento do câncer invasor.

Descritores: 1. Neoplasia intra-epitelial cervical 2. Citodiagnóstico cervical 3. Fatores de risco 4. Infecção por *Papillomavirus* humano

ABSTRACT

Invader cervical cancer still remains a public health problem, despite the diagnosis possibility of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) which are precursor lesions. In the last decade, the major discovery of human carcinogenesis etiology has been the identification that cervical carcinoma is a rare consequence of persistent infection with oncogenic types of human *Papillomavirus* (HPV). This research was motivated by the unknown magnitude of the association between HPV and CIN, at a region with high incidence of clinical expression of this infection. The main objective was to identify risk factors for CIN. The study design consisted of a case control study with a sample of 132 out-patients with CIN (cases) and 96 out-patients with normal cervix (controls). These patients were attended at the Colposcopy Unit of Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco - Brazil from November 2001 to August 2002. The study was approved by the University Ethics Committee on Human Research. Possible risk factors for CIN were investigated with a standard questionnaire applied to all patients, searching for age, marriage status, schooling, age at the first intercourse, number of pregnancies, number of sexual partners, contraceptive method use, reference of previous STD, HIV serum positivity and smoking. Samples collection was performed for oncotoc colpocitology, HPV research by PCR-RFLP using consensus primers MY09/MY11; colposcopy and biopsy with histopathologic exam, when necessary. For statistical analysis of CIN and risk factors association, Odds Ratio with confidence intervals, and Qui square and Fisher tests were applied, at significance level equal to 0.05. For effect adjustment of each variable within others, logistic regression by backwards method was applied, testing significance expressed by maximum verisimilitude p value. For concordance analysis, Kappa test was used. At the final multiple regression model, the following variables remained: high oncogenic risk HPV infection (OR=12,32 IC95% 3,79-40,08), reference to previous STD (OR=8,23 IC95% 2,82-24,04), age at first intercourse (OR=4,00 IC95% 1,70-9,39) and tabagism (OR=3,94 IC95% 1,73-8,98). HIV serum positivity acted as protection factor to CIN (OR=0,04 IC95% 0,01-0,13). Among 78 samples with HPV positivity by PCR-RFLP, HPV16 and variant 16 predominated (45.9% of cases) specially among patients with high grade lesions. The analysis of morphologic aspects of HPV infection diagnosis permitted the identification of a good concordance of colposcopy and histological exam with DNA-HPV positivity. Among relevant colposcopic findings for the diagnosis of high grade lesions associated to HPV positivity, the most important were acetowhite epithelium and sharp mosaic. Considering the risk factors identified at this research, the author concludes that one must create screening programs for those groups with major probability to develop CIN, by colpocitology, colposcopy and histopathology, associated to molecular biology, when possible, to prevent the development of invader cancer.

Key-words: 1. Cervical intraepithelial neoplasia 2. Cervical citodiagnosis 3. Risk factors 4. Human *Papillomavirus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência de câncer cervical em locais selecionados no mundo (Adaptado com permissão da Organização Mundial de Saúde – publicações IARC, 1995).....	19
Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HPV16	25
Figura 3 – Esquema da fase de isolamento do DNA genômico.....	49
Figura 4 – Esquema da fase de visualização do DNA genômico	50
Figura 5 - Esquema da fase de amplificação parcial do gene L1 viral	51
Figura 6 – Esquema da fase de análise genômica e construção dos mapas físicos do gene L1	53
Figura 7 – Análise por polimorfismo de fragmentos de restrição RFLP, visualizados em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR na região L1 do <i>Papilomavirus</i> humano.....	54
Figura 8 – Esquema de seqüenciamento automático do segmento de DNA da região L1 de HPV	55
Figura 9 – Distribuição de 49 pacientes HIV soropositivas, segundo flora vaginal.....	72
Figura 10 – Distribuição de procedência dos casos e dos controles em relação à tipagem do HPV	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Associação entre NIC e características biossociais em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	63
Tabela 2 – Associação entre NIC e características reprodutivas em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	64
Tabela 3 – Distribuição de 132 casos e 96 controles conforme tempo de tabagismo e consumo diário de cigarros – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002.....	65
Tabela 4 – Associação entre NIC e o risco oncogênico do HPV, determinado por PCR, em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	65
Tabela 5 – Associação entre risco oncogênico de HPV e características biossociais em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002.....	66
Tabela 6 – Associação entre risco oncogênico e características reprodutivas em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	67
Tabela 7 – Risco oncogênico de HPV e tabagismo em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	68
Tabela 8 –Odds Ratios ajustados e intervalos de confiança da associação entre NIC e demais variáveis: risco oncogênico, referência de DST anterior, idade ao primeiro coito, tabagismo e soropositividade HIV, em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	69
Tabela 9 – Distribuição das 78 amostras segundo tipo de HPV identificado por PCR/RFLP por grupos de pesquisa– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002.....	70
Tabela 10 – Distribuição dos 64 pacientes positivas para HPV segundo NIC– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	71
Tabela 11 – Distribuição das 16 amostras de pacientes HIV soropositivas, segundo tipo de HPV e grupo– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	71

Tabela 12 – Distribuição de 228 pacientes segundo flora vaginal e grupo de estudo – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	72
Tabela 13 – Distribuição das 132 pacientes do grupo caso quanto à gravidade dos achados colposcópicos e à intensidade da NIC – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002.....	73
Tabela 14 – Resultados de colpocitologia e histopatologia em pacientes com DNA-HPV tipificado conforme graduação de NIC– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002.....	73
Tabela 15 – Resultados dos aspectos citopáticos compatíveis com presença de HPV identificados por colpocitologia e histopatologia, nos grupos com positividade para DNA-HPV– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	74
Tabela 16 – Dados de validade diagnóstica da colpocitologia comparada à histopatologia cervical, para diagnóstico de infecção por HPV– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	74
Tabela 17 – Resultados dos aspectos citopáticos compatíveis com presença de HPV por colpocitologia e histopatologia, em 132 pacientes do grupo caso – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	74
Tabela 18 – Dados de validade diagnóstica da colpocitologia comparada à histopatologia cervical, para diagnóstico de infecção por HPV– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	75
Tabela 19 – Distribuição de 132 portadoras de NIC segundo faixa etária, estado civil, grau de instrução, idade ao primeiro coito, número de gestações, número de parceiros sexuais, método contraceptivo utilizado, referência de DST anterior, tabagismo e soropositividade HIV segundo pesquisa de HPV – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μL \Rightarrow microlitro
AIDS \Rightarrow *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome de imunodeficiência Adquirida)
APS \Rightarrow persulfato de amônia
DNA \Rightarrow ácido desoxirribonucléico
DST \Rightarrow doenças sexualmente transmissíveis
EP \Rightarrow erro padrão
FDA \Rightarrow *Food and Drug Administration* (Administração de Drogas e Alimentos)
GFX \Rightarrow Gama Cephalexin
HCL \Rightarrow ácido clorídrico
HC-UFPE \Rightarrow Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HIV \Rightarrow vírus da imunodeficiência humana
HLA \Rightarrow antígeno leucocitário humano
HPV \Rightarrow *Papillomavirus* humano
HSV \Rightarrow *Herpes simplex* vírus
IARC \Rightarrow *International American Research in Cancer* (Pesquisa Americana Internacional sobre Câncer)
IST \Rightarrow infecções sexualmente transmissíveis
JEC \Rightarrow junção escamo-colunar
Kb \Rightarrow kilobite
LCR \Rightarrow líquido cefalorraquiano
mg/mL \Rightarrow miligrama por mililitro
MHC \Rightarrow Complexo Maior de Histocompatibilidade
mL \Rightarrow mililitro
 mm^3 \Rightarrow milímetro cúbico
NIC \Rightarrow neoplasia intra-epitelial cervical
OC \Rightarrow orifício cervical
OMS \Rightarrow Organização Mundial de Saúde
OR \Rightarrow Odds Ratio
ORF \Rightarrow *open reading frames*
pb \Rightarrow pares de bases
PCR \Rightarrow *Polymerase Chain-reaction* (Reação de Cadeia de Polimerase)
pH \Rightarrow potencial hidrogênio iônico
RFLP \Rightarrow *Restriction Fragment Length Polymorphism*
rpm \Rightarrow rotações por minuto
 TBE^{-1x} \Rightarrow tampão tris-ácido bórico – ácido etileno diaminotetracético
TE \Rightarrow tampão tris-ácido clorídrico – ácido etileno diaminotetracético
TEMED \Rightarrow tetrametiletilenodiamina
V/cm \Rightarrow Volt por centímetro
VAR \Rightarrow variante
ZT \Rightarrow zona de transformação

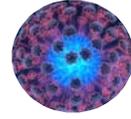
SUMÁRIO

EPÍGRAFE	V
DEDICATÓRIA	VI
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Neoplasia intra-epitelial cervical.....	20
1.2 Fatores de risco para neoplasias intra-epiteliais cervicais.....	24
1.2.1 <i>Papilomavirus</i> humano	24
1.2.2 Uso de contraceptivos hormonais	29
1.2.3 Tabagismo.....	30
1.2.4 Idade.....	32
1.2.5 Número de gestações	32
1.2.6 Número de parceiros sexuais	33
1.2.7 Infecções sexualmente transmissíveis.....	34
1.2.8 Déficit imunológico, alimentar e fatores genéticos.....	35
1.3 Justificativa.....	36
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Geral.....	39
2.2 Específicos.....	39
2.3 Secundários.....	39
3 PACIENTES E MÉTODOS	40
3.1 Desenho do estudo.....	41
3.2 Local do estudo.....	41
3.3 População do estudo.....	42
3.4 Tamanho da amostra	42
3.5 Definição das variáveis e coleta de dados.....	43
3.5.1 Definição dos grupos	43
3.5.2 Variável dependente - neoplasia intra-epitelial cervical (NIC).....	43
3.5.3 Variáveis independentes	44
3.5.4 Variáveis de controle	44
3.6 Métodos.....	46
3.6.1 Coleta de dados	46
3.6.2 Coleta do material cervical e padronização das técnicas.....	47
3.6.2.1 Colpocitologia oncótica.....	48

3.6.2.2	Pesquisa de HPV por PCR	48
3.6.3	Amplificação parcial do gene L1 viral por <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR) em Termociclador <i>Master Cycler Eppendorf</i> [®]	50
3.6.3.1	Colposcopia	57
3.6.3.2	Histopatologia	58
3.7	Análise estatística	58
3.8	Aspectos éticos	60
4	RESULTADOS	61
4.1	Caracterização da análise de associação entre NIC e potenciais fatores de risco	62
4.2	Análise de associação entre infecção pelo HPV e demais variáveis independentes	66
4.3	Análise multivariada	68
4.4	Caracterização dos resultados de biologia molecular, colpocitologia, colposcopia e histopatologia	69
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	103
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
8	APÊNDICES	120
8.1	APÊNDICE 1 – Aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco	121
8.2	APÊNDICE 2 – Formulário pré-codificado	122
9	ANEXOS	124
9.1	ANEXO 1 - Classificação da Nomenclatura Internacional dos Aspectos Colposcópicos de Roma	125
9.2	ANEXO 2 – Formulário de descrição dos achados citológicos segundo os critérios baseados no Sistema Bethesda	126
9.3	ANEXO 3 – Reagentes utilizados na técnica de amplificação e tipagem de DNA-HPV	127

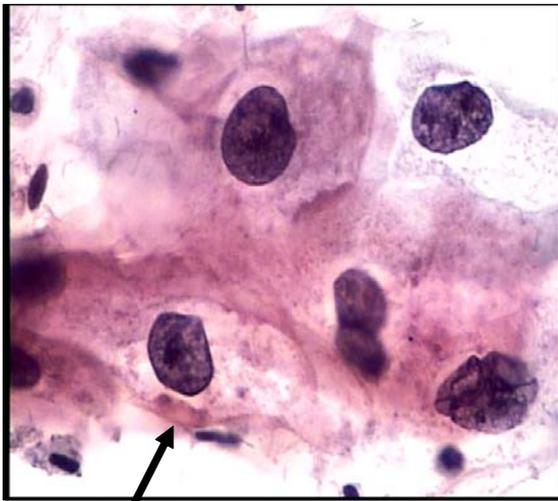
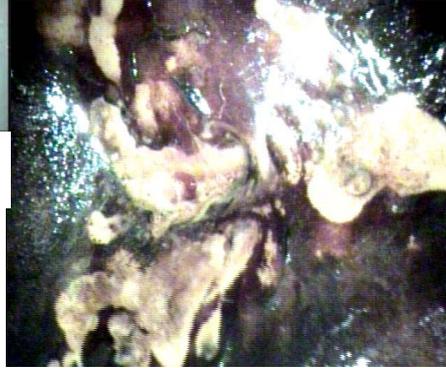


Colposcopia - Zona de transformação com raros orifícios glandulares. Área de epitélio acetobranco tênue, margens irregulares em lábio anterior, dentro da zona de transformação. JEC não visível



Microfotografia do HPV

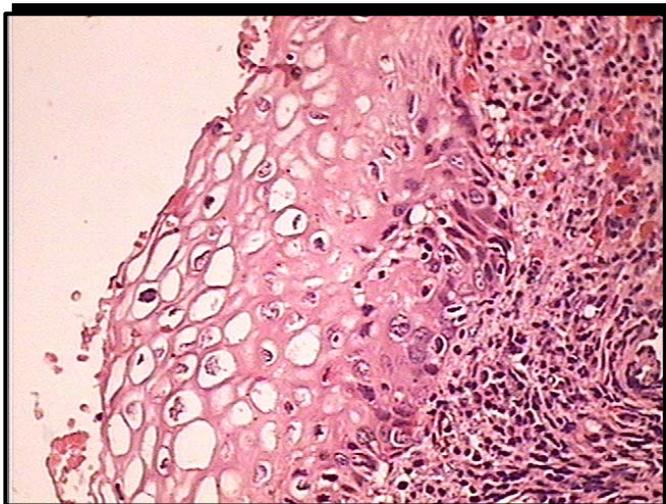
Teste de Schiller



Colpocitologia – 400X – células escamosas, maduras, revelando alterações nucleares, aumento de volume, hiperchromasia, irregularidade de borda, cromatina granular. Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (NIC 1) associada ao efeito citopático pelo HPV

Célula coilocitótica

Histopatologia – HE 400X – Presença de atipia metaplásica na camada profunda e coilocitos na camada superficial NIC 1 - HPV



1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias malignas do aparelho genital feminino, as que acometem o colo do útero revestem-se de maior importância, seja pela frequência elevada, pela morbi-letalidade ou, ainda, pela existência de fatores de risco e de lesões precursoras. A cada ano, cerca de 500 mil novos casos de câncer cervical uterino são diagnosticados no mundo, o que representa aproximadamente 10% de todos os cânceres em mulheres. Em frequência, no sexo feminino, ele surge como o segundo local de câncer, suplantado apenas pelos tumores de mama (BOSCH et al., 1995).

A incidência do carcinoma cervical varia nas diferentes populações, refletindo a importância da exposição aos fatores de risco e a qualidade dos programas de rastreamento. No Brasil, estima-se que, a cada ano, surjam 20 mil novos casos e que, por serem diagnosticados em fases avançadas, levem à morte cerca de seis mil pacientes em igual período.

Na Figura 1, encontra-se demonstrada a incidência dos casos de câncer do colo do útero, diagnosticados em diferentes regiões do mundo (IARC, 1995; FRANCO et al., 2001; LORENZATO, 2001).

Nos últimos vinte anos, tem-se testemunhado o substancial progresso no conhecimento da história natural do câncer do colo do útero e dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento desta afecção, que, apesar de tudo, ainda representa um problema de saúde pública.

Os fatores de risco, para o surgimento do câncer cervical uterino e de suas lesões precursoras, têm sido epidemiologicamente determinados nas últimas três décadas. Dentre eles, a infecção cervical por tipos oncogênicos do *Papilomavirus* humano (HPV) tem sido estabelecida dentro dos critérios de causalidade. Certos tipos de HPV são admitidos como fator causal necessário, porém não suficiente, para a etiologia da lesão neoplásica. Em outras palavras, à luz dos conhecimentos atuais, o desenvolvimento do câncer cervical é menos provável na ausência da infecção pelo HPV e de fatores coexistentes, que favorecem a persistência da infecção, entre os quais: tabagismo, uso de contraceptivos orais, antecedente de

DST anterior, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, início precoce das relações sexuais e déficit nutricional e imunológico, além de fatores genéticos.

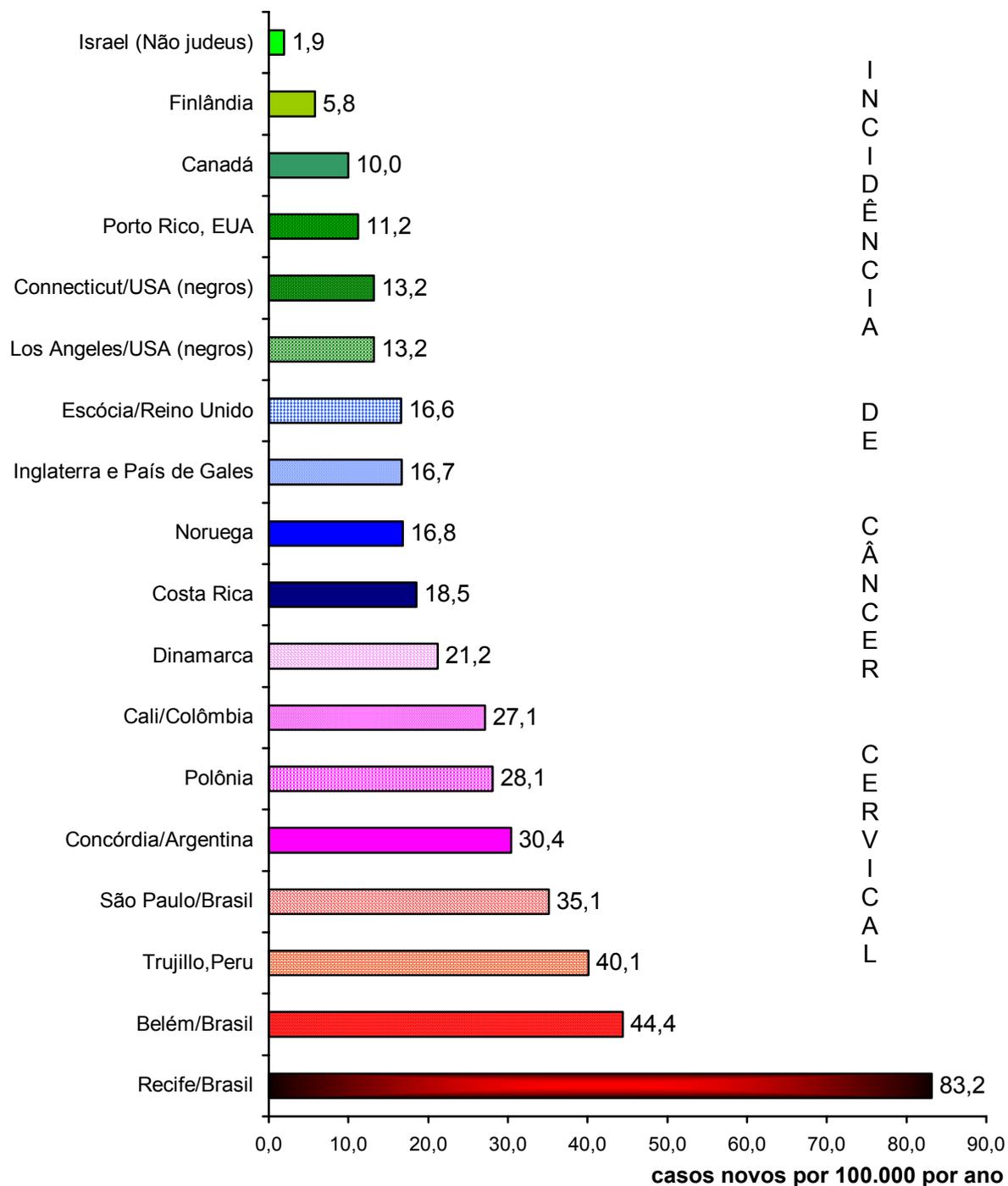


Figura 1 – Incidência de câncer cervical em locais selecionados no mundo (Adaptado com permissão da Organização Mundial de Saúde – publicações IARC, 1995)

NOTA: Extraído com permissão de Lorenzatto, 2001.

A imunodeficiência adquirida, como fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), tem sido relatada (WRIGHT, SUN, 1996). A participação dos linfócitos T é fundamental no mecanismo de vigilância imunológica, promovendo a retirada de células mortas ou atípicas do meio tecidual, impedindo que haja multiplicação exacerbada a partir destas matrizes. O déficit do número e da função dos linfócitos T é um dos motivos pelos quais há maior prevalência de NIC em portadoras da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MOTA, 2002).

1.1 Neoplasia intra-epitelial cervical

As lesões precursoras do câncer do colo do útero foram primeiro descritas por Cullen, em 1900 e Rubin, em 1910, como achados histopatológicos casuais em bordas de tumores francamente invasores. As células observadas nessas lesões tinham aspectos morfológicos semelhantes aos do tumor infiltrante, porém estavam contidas dentro do epitélio transformado. A melhor caracterização dessas lesões iniciais deveu-se a dois inovadores procedimentos propedêuticos: a colposcopia, idealizada por Hinselmann, em 1925, e a colpocitologia oncótica, preconizada em 1938, por Papanicolaou (SILVANY FILHO, 1998).

Três aspectos morfológicos básicos são dominantes nas lesões precursoras: proliferação celular, mitoses e perda da diferenciação ou da polaridade. Na dependência das alterações encontradas, Reagan, Harmonic, (1956) denominaram essas lesões, que antecedem o câncer invasor, displasias, graduando-as em leve, moderada e severa, com progressão para o carcinoma *in situ*.

Richart (1967) reconheceu que tais lesões possuíam caráter neoplásico verdadeiro. Preferiu, por isto, nomeá-las como neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), graduando-as como NIC 1, NIC 2 e NIC 3, de acordo com a intensidade das atipias. Em decorrência das dificuldades na precisão dos diagnósticos diferenciais entre NIC 3 e carcinoma *in situ*, Richart (1973) propôs, como legenda diagnóstica única, o encontro de NIC 3 e carcinoma *in situ*.

Em 1988, surgiu o Sistema Bethesda, com o intuito de simplificar a classificação anterior, agrupando em dois tipos os resultados anormais do exame de Papanicolaou, distinguindo: *Low Squamous Intraepithelial Lesion* (L.SIL) ou lesão de baixo grau e *High Squamous Intraepithelial Lesion* (H.SIL) ou lesão de alto grau. De acordo com esses princípios, os esfregaços rotulados como L.SIL apresentavam células com leves atipias e aqueles, tidos como H.SIL, continham células com atipias pronunciadas.

Dois anos após, Richart (1990) recomendou novo agrupamento classificatório para os esfregaços citopatológicos anormais:

Lo.SIL – abrangendo as lesões NIC 1;

Hi.SIL – abrangendo NIC 2, NIC 3 e carcinoma *in situ*.

O Sistema Bethesda foi revisado em 2001 sendo hoje a classificação aceita pela maioria dos serviços de citopatologia ao nível mundial. Com poucas modificações particulares, refere-se à lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (NIC 1 e alterações pelo HPV), e lesão de alto grau (NIC 2 e NIC 3) (Sistema Bethesda, no ANEXO 2) (BEREK, 2003).

A NIC origina-se em células metaplásicas imaturas, as quais é provável que se alterem devido a uma associação de fatores, como agentes oncogênicos, distúrbios imunológicos e outros, encontrados principalmente em certos grupos epidemiológicos (SCHIFFMAN et al., 2000).

Para que se possam abordar os diversos aspectos das neoplasias intra-epiteliais cervicais, é mister conhecer a estrutura histológica do colo do útero, para a qual há consenso internacional de domínio público (BOUGHART, 1983; RIBEIRO, 1994; SILVANY FILHO, 1998; FERENCZY, WRIGHT, 2002).

O colo do útero é uma estrutura de fácil acesso ao exame, porém, complexa em sua constituição e funcionalidade. Possui tecido fibroso e muscular liso e duas mucosas originais. A primeira delas é composta por epitélio escamoso estratificado, não queratinizado, que recobre a porção contida na vagina - a ectocérvice - e toda a mucosa do canal vaginal. A ectocérvice é denominada mucosa vaginal do colo e não possui glândulas. A outra mucosa original reveste internamente o canal cervical - a endocérvice - que é formada por um epitélio colunar simples, de células mucíparas,

com eventuais células ciliadas e células de reserva. Encontram-se ainda, na lâmina própria do canal cervical, tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado e glândulas.

A união do epitélio escamoso ectocervical com as células colunares da endocérvice denomina-se junção escamocolunar (JEC). No colo padrão, a JEC situa-se no orifício cervical externo (OC), podendo projetar-se para a face externa do colo, caracterizando a ectopia, ou, inversamente, para seu interior, constituindo a entropia. A entropia ou a ectopia pode surgir em situações fisiológicas ou patológicas. Como compensação natural, na existência de ectopia, o organismo transforma o epitélio glandular localizado na endocérvice, em epitélio escamoso, surgindo nesta área, o epitélio escamoso metaplásico, que caracteriza a terceira mucosa, também denominada zona de transformação (ZT), que situa-se entre a última glândula e a JEC. A ZT tem especial importância no exame colposcópico por ser, reconhecidamente, o sítio original das neoplasias intra-epiteliais cervicais.

O epitélio escamoso original da cérvice uterina possui uma membrana basal, que faz a adesão do tecido epitelial à lâmina própria adjacente. É constituído por três camadas. A profunda ou germinativa está localizada junto à lâmina própria, é uniestratificada em células basais e pluriestratificada em células parabasais, estas dotadas de capacidade proliferativa; a camada intermediária é formada por células com citoplasma abundante, núcleos pequenos e arredondados, competentes para se tornarem pavimentosas, enquanto que a camada superficial da cérvice é composta por várias células superpostas, contendo citoplasma abundante, núcleos picnóticos com eixos paralelos à superfície do epitélio.

Funcionalmente a camada germinativa é responsável pela renovação e proliferação do epitélio, suas células são ricas em ribossomos e, portanto, alvo de agentes oncogênicos e do parasitismo viral. Os ribossomos em abundância nessas células retratam sua potencialidade de metabolização de proteínas, no curso de expressão de genes diferenciadores. A existência de microlacerações e o início da metaplasia escamosa são condições que facilitam o acesso dos vírus a estas camadas celulares profundas.

O glicogênio armazenado pelas células intermediárias, quando transformado em ácido láctico por ação dos lactobacilos de Döderlein, protege a cavidade vaginal contra alguns microorganismos patogênicos. As células superficiais também

protegem a mucosa, chegando a promover o espessamento e até a queratinização de sua camada, quando uma proteção maior torna-se necessária.

A polaridade do epitélio consiste na arquitetura organizada das três camadas da mucosa e caracteriza-se pelo encontro, na camada profunda, de células basais uniestratificadas com núcleos perpendiculares ao eixo do epitélio; células da camada intermediária, com núcleos arredondados, e células superficiais com núcleos picnóticos, paralelos à superfície do epitélio (BIBBO, 1991).

A graduação das lesões precursoras em NIC 1, NIC 2 e NIC 3 é embasada na intensidade dos distúrbios morfológicos celulares, relacionados principalmente com a proliferação, a atipia nuclear, as mitoses e a polaridade. Estes critérios morfológicos são avaliados também em relação ao nível que alcançam na verticalidade do epitélio. Utiliza-se, universalmente, o sistema de divisão do epitélio em três terços: inferior, mediano e superficial. Desse modo, na NIC 1, as alterações celulares e a perda de diferenciação, ficam restritas ao terço inferior do epitélio. Na NIC 2, as alterações ocorrem nos dois terços inferiores, completando-se a diferenciação no terço superficial. Na ocorrência de NIC 3, existem alterações morfológicas das células, que ocupam os três terços do epitélio, porém, ainda são encontradas células diferenciadas. No carcinoma *in situ*, existe inquestionável envolvimento de toda a espessura do epitélio, sem qualquer evidência de diferenciação celular, estando a membrana basal íntegra (RICHART, 1967; BOUGHART, 1983; BIBBO, 1991).

As lesões precursoras do câncer do colo do útero têm, em geral, um curso evolutivo desigual e lento, podendo regredir, permanecer inalteradas ou sofrer progressão (RICHART, 1967). Para alguns autores, NIC 1, NIC 2 e NIC 3 representam distintos processos, em que NIC 1 é autolimitada e espelha a infecção pelo *Papilomavirus* sexualmente transmitido, enquanto que NIC 2 e NIC 3 seriam as verdadeiras lesões pré-malignas (ADAM et al., 2000; MALIK et al., 2001).

Mesmo antes de se conhecer a ação do HPV na gênese dessas lesões, o valor de sua intensidade já era enfatizado, ao se afirmar que as lesões que atingem os dois ou os três terços da espessura do epitélio cervical se originam em área de NIC 1, porém com características morfológicas já de franca transformação pré-maligna (BOUGHART, 1983).

Vários estudos epidemiológicos, alguns utilizando técnicas de biologia molecular, comparados ou não com os aspectos citohistopatológicos, para o diagnóstico da infecção cervical pelo HPV, têm se desenvolvido nas últimas décadas, confirmando a tese de que este vírus representa um dos fatores mais importantes na gênese das lesões precursoras do câncer cervical uterino (CAMPION et al., 1986; ZUR HAUSEN, 1986; MUÑOZ, BOSCH, 1992; BOSCH et al., 1995; PALEFSKY, HOLLY, 1995; LIAW et al., 1999; SCHIFFMAN et al., 2000).

A relação entre infecção pelo HPV e desenvolvimento de NIC satisfaz a maior parte dos critérios clássicos de Bradford Hill, para inferência causal. A associação é forte, com risco relativo, variando entre 20 e 70; consistente com resultados reproduzidos em populações diferentes; temporalmente plausível, uma vez que estudos de coorte demonstram inquestionavelmente que a infecção precede o início das lesões intra-epiteliais, além de ser biologicamente plausível e coerente, contribuindo para o melhor conhecimento a respeito da história natural da doença (FRANCO, 1996).

1.2 Fatores de risco para neoplasias intra-epiteliais cervicais

1.2.1 Papilomavirus humano

Pertencente à família *Papovaviridae*, o HPV tem formato icosaédrico, é desprovido de envelope e mede aproximadamente 55 nm. Em seu genoma, possui cerca de 8.000 pares de bases de DNA circular de dupla fita. O genoma está dividido em regiões denominadas *Open Reading Frames* (ORF), as quais encontram-se em uma mesma fita de DNA e constituem os genes virais. Os três fragmentos subgenômicos na organização do genoma do HPV, até agora identificados, são: região precoce ou E de *early*, região tardia ou L de *late* e região não codificada ou LCR de *long coding region* (HOWLEY, 1996). Este genoma é mantido na forma episomal no núcleo de células normais infectadas, enquanto que, nos processos de NIC e mais frequentemente no câncer invasor, o genoma do HPV

é encontrado integrado aos cromossomos das células hospedeiras (CULLEN et al., 1991).

Entre os genes indutores de atipia celular, situados na região precoce, destacam-se E1 e E2, relacionados com a replicação episossomal e a regulação da transcrição; E6 e E7, que inativam o gene produtor das proteínas p53 e pRb, supressoras do crescimento tumoral (Figura 2) O gene P53, localizado no cromossomo 17, expressa a proteína p53 e tem a importante função de ativar genes que mantêm a estabilidade do genoma. Na divisão normal da célula, a p53 não é necessária, porém, quando o DNA é de alguma forma lesado, sua função reparadora é induzida, o que lhe confere o título de guardião do genoma (LANE, 1992).

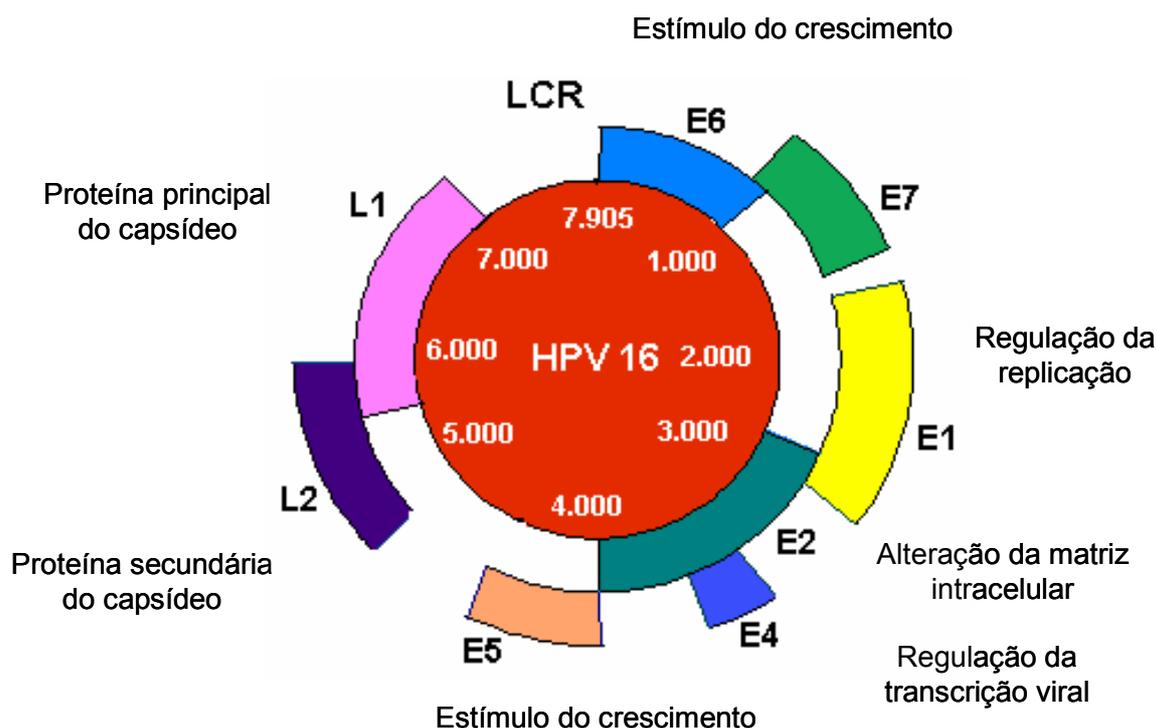


Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HPV16

Havendo modificação do DNA, a expressão do P53 é aumentada, ativando a proteína p21, que bloqueia o ciclo celular em G1, para a reparação do DNA. Quando esta reparação não ocorre, o P53 induz a apoptose. O gene E6 de tipos oncogênicos do HPV integram-se à seqüência do P53, induzindo sua degradação e,

conseqüentemente, impedindo a reparação do DNA. Em decorrência, surgem os genes mutantes, que são perpetuados, levando à proliferação celular desordenada, característica das lesões neoplásicas (GREEMBLAT et al., 1994).

O gene Rb, localizado no cromossomo 13, expressa a proteína pRb, que se une ao fator de transcrição E₂F na fase G1 do ciclo celular. Durante o ciclo celular normal, a proteína pRb é fosforilada, liberando E₂F. A oncoproteína E7, encontrada nos tipos oncogênicos de HPV, liga-se à pRb, interferindo em sua habilidade de manter E₂F na forma inativa. A presença de E₂F, na forma ativada, ao longo de todas as fases do ciclo celular, leva ao crescimento desordenado das células. Atribui-se ainda ao gene E7, a capacidade de reduzir a expressão dos antígenos de histocompatibilidade, situados na superfície celular, o que pode explicar, pelo menos em parte, o retardo na resposta do hospedeiro (GALLOWAY, McDOUGALL, 1989).

Já foram identificados mais de 120 tipos diferentes de HPV. Destes, cerca de 40 parasitam preferencialmente a região anogenital. O possível seqüenciamento das áreas limitantes abertas de leitura do genoma do HPV, as chamadas ORF, das proteínas E6, E7 e L1, possibilita o isolamento de um novo tipo viral, quando a homologia de nucleotídeos, nestas ORF, difere em 10% dos tipos virais conhecidos (WIKSTRÖM, 1995; FRANCO et al., 1999a).

As variantes dos vírus diferem de outros do mesmo tipo em menos de 2% da seqüência de nucleotídeos em região específica do genoma viral (BURK et al., 2003).

De acordo com a localização, na qual foram inicialmente isolados, os tipos de HPV foram classificados como cutâneos ou genitais. Os vírus, que atuam preferencialmente na superfície cutânea, foram subdivididos em tipos que causam verrugas benignas planas ou *vulgaris*, números 1, 4, 41, 49, 63 e 65, e aqueles que são encontrados na epidermodisplasia verruciforme. Nesta patologia, os tipos virais envolvidos são: 3, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 25 e 47. Os tipos 5, 8, 12 e 47 representam risco significativo de degeneração maligna (GROSS, BARRASSO, 1999).

Os tipos de HPV, isolados inicialmente em verrugas genitais ou condiloma acuminado, são classificados como de baixo risco, entre os quais: 6, 11, 42, 44, 70 e 73, e de alto risco oncogênico, aqueles associados com lesões intra-epiteliais e

câncer, os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Conclui-se, portanto, que a classificação taxonômica baseia-se na seqüência de nucleotídeos dos HPV, claramente correlacionada com seu tropismo tissular e seu potencial oncogênico. Daí porque existe um grupo intermediário de HPV 26, 54, 70 e 73, para os quais ainda não existe base epidemiológica que defina seu potencial oncogênico (ZUR HAUSEN, 1991; WIKSTRÖM, 1995; VILLA, 1997). Essa correlação, entre tipos de HPV de alto risco, câncer cervical e suas lesões precursoras ficou mais evidente após os estudos realizados por Riou et al. (1990); Bosch et al. (1995); Walboomers et al. (1999) e Haverkos et al. (2000), entre outros, que detectaram a presença do DNA de HPV de alto risco em 84% a 99,7% dos cânceres cervicais.

Harmsel et al. (1999), em estudo prospectivo, com duração de dois anos, utilizando colposcopia e colpocitologia, a cada seis meses, e histopatologia, quando necessário, avaliaram o surgimento e progressão de NIC em 54 portadoras de infecção cervical por HPV-16. Constataram, em 25 pacientes, infecção persistente, quando da ocorrência de três testes positivos consecutivos, nos quais o surgimento de NIC foi estatisticamente significativa.

Bosch et al. (1995), utilizando PCR, identificaram DNA-HPV em 93% das 1.000 lâminas de portadoras de câncer cervical invasivo, provenientes de 22 diferentes países, localizados nos cinco continentes, cujos tipos mais prevalentes foram, por ordem de freqüência, 16, 18, 45, 31, 39 e 59.

Para Shah et al. (1997), a evolução da infecção viral para a lesão de alto grau e câncer invasivo depende de vários fatores, alguns ainda desconhecidos. Constatase na literatura que um desses fatores é o tipo do HPV, desde que o risco de progressão da lesão foi mais elevado entre as infectadas pelo HPV-16, quando comparadas com portadoras de infecção cervical por outros tipos virais (BOSCH et al., 2002).

Pesquisas recentes demonstram que infecções por variantes do HPV-16 favorecem a persistência da infecção e conseqüentemente, elevam o risco de progressão das lesões (VILLA et al., 2000; BURK et al., 2003; GONZALEZ-LOSA et al., 2004).

O HPV é o agente etiológico do câncer cervical, entretanto não se tem conseguido constatar sua presença em todas as portadoras dessa neoplasia. Enquanto, para alguns autores, a não constatação da presença do vírus decorre da técnica utilizada na identificação de DNA-HPV presente e na tipagem do mesmo (MUÑOZ, BOSCH, 1992; HERRERO et al., 1996), outros investigadores sugerem que co-fatores atuam em conjunto com o HPV, para iniciar e promover a carcinogênese (WIKSTRÖM, 1995).

A infecção pelo HPV, no trato genital inferior, pode ocorrer de três formas distintas: clínica, subclínica e latente.

- clínica – a infecção caracteriza-se, na maioria das vezes, pela presença de lesões verrucosas, visualizadas durante a observação da genitália sem a necessidade de aparelhos ou exames especiais para serem diagnosticadas. As verrugas genitais, também chamadas condilomas acuminados, geralmente são causadas por vírus de baixo risco e são muito transmissíveis;
- subclínica – é evidenciável por colposcopia, após aplicação de ácido acético, como também por colpocitologia oncótica ou por histopatologia. Na maior parte dos casos localiza-se no colo do útero, situando-se preferencialmente dentro da zona de transformação. É cerca de 10 vezes mais freqüente do que a forma clínica. Possui baixa transmissibilidade e pode ser produzida por HPV de baixo ou alto risco oncogênico.
- latente – caracteriza-se pela possibilidade de ser diagnosticada apenas por meio de técnicas de biologia molecular, entre as quais: captura hídrica, hibridização *in situ* ou em filtros, *polimerase chain reaction* (PCR) e seqüenciamento de DNA. Na infecção latente a transmissibilidade é muito baixa (HO et al., 1998).

1.2.2 Uso de contraceptivos hormonais

Os esteróides sexuais tem sido largamente utilizados, com a finalidade contraceptiva ou para repor déficit endógeno. Vários estudos epidemiológicos demonstram que usuárias de anticoncepcionais hormonais orais apresentam um elevado risco de desenvolver neoplasia do colo do útero, e que esse risco pode ser tempo dependente (BRINTON, 1991; MORENO et al., 2002; YOKOYAMA et al., 2003). Alguns autores advogam que as usuárias de pílulas, por sentirem-se protegidas da gravidez indesejada, têm maior atividade sexual, sem uso de preservativo, portanto tornam-se mais vulneráveis às infecções, particularmente pelo HPV (WIKSTRÖM, 1995).

Entre as usuárias de pílulas, encontra-se maior freqüência de ectopia cervical, que pode sofrer metaplasia escamosa, e, na presença do HPV, originar neoplasia intra-epitelial. Os mecanismos de interação entre HPV e esteróides sexuais não são totalmente esclarecidos, porém os estudos experimentais sugerem que tais substâncias aumentam a expressão gênica do HPV, por ativação dos receptores nucleares para esses hormônios (BRINTON, 1991).

Roche e Crum (1991), após estudarem influência da imunidade local na etiologia das neoplasias cervicais, sugerem que modificações hormonais alteram as secreções cervicais, o que pode facilitar a oncogenicidade viral. Como demonstrado por Pater et al. (1994), existem elementos de reconhecimento hormonal na região regulatória do genoma dos HPV, capazes de promover a transformação de células *in vitro* em presença de progestágenos. Atribui-se aos progestágenos contidos nos contraceptivos orais ou injetáveis, a capacidade de suprimir a maturação do epitélio cervical, tornando-o vulnerável ao surgimento de tumor. Nas portadoras de NIC e HPV existem receptores locais para a progesterona, o que torna fácil o entendimento de que o uso exógeno desse hormônio, pode contribuir para o aumento dos riscos de câncer cervical (MONSONEGO et al., 1991).

Nos estudos multicêntricos realizados com o intuito de avaliar a participação de usuárias de pílulas entre portadoras de neoplasias cervicais, constata-se que:

- entre as portadoras de câncer cervical HPV-positivas, o uso de pílulas, por menos de cinco anos, não foi relacionado à neoplasia (OR=0,77, IC95% 0,46-1,29);
- nas mesmas condições, entre usuárias de pílulas por cinco a nove anos, o risco aumentou significativamente (OR=2,72, IC95% 1,36-5,46);
- o uso de pílulas por mais de dez anos, em portadoras de HPV, aumentou ainda mais o risco de câncer cervical (OR=4,48, IC95% 2,24-9,36) (MORENO et al., 2002).

1.2.3 Tabagismo

Na década de 70, surgiram os primeiros estudos mostrando a associação entre tabagismo e câncer cervical uterino. O hábito de fumar também tem sido significativamente associado com NIC. Os efeitos imunossupressivos e mutagênicos das substâncias, que emanam da fumaça do fumo, têm sido descritos por vários autores (FRANCO et al., 1999b; BOSCH et al., 2002; GIULIANO et al., 2002).

Como ficou comprovado por Helberg et al. (1998), o acúmulo mensurável de nicotina e de cotidina no muco cervical permite a feitura de um modelo de como o tabagismo pode ser um fator de risco para a NIC. Para Phillips e Smith (1994), esta associação é epidemiologicamente difícil de ser estabelecida, uma vez que, em muitas culturas, existe forte correlação entre tabagismo antes e após a atividade sexual, dificultando o controle dos fatores de confundimento.

Estudos epidemiológicos mais recentes indicam o tabagismo como fator de risco na etiologia do processo, refletindo diferenças de exposição ao HPV nos grupos pesquisados (SHIFFMAN et al., 1993). Apesar de reconhecerem que, entre as fumantes, há significativo decréscimo da densidade das células de Langerhans na zona de transformação do epitélio escamoso do colo do útero, sugerindo efeito supressivo local na imunidade mediada por células, como demonstrado entre outros por Poppe et al. (1995), Giuliano et al. (2002) apontam que o tabagismo aumenta a persistência da infecção local por tipos oncogênicos de HPV, contribuindo para a carcinogênese cervical uterina. Utilizando métodos de biologia molecular, estes

autores demonstram que, entre as fumantes, a média de duração da infecção cervical por HPV é de 10,7 meses, comparada com a média de duração de 8,5 meses entre as não tabagistas. O tempo de duração do hábito de fumar e o número de cigarros consumidos por dia, que refletem a dose-resposta, também foram avaliados nesse estudo, sugerindo que o tabagismo influencia a história natural da infecção pelo HPV, favorecendo a carcinogênese (GIULIANO et al., 2002).

Na mesma linha de pesquisa, Franco et al. (1999b) avaliaram a persistência da infecção por tipos oncogênicos de HPV, em população de incidência elevada para câncer cervical, no Brasil, com duração de 13,5 meses, comparado aos 8,2 meses para tipos não oncogênicos. Na mesma pesquisa, os autores verificam que o HPV-16 persistiu por mais tempo que os outros tipos oncogênicos e que entre as pesquisadas havia elevada incidência de tabagistas.

O possível efeito sinérgico do tabagismo, na carcinogênese cervical induzida pelo HPV, já foi sugerido por Zur Hausen (1991). Outros pesquisadores, como Nakao et al. (1996), advogam que a fumaça do cigarro possui nitrosaminas específicas, com forte atividade carcinogênica, embasados em modelos animais, e que certas nitrosaminas concentram-se seletivamente no muco cervical das fumantes. A partir desses princípios, construíram um modelo para explicar a carcinogênese cervical. Utilizando concentrado dos componentes da fumaça do cigarro, onde são cultivadas células cervicais imortalizadas pelo HPV 18, os autores conseguiram, *in vitro*, demonstrar o papel do tabagismo na progressão da carcinogênese iniciada pelo HPV.

Ficou claro, também para Muñoz et al. (2003), o papel facilitador do tabagismo na carcinogênese cervical. Na conclusão do Relatório IARC, a partir dos resultados de 12 estudos do tipo caso-controle sobre o papel do HPV e de co-fatores no câncer cervical uterino, identificaram entre as fumantes o aumento de duas vezes no risco para desenvolver tal neoplasia, comparadas com as não fumantes (OR=2,2; IC95% 1,5-3,2).

1.2.4 Idade

A constatação, de que o câncer cervical invasivo tem frequência maior nas pacientes com idade acima de 48 anos, sugeriu, para alguns autores, a influência que o déficit na produção dos hormônios ovarianos poderia ter na gênese dessa neoplasia. No entanto, o embasamento na etiologia multifatorial atualmente aceita, salientando-se o papel do HPV no processo neoplásico, e a maior frequência da infecção por este vírus entre adolescentes e adultas jovens, além da maior incidência de NIC após os 35 anos de idade, facilitam a compreensão dessas etapas, no lento processo evolutivo do tumor (KJAER et al., 2002).

Utilizando diferentes métodos de diagnóstico, vários autores relatam o encontro da infecção cervical pelo HPV, com incidência maior entre 15 e 25 anos de idade e prevalência de 30% a 50% entre as jovens sexualmente ativas (HO et al., 1998; ADAM et al., 2000; KAHN, 2001; KJAER et al., 2002). Ainda entre essas jovens, observa-se elevação na incidência de infecção transiente e maior prevalência de NIC 1, associada à persistente infecção por tipos oncogênicos de HPV (KAHN, 2001; KJAER et al., 2002; SILVA et al., 2002; FREGA et al., 2003).

À parte dos aspectos comportamentais reconhecidamente importantes na gênese da NIC entre jovens, há relatos da vulnerabilidade biológica das adolescentes às infecções sexualmente transmissíveis. Admite-se existir, entre elas, baixa produção de muco cervical, com inadequada barreira de proteção contra agentes infecciosos e maior ocorrência de ectopia. As células colunares imaturas e mutagênicas, aí localizadas, são particularmente mais vulneráveis a microtraumas durante o relacionamento sexual e à transmissão de diversos microorganismos, inclusive HIV e HPV (WASSERHEIT, 1992; HO et al., 1998; FREGA et al., 2003).

1.2.5 Número de gestações

Nos últimos 30 anos, as pesquisas têm consistentemente demonstrado que, entre os fatores de risco para câncer do colo do útero e suas lesões precursoras, aqueles relacionados com a atividade sexual, exercem forte influência. Tanto é

assim, que se observa, na literatura, associação entre multiparidade e câncer do colo do útero.

Dentre os resultados do relatório IARC, que avalia o papel do HPV no tumor cérvico-uterino invasivo, entre pacientes HPV positivas, que relatam sete gestações a termo, houve risco quatro vezes maior para este tipo de câncer, quando comparadas às mulheres igualmente positivas para HPV que eram nulíparas (OR=3,8; IC95% 2,7-5,5) (MUÑOZ et al., 2003).

No entanto, comparando a multigestação com os outros fatores de risco para o câncer cervical, o número de gestações, em si, não promove aumento do risco dessa neoplasia e também não é, obviamente, influenciado pela infecção pelo HPV (WILKSTRÖM, 1995). Por outro lado, aliado às condições socioeconômicas inadequadas, que debilitam o organismo, que dificultam o acesso aos métodos contraceptivos, aos procedimentos ginecológicos preventivos e à suficiente assistência obstétrica; esses fatores, em conjunto, contribuem para elevar a frequência de neoplasias cervicais entre as múltiparas (BRINTON et al., 1992; SCHIFFMAN, BRINTON, 1995; FRANCO et al., 2001; LORENZATO, 2001).

A literatura atual evidencia o HPV como fator necessário para as neoplasias cervicais, porém não suficiente. Entre os co-fatores, a multiparidade é citada, mas ainda não foi suficientemente comprovada, talvez porque os estudos de caso-controle têm falhado na identificação dos fatores que contribuem para essa patologia, pela falta de padronização dos instrumentos de coleta de dados e da metodologia de identificação e tipagem do DNA-HPV. Por esse motivo, tem-se buscado a uniformização das informações, com o objetivo de facilitar a análise (MUÑOZ, 2003).

1.2.6 Número de parceiros sexuais

Estudos epidemiológicos têm indicado que a ocorrência de neoplasias cervicais é fortemente influenciada, também, por fatores relativos à atividade sexual das pacientes e de seus parceiros (FRANCO, 1991; BRINTON, HOOVER, 1992; MUÑOZ, BOSCH, 1992; IARC, 1995; VILLA, 1997).

É usual, entre as portadoras de NIC, o relato de contacto sexual com vários parceiros, assim como, em alguns estudos, de antecedentes de infecções de transmissão sexual. No entanto algumas pacientes relatam atividade sexual com um único parceiro. Há citações na literatura que contribuem diretamente para demonstrar a importância do comportamento sexual do parceiro único das portadoras de NIC (BRINTON et al., 1992).

Fatores culturais ainda influenciam esse processo, como aqueles relativos ao grau de instrução e aos hábitos higiênicos. A elevada incidência de neoplasia cervical, em alguns países da América Latina, entre os quais o Brasil, está associada com maior frequência de câncer de pênis e fatores comportamentais, como múltiplos parceiros (BRINTON et al., 1989).

Há estudos, do tipo série de casos, mostrando o aumento da frequência de neoplasia cervical em pacientes nas quais seus parceiros tiveram esposas portadoras dessa neoplasia. Existem evidências de que o carcinoma de células escamosas do pênis tem etiologia multifatorial, com frequência maior na terceira idade, entre portadores de fimose, com déficit de higiene e, também, infecção pelo HPV. A infecção pelo HPV não tem sido tão intensivamente estudada nos homens como nas mulheres, todavia o maior número de parceiros sexuais, aumenta a probabilidade de infecção, inclusive por diferentes tipos virais (SYRJÄNEN et al., 1987; MAICHE, PYRHÖNEN, 1990; KARLSSON et al., 1995).

1.2.7 Infecções sexualmente transmissíveis

As clássicas doenças venéreas (DV) relativas à Vênus, deusa do amor, foram, ao longo das décadas, sendo incorporadas a outras doenças que surgiram, também transmissíveis durante o ato sexual. Estas passaram a ser chamada de doenças sexualmente transmissíveis (DST). A mudança de terminologia, não atende ao conhecimento atual sobre cerca de trinta agentes etiológicos de doenças, que podem ser adquiridas durante o coito, porém alguns possuem outras formas de transmissão e período de latência assintomática, entre os quais: *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, HIV, HPV e *Herpes simplex* Vírus (HSV).

Por esse motivo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs o termo Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), que engloba aquelas não evidentes clinicamente, porém transmissíveis, entre outras vias, durante o ato sexual (WHO, 1996).

Vários microorganismos já foram imputados na etiologia das neoplasias cervicais, entre os quais: HSV, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e HPV (BECKER et al., 1994; VIIKKI et al., 2000; GIULIANO et al., 2001).

Nos últimos 10 anos, tem sido cientificamente documentado o sinergismo epidemiológico entre as IST, algumas influenciando diretamente na transmissão do HIV (FLEMING, WASSEHEIT, 1999; WRIGHT et al., 2001; LAI et al., 2003).

1.2.8 Déficit imunológico, alimentar e fatores genéticos

O estado imunológico das pacientes é considerado um fator relevante na incidência das NIC e do câncer cervical. Essas patologias têm incidências significativamente elevadas nas mulheres imunocomprometidas, mais especificamente, nas que receberam transplantes de órgãos ou de tecidos e nas infectadas pelo HIV (MOTA, 2002).

A imunidade local, mediada pelas células de Langerhans, pode ser a chave do mecanismo defensivo do hospedeiro contra a infecção pelo HPV e do posterior desenvolvimento das neoplasias. Há reduzida densidade dessas células, consideradas apresentadoras de antígenos, em portadoras de HPV e NIC, principalmente entre aquelas que possuem o hábito de fumar (ZUR HAUSEN, 1986; UCHIMURA, 2002).

A ativação de células T CD4 representa etapa fundamental na elaboração da resposta eficiente contra infecções virais e processos neoplásicos. Estas células são ativadas em estruturas linfóides secundárias, pelas células dendríticas ou de Langerhans, e, dessa interação resulta a ativação de linfócitos T CD8. A resposta imune não parece efetiva na eliminação dos vírus e na regressão das lesões, em algumas pacientes (Van der BURG et al., 2001).

Destacam-se ainda, entre os fatores de risco para as neoplasias cervicais, as carências nutricionais de Vitamina A, β -caroteno, Vitamina C e ácido fólico (VERREAULT et al., 1989; WIKSTRÖM, 1995; KWASNIEWSKA et al., 2002).

No que tange aos aspectos hereditários, na etiopatogenia das neoplasias cervicais, a análise da história familiar não tem demonstrado correlação positiva, como observada nos tumores de mama. Provavelmente os casos citados de ocorrência em membros de uma mesma família foram devido à similaridade de fatores ambientais ou comportamentais (MACIAG, 2002). Todavia estudos realizados em portadoras de infecção cervical pelo HPV e NIC identificaram fatores genéticos do hospedeiro, como o polimorfismo de genes antígenos leucocitários humanos (HLA), implicados na susceptibilidade a estas patologias e fundamentais no controle da resposta imune (MACIAG, 2002).

Os genes HLA estão localizados no complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e são divididos em genes de classe I e de classe II. Os genes de classe I, presentes nas células nucleadas, têm como função principal a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8 (citotóxicos), enquanto que os genes de classe II, presentes nas células de Langerhans e nos macrófagos, apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4 (auxiliares) (UCHIMURA 2002).

Ao considerar os genes HLA de classe II e as neoplasias cervicais, estudo de Maciag (2002) demonstrou, como fator de risco para desenvolvimento de NIC, a tipificação de HLA-DRB1. No entanto, o autor reconhece a necessidade da ampliação do período de observação e do tamanho amostral, para melhor esclarecimento desta associação.

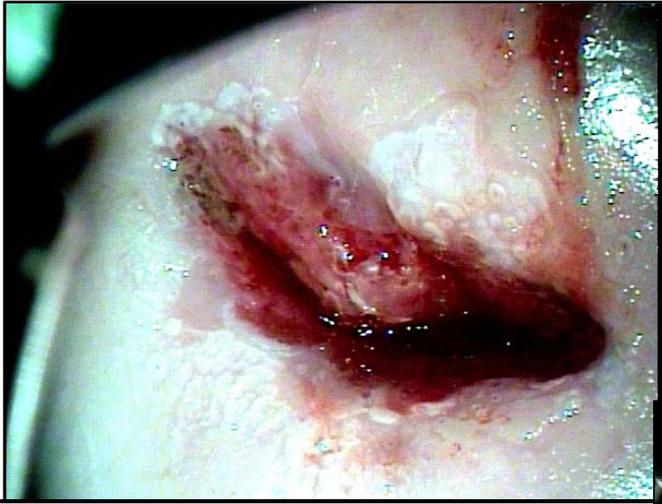
1.3 Justificativa

Considerados todos os fatores de risco que foram tema de pesquisas, ao longo do tempo, em diversas partes do mundo, é inquestionável serem as lesões intra-epiteliais cervicais precursoras de câncer do colo uterino. Assim sendo, parece também fundamental que se envidem esforços para reduzir a incidência e a prevalência de tais lesões, como forma eficaz de minimizar os riscos das lesões invasivas.

Em relação a NIC e câncer do colo do útero, Recife, situada na região nordeste do Brasil, apresenta duas características. Em primeiro lugar, detém as maiores taxas mundiais de câncer do colo uterino; em segundo lugar, não dispõe de estudos nos quais todas as relações causais tenham sido epidemiologicamente investigadas, o que é preocupante.

Atualmente o principal fator causal do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras é a infecção por HPV, sendo sua investigação mandatória como conduta preventiva. Diversos métodos, diretos e indiretos, estão disponíveis para pesquisa de HPV, desde a colposcopia e as alterações morfológicas citohistopatológicas, já realizadas nos serviços de Ginecologia na Cidade do Recife, até os métodos de biologia molecular, de custo ainda inviável para estabelecimento como rotina na região, dadas suas características socioeconômicas.

Assim sendo, buscou-se investigar a presença de HPV em pacientes portadoras de NIC e num grupo controle, utilizando os métodos ópticos clássicos e a reação de PCR, assim como a influência dos fatores de risco comportamentais e ambientais já referidos na literatura, no intuito de contribuir com o conhecimento, que poderá auxiliar as estratégias nos programas de prevenção de câncer do colo uterino, inseridos na realidade social da região.



Microfotografia do HPV

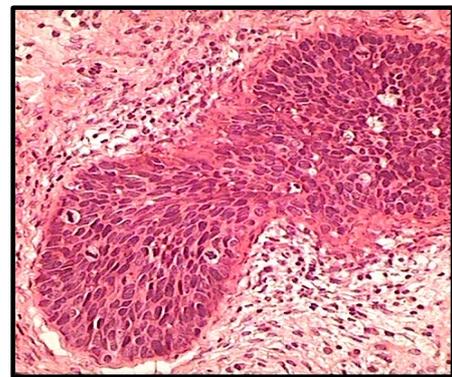


Colposcopia – Epitélio acetobranco justa orifical, com vários orifícios glandulares espessados. Achados insatisfatórios: JEC não visível

Teste de Schiller



Histopatologia – HE 100X – Micrografia exhibe quatro criptas com marcante atipia – NIC 3 em criptas



Criptas com atipia

2 OBJETIVOS

Cripta normal

2.1 Geral

Identificar os fatores de risco para NIC em pacientes atendidas no Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

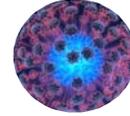
2.2 Específicos

- Verificar a associação entre NIC e os potenciais fatores de confusão.
- Identificar o tipo de HPV em pacientes sem patologia cervical e comparar com o tipo de HPV em pacientes com NIC.
- Identificar, nas pacientes estudadas, a associação entre o tipo de HPV-16 e variante 16 e NIC em seus diferentes graus.

2.3 Secundários

- Comparar os resultados da colpocitologia e da histopatologia àqueles da PCR para diagnóstico de HPV.
- Avaliar a concordância entre colposcopia, colpocitologia e histopatologia para o diagnóstico de infecção cervical pelo HPV em portadoras de NIC.

Microfotografia do HPV



Colposcopia – Zona de transformação com vários orifícios glandulares e cisto de Naboth. A última glândula em -3. Epitélio acetobranco acentuado associado a pontilhado fino, com vários orifícios espessados que adentram o canal. JEC não visível



Histopatologia – HE 100x – NIC 3 superficial e em criptas

Epitélio superficial com atipia

Imagem histológica do ducto glandular espessado

Cripta em corte transversal

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 *Desenho do estudo*

Foi realizado estudo do tipo caso-controle, no qual foram incluídas as portadoras de NIC, infectadas ou não pelo HIV, submetidas aos exames colpocitológico, colposcópico, histopatológico e pesquisa de HPV por método de biologia molecular, atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), no período de novembro de 2001 a agosto de 2002. Como grupo controle, foram estudadas pacientes sem patologia cervical, submetidas ao exame preventivo de rotina no mesmo hospital e período.

Por ser a NIC patologia caracterizada por tempo de evolução longo, o estudo do tipo caso-controle mostra-se mais indicado, por ser analítico e observacional, possibilitando testar a hipótese, sem a necessidade de acompanhamento das pacientes por período prolongado.

3.2 *Local do estudo*

O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco situa-se no campus universitário. É um hospital de arquitetura vertical, multiblocos, com 11 andares, nove dos quais em funcionamento. Dispõe de 345 leitos para internamento nas diversas especialidades médicas e 99 leitos/dia. Possui três centros cirúrgicos, sendo o maior para cirurgias eletivas de médio e grande porte, outro menor para cirurgias ambulatoriais e o centro obstétrico, locais onde são realizadas cerca de 8.000 cirurgias por ano.

Do ponto de vista organizacional, é hospital público, federal, de nível terciário, para onde são encaminhados pacientes do Recife, Região Metropolitana e Interior do Estado. Em seus ambulatórios são realizadas anualmente cerca de 1.600.000 consultas, entre as quais, 10.000 atendimentos ginecológicos e cerca de 6.000 exames colposcópicos.

Como hospital-escola, é centro de formação, especialização e treinamento para estudantes e profissionais de Medicina, Psicologia, Enfermagem, Fisioterapia, Terapia Ocupacional, Fonoaudiologia, Nutrição e Farmácia.

O serviço de colposcopia funciona no terceiro andar, em cinco salas individuais, com atendimento em tempo integral. Dispõe de cinco experientes médicos colposcopistas, que também colhem o material para colpocitologia oncótica e realizam biópsias nos casos indicados.

3.3 População do estudo

Foram incluídas na pesquisa, 228 mulheres que já tiveram ou que têm atividade sexual e que procuraram atendimento espontâneo ou foram encaminhadas para comprovação diagnóstica no Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas – UFPE, durante o período de novembro de 2001 a agosto de 2002.

Foram excluídas da pesquisa as pacientes grávidas e aquelas cujo nível de compreensão prejudicasse o entendimento e as respostas para o preenchimento do formulário específico.

3.4 Tamanho da amostra

Alguns parâmetros são utilizados para calcular uma amostra de tamanho adequado, entre os quais: nível de significância estatística (erro alfa), chance de não detectar um efeito real (erro beta), chance de detectar uma diferença se ela existir (poder), frequência de exposição entre casos e controles. Desse modo, calcular um tamanho de amostra populacional, que permita adequados níveis de significância estatística e poder, é parte essencial do planejamento (SCHLESSELMAN, 1982).

Admitiu-se no cálculo: a frequência de HPV nas mulheres sem NIC (controles) de 50% e naquelas com NIC (casos) de 74%, correspondendo à razão controles/casos de 68%, que, ao nível de significância de 5%, pode variar de 58,4% a 76,6%. Considerando a necessidade de análise multivariada, o tempo de coleta de dados e a disponibilidade de custeio da pesquisa, admitiram-se: proporção aceitável de controles para casos igual a 0,727, menor valor de OR aceitável igual a 0,445;

maior percentual de exposição entre controles em 68%, erro alfa de 5%; poder de prova de 80%, do que resultou tamanho amostral igual a 227, correspondendo a 131 (57,7%) casos e 96 (42,3%) controles (FLEISS, 1981).

3.5 Definição das variáveis e coleta de dados

3.5.1 Definição dos grupos

Foram considerados casos, as pacientes portadoras de NIC, diagnosticadas pelos exames de colposcopia, colpocitologia oncótica e histopatologia.

Foram considerados controles, as pacientes que apresentavam a colposcopia e colpocitologia oncótica, com resultados normais, em três ocasiões, há aproximadamente quatro anos, há dois anos, assim como o exame realizado por ocasião desse estudo.

3.5.2 Variável dependente - neoplasia intra-epitelial cervical (NIC)

Definida pela presença de desarranjo estrutural no epitélio estratificado no material de biópsia ou esfregaço citológico do colo uterino, com ausência de invasão da membrana basal. Esta variável foi categorizada em três estágios: NIC 1 ou lesão de baixo grau, NIC 2 e NIC 3 ou lesões de alto grau, de acordo com a intensidade das alterações citológicas (BEREK, 2003):

- NIC 1 ou lesão de baixo grau – definida como presença de alterações citológicas com aumento da relação núcleo-citoplasma, sendo o maior diâmetro do núcleo menor que o menor raio da célula, em presença de discretas irregularidades nos grânulos cromatínicos.
- NIC 2 ou lesão de alto grau – definida como presença de alterações citológicas com núcleos mais anormais do que na NIC 1. O maior diâmetro do núcleo é pouco menor que o menor raio da célula, cuja morfologia assemelha-se a células intermediárias ou parabasais.

- NIC 3 ou lesão de alto grau – definida como presença de alterações celulares com sinais de malignidade mais intensos e aumento da relação núcleo-citoplasma. O maior diâmetro do núcleo é geralmente igual ao menor raio da célula. As células são menores e têm citoplasma basófilo.

3.5.3 Variáveis independentes

➤ Infecção pelo HPV

- HPV positivo (+) – mulheres com diagnóstico colpositológico, histopatológico ou por biologia molecular de HPV. Após a tipagem, foram consideradas três categorias de risco oncogênico: baixo risco – 13, 44; risco indeterminado – 83, CP141/LVX e alto risco – 16, 18, 33, 35, 51, 52, 53, 58, 67.
- HPV negativo (-) – mulheres com diagnóstico de normalidade cérvico-uterina pelos exames colposcópico, colpositológico e pela ausência de HPV em teste de biologia molecular.

➤ Infecção pelo HIV

- HIV (+) positivo – foram consideradas HIV positivas, as pacientes que apresentaram dois testes reagentes de enzimaensaio (*ELISA*), seguidos de confirmação pela imunofluorescência.
- HIV (-) negativo – foram consideradas HIV negativas, as pacientes com dois testes *ELISA* não reagentes.

3.5.4 Variáveis de controle

➤ Idade

Definida como anos completos por ocasião da entrevista. Foi usada a categorização: 15 – 29 e 30 – 54, na análise multivariada.

➤ **Estado civil**

Definida como a situação jurídica cível ou a coabitação com companheiro. Foi usada a categorização: solteira, casada e viúva ou separada.

➤ **Grau de instrução**

Definida como a referência de ter freqüentado o ensino formal. Foi usada a categorização: sem instrução ou elementar e fundamental a superior.

➤ **Idade do primeiro coito**

Definida como a idade em que a paciente teve a primeira relação sexual. Foi usada a categorização: 10 – 19 e 20 – 30

➤ **Número de gestações**

Definida como o número de vezes que a paciente declarou ter estado grávida. Foi usada a seguinte categorização: nuligestas – nenhuma, primigestas – uma vez, paucigestas – duas a três vezes e multigestas – quatro ou mais vezes.

Para a análise multivariada, utilizou-se a categorização de ausente para nuligestação e presente, para qualquer número de gestações.

➤ **Número de parceiros sexuais**

Definido como o número de parceiros sexuais nos três anos que antecederam a pesquisa. A categorização foi: um a dois parceiros e três ou mais parceiros

➤ **Método contraceptivo**

Definido como o método utilizado para evitar gravidez, nos três meses que antecederam a pesquisa. Foi usada a categorização: nenhum, não hormonal, nela incluídos ligadura tubária, condom, DIU, coito interrompido, hormonal, que incluiu oral e injetável.

Para a análise multivariada, foi feita categorização de uso de contracepção em sim e não.

➤ **Doenças de transmissão sexual prévia**

Definida como referência de antecedente de qualquer doença de transmissão sexual antes da entrevista. Foi usada a categorização: sim e não.

➤ **Tabagismo**

Definido como a história de tabagismo, categorizada como sim e não.

O tempo e o consumo diário de cigarros foram categorizados em:

Tempo de tabagismo: zero, 1 – 9 anos e 10 anos ou mais;

Consumo diário de cigarros: zero, 1 – 19, ≥ 20 .

➤ **Critérios citológicos de presença de HPV**

Definidos como presença de coilocitose, ou seja, alterações núcleo-citoplasmáticas em células dos epitélios endocervical, ectocervical e vaginal, obtidas com a utilização da espátula de Ayre e da escova *citobrush*[®]. Foi usada a categorização de presença ou ausência.

➤ **Critérios histopatológicos de presença de HPV**

Definidos como presença de coilocitose, ou seja, alterações núcleo-citoplasmáticas em células dos epitélios endocervical e ectocervical, obtidas a partir da análise histopatológica do fragmento obtido por biópsia excisional dirigida pela colposcopia. Foi usada a seguinte categorização: presença ou ausência

3.6 Métodos

3.6.1 Coleta de dados

Após análise e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (APÊNDICE 1), foram estudadas 228 pacientes, que procuraram atendimento no Setor de Colposcopia do Hospital das Clínicas da UFPE, no período de novembro de 2001 a agosto de 2002.

A abordagem inicial das pacientes, para esclarecimento e obtenção da concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada pela pesquisadora, que também obteve respostas às perguntas contidas no formulário pré-codificado (APÊNDICE 2).

Todos os tubos *Eppendorf* e as lâminas a serem utilizadas para cada paciente foram identificados com suas iniciais, número de registro do Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital das Clínicas – UFPE e data de coleta. Em todo o material de coleta foi omitida a informação relativa ao grupo de estudo a que a paciente pertencia.

A seqüência de exame das pacientes foi: coleta de material para colpocitologia oncótica, coleta de material para identificação de HPV por PCR, colposcopia e biópsia dirigida, nos casos em que os achados colposcópicos a indicavam.

Os exames de colposcopia, colpocitologia oncótica e histopatologia foram realizados por profissionais, que rotineiramente os executam no Hospital das Clínicas – UFPE. Os espécimes cervicais para a pesquisa e identificação do tipo de HPV, por técnica de PCR, foram obtidos pela pesquisadora e adequadamente transportados para processamento no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas. A pesquisa de DNA-HPV por PCR foi realizada por profissionais detentores de experiência técnica e desconhecedores dos resultados dos exames colposcópico, colpocitológico e histopatológico e dos grupos a que as pacientes pertenciam.

Findos esses exames, o aconselhamento pré-teste anti-HIV foi realizado para todas as pacientes que desconheciam sua condição sorológica, seguido da solicitação do teste. Todas as pacientes foram agendadas para retorno, em aproximadamente 30 dias, para conhecimento dos resultados dos exames e aconselhamento pós-teste. As pacientes, que apresentaram sorologia anti-HIV reagente, foram encaminhadas para o ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias, no mesmo hospital. As portadoras de NIC foram encaminhadas para o ambulatório de patologia cervical, para o adequado tratamento ou seguimento.

3.6.2 Coleta do material cervical e padronização das técnicas

Estando a paciente em posição ginecológica e exposto o colo uterino com utilização do espéculo vaginal de Collins, procedeu-se à coleta dos espécimes para os exames colpocitológico e pesquisa de HPV por biologia molecular, seguindo-se a realização da colposcopia, cujos achados foram descritos obedecendo à Classificação da Nomenclatura Internacional dos Aspectos Colposcópicos de Roma (STAFIL, WILBANKS, 1991; WALKER et al., 2003) (ANEXO 1). Nos casos que

apresentavam atipias colposcópicas indicativas de estudo histopatológico, a biópsia foi realizada utilizando-se a pinça de Gaylor-Medina.

3.6.2.1 Colpocitologia oncótica

O material foi obtido em área de ecto e endocérvice, utilizando-se espátula de Ayre e escova do tipo *cytobrush*®, efetuando-se esfregaço em lâmina devidamente identificada. Após fixação em álcool absoluto, as lâminas foram submetidas à coloração pelo método de Papanicolaou e analisadas sob microscopia óptica. Os achados citológicos foram descritos baseados nos critérios do Sistema Bethesda (BEREK, 2003) (ANEXO 2).

3.6.2.2 Pesquisa de HPV por PCR

Descrevem-se a seguir os detalhes das técnicas de amplificação e tipagem de DNA-HPV. Os materiais, os equipamentos, as soluções e seus respectivos preparos encontram-se detalhados no Anexo 3.

➤ Coleta do material para pesquisa de HPV

Com uma segunda escova do tipo *cytobrush*®, o material foi obtido da endocérvice, por meio de movimentos rotatórios de 360°. Em seguida, foi distribuído em solução do tampão TE (Tris-HCl+ácido etileno diaminotetracético em pH 8) por meio da agitação da escova em tubo Eppendorf devidamente identificado, e mantido sob refrigeração a aproximadamente 4°C, até o processamento. As amostras foram transportadas sob refrigeração a $\pm 4^\circ$ C para processamento no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas.

➤ Isolamento do DNA genômico

A amostra de esfregaço cervical de cada paciente foi misturada a 500µL de solução extratora e submetida à agitação em vórtex. Essa solução foi transferida

para uma coluna de *GFX* para eluição. O eluído foi centrifugado por um minuto a 8.000 rpm (5.000g), desprezando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 500µL de solução de lavagem e centrifugado a 14.000rpm por três minutos, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado, ressuspensão em 50µL de água Mille-Q a 70°C, foi novamente eluído. O DNA viral, retido na coluna, foi retirado dela utilizando 50µL de água Mille-Q a 70°C (Figura 3).

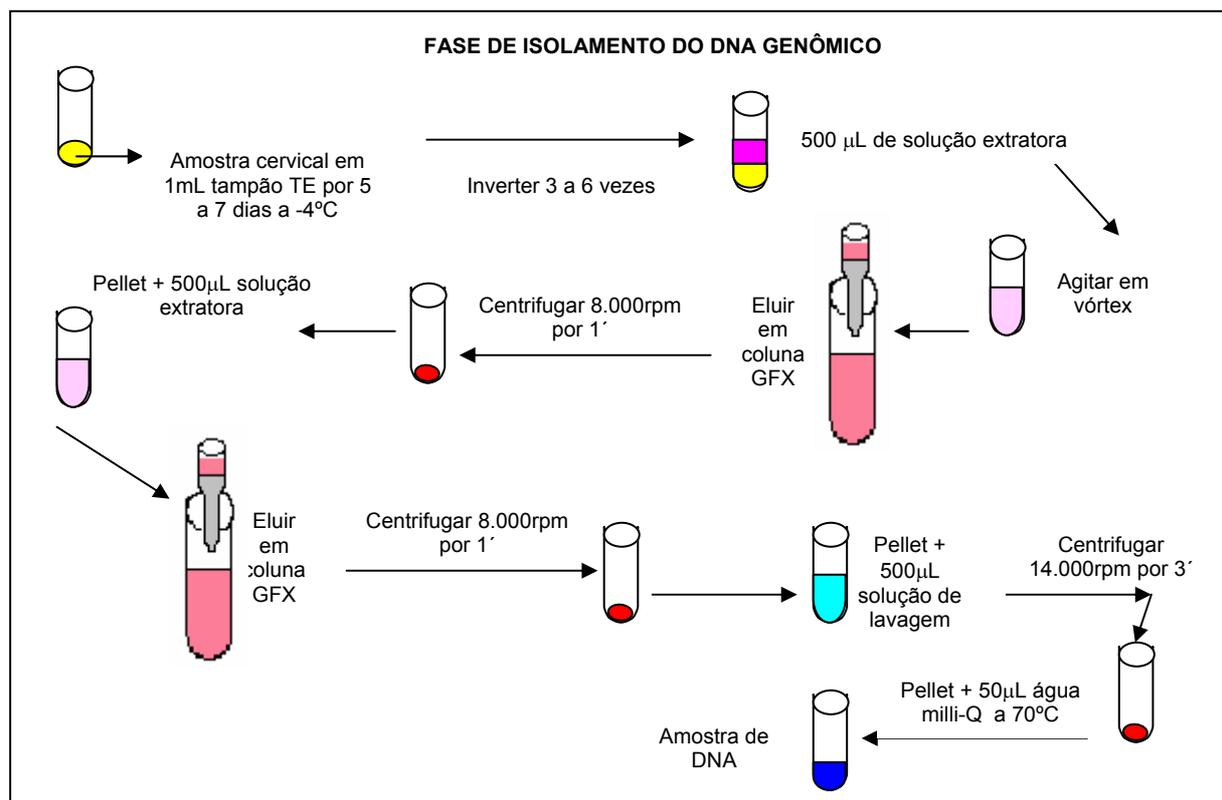


Figura 3 – Esquema da fase de isolamento do DNA genômico

- **Visualização do DNA por meio de eletroforese em gel de agarose**

Para visualização do DNA genômico, foram diluídos 9µL de DNA de cada amostra em 1µL de tampão de corrida, que foram aplicados em gel de agarose a 0,8%, corado com 2µL de brometo de etídio a 10mg/mL, montados em suporte, imerso em solução condutora TBE-1X. Além das amostras, foram aplicados no gel 10µL do marcador de peso molecular de 1.000 pares de bases. Procedeu-se à corrida eletroforética por 30 minutos sob tensão de 5V/cm. O DNA foi visualizado em

transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com sistema digital *Kodak* (Figura 4).

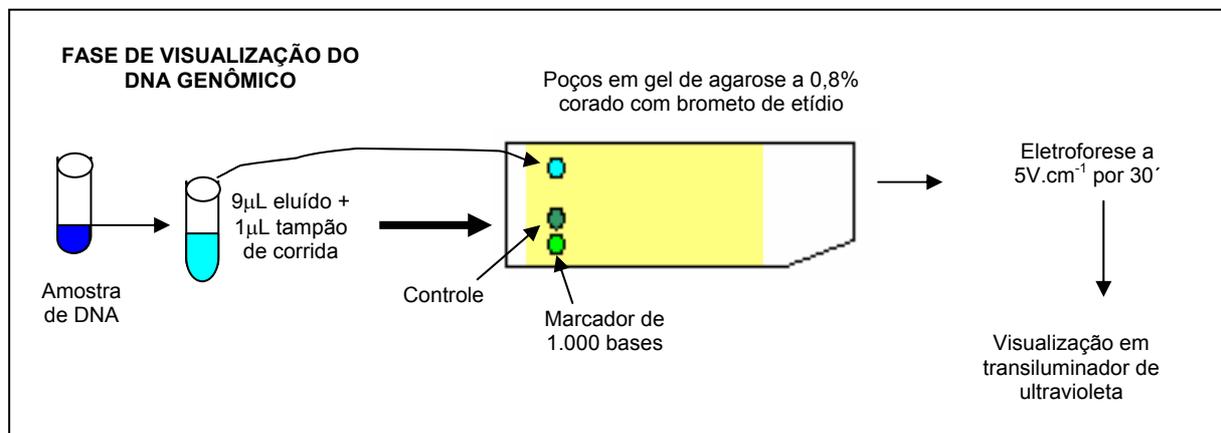


Figura 4 – Esquema da fase de visualização do DNA genômico

➤ Genotipagem do Papilomavirus humano por meio de reação de cadeia de polimerase

A genotipagem consistiu em: amplificação parcial do gene L1 viral por PCR, análise genômica por RFLP, construção dos mapas físicos da região L1, eletroforese dos produtos de digestão enzimática, revelação do eletroforograma por meio de coloração com nitrato de prata, preservação dos géis e registro fotográfico digital.

3.6.3 Amplificação parcial do gene L1 viral por *Polimerase Chain Reaction (PCR)* em Termociclador *Master Cycler Eppendorf*[®]

Os *primers consensus* específicos (TING, MANOS, 1990), sintetizados pela *Life Technologies*TM: MY09 e MY11 foram utilizados na amplificação da região L1 do vírus, tendo as seguintes seqüências: *Primer* MY09: 5'CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC3'; *Primer* MY11: 5'GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG3'.

Os oligonucleotídeos *primers* PC04 e GH20, empregados na amplificação do gene da β -globina humana, tinham seqüências: *Primer* GH20 - 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC3', *Primer* PC04 - 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC3'.

❖ Fundamento da técnica

A amplificação do DNA viral objetiva a obtenção de um filamento completo de 450 pares de bases do gene L1 do genoma viral, utilizando os *primers consensus* MY09 e MY11. Os oligonucleotídeos GH20 e PC04, que amplificam uma região de aproximadamente 268 pares de bases do gene β -globina humana, são utilizados como controle interno, para avaliar a qualidade do DNA das células humanas.

Os ensaios de PCR foram realizados em cinco etapas distintas (Figura 5):

Etapa 1 - desnaturação a 95⁰C por 3 minutos,

Etapa 2 - pareamento dos oligonucleotídeos a 55⁰C por 1 minuto, em 35 ciclos,

Etapa 3 – polimerização das novas fitas de DNA viral a 72⁰C por 1 minuto,

Etapa 4 – desnaturação das fitas duplas a 94⁰C por 30 segundos,

Etapa 5 – extensão final a 72⁰C por 10 minutos

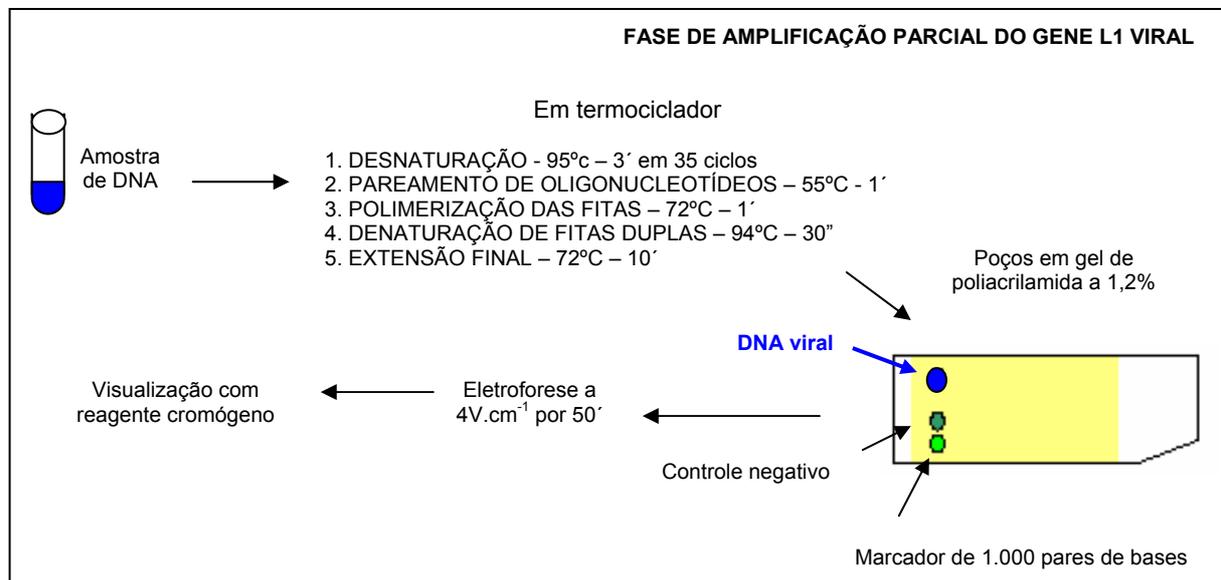


Figura 5 - Esquema da fase de amplificação parcial do gene L1 viral

Foram submetidas às cinco etapas: uma amostra de DNA viral em análise, um controle positivo constituído por amostra comprovadamente positiva para DNA-HPV e um controle negativo composto por todos os reagentes exceto o DNA molde.

O DNA viral amplificado foi aplicado em placa montada de gel de poliacrilamida a 1,2%, corado por brometo de etídio. Procedeu-se à corrida eletroforética a 4V/cm durante 50 minutos em cuba horizontal. Cada gel foi fotografado por meio de máquina *Kodak* digital marca Science™ DC40.

Para a análise genômica por RFLP e construção de mapas físicos da região L1, montou-se uma bateria de oito microtubos de 0,6 mL, rotulados de um a oito, constituída por um tubo de DNA não digerido e sete tubos, cada um contendo uma das seguintes enzimas de digestão: enzima *BamHI*, enzima *DdeI*, enzima *HaeIII*, enzima *Hinfl*, enzima *PstI*, enzima *RsaI* e enzima *Sau3AI*.

As amostras foram então incubadas durante 12 horas a 37° C. Após digestão, a reação foi interrompida pela adição de 0,5µL de tampão de corrida, obtendo-se os fragmentos de DNA por digestão enzimática (*Restriction Fragment Length Polymorfism* - RFLP).

Procedeu-se então à eletroforese dos produtos de digestão enzimática. O gel foi montado em cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE 1X. Cada produto de digestão foi aplicado em poços distintos ao lado de padrões de peso molecular (100pb e φX174pb) e de um controle constituído pela amostra de DNA não digerido. Procedeu-se à corrida eletroforética à 4V/cm, por duas horas, por meio da qual os fragmentos digeridos foram separados.

Finda a eletroforese, o gel foi colocado em solução fixadora, mantendo-se agitação por cinco minutos. Após remoção dessa solução com duas lavagens empregando água Milli-Q, procedeu-se à coloração com nitrato de prata a 0,2%, em agitação constante e suave por 10 minutos. A solução corante foi desprezada e o gel lavado duas vezes em água Milli-Q.

Seguiu-se a revelação da placa, por meio de seu recobrimento com solução reveladora durante 10 minutos, com agitação suave, até a visualização das bandas. A seguir, o gel foi imerso em solução fixadora por dez minutos e, logo após, lavado com água Milli-Q, durante alguns segundos (Figura 6).

Após a retirada dos géis da água, estes foram digitalizados e secos para serem arquivados. A secagem foi obtida colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane incolor, dobrando-se as bandas laterais no lado inferior da placa e eliminando eventuais bolhas. Em seguida, o gel foi desidratado à temperatura

ambiente durante 24 horas. Após a secagem, o material foi anexado ao livro de registro para consultas posteriores.

A eletroforese dos fragmentos de digestão por endonucleases de restrição produziu mapas genéticos característicos de cada um dos tipos virais estudados, os quais foram documentados com sistema fotográfico digital *Kodak*, na forma de arquivos *jpeg*, e comparados com os mapas de restrição dos diferentes tipos de HPV já conhecidos (BERNARD et al, 1994). As comparações foram realizadas em função do tamanho dos fragmentos de DNA polimórfico, gerados pelos RFLP (Figura 7).

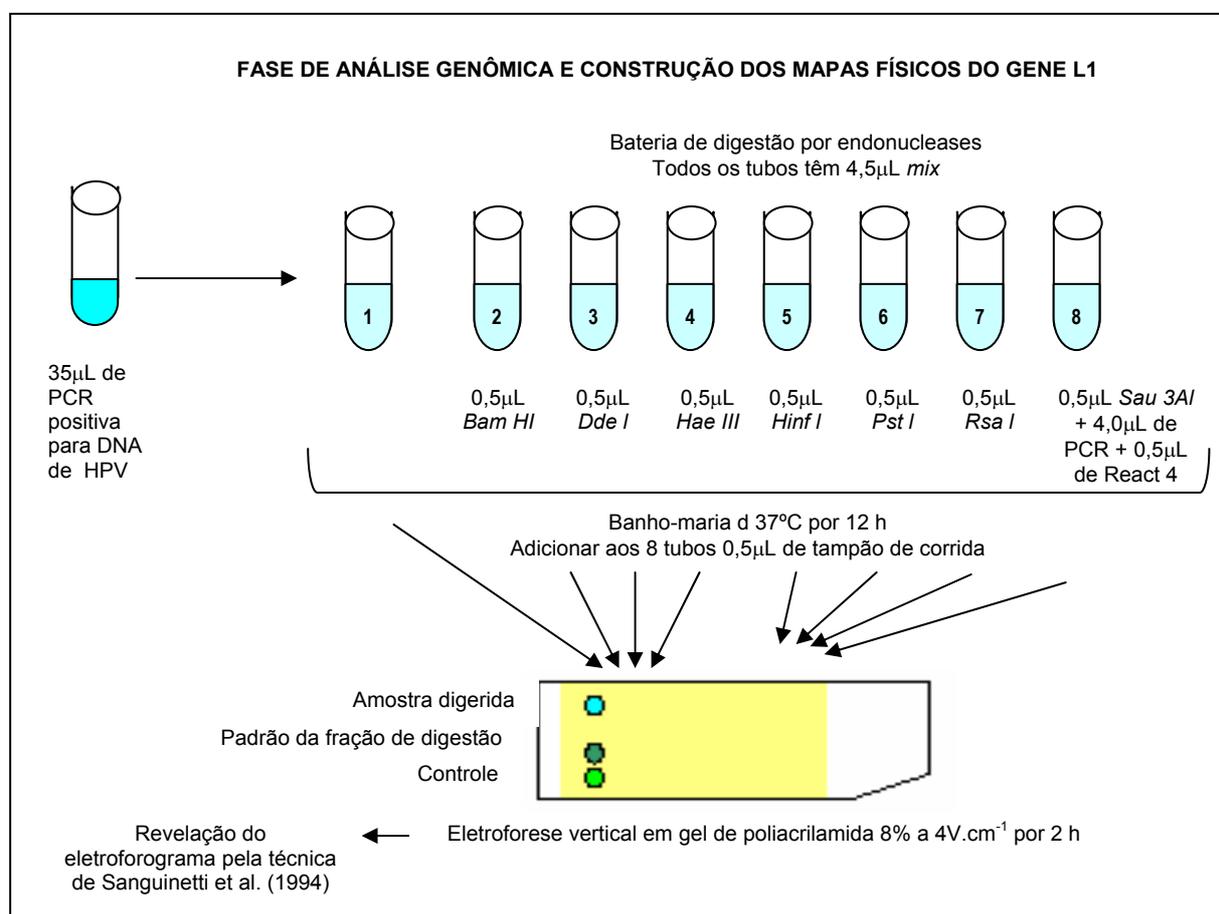


Figura 6 – Esquema da fase de análise genômica e construção dos mapas físicos do gene L1

Foram consideradas positivas para HPV, as amostras nas quais identificou-se amplificação do gene L1 com os *primers* utilizados, e negativas para HPV aquelas nas quais houve positividade exclusivamente à amplificação com *primers* para β -globina humana. Algumas amostras, que apresentaram padrão indeterminado pela RFLP, foram submetidas ao seqüenciamento genético (Figura 8).

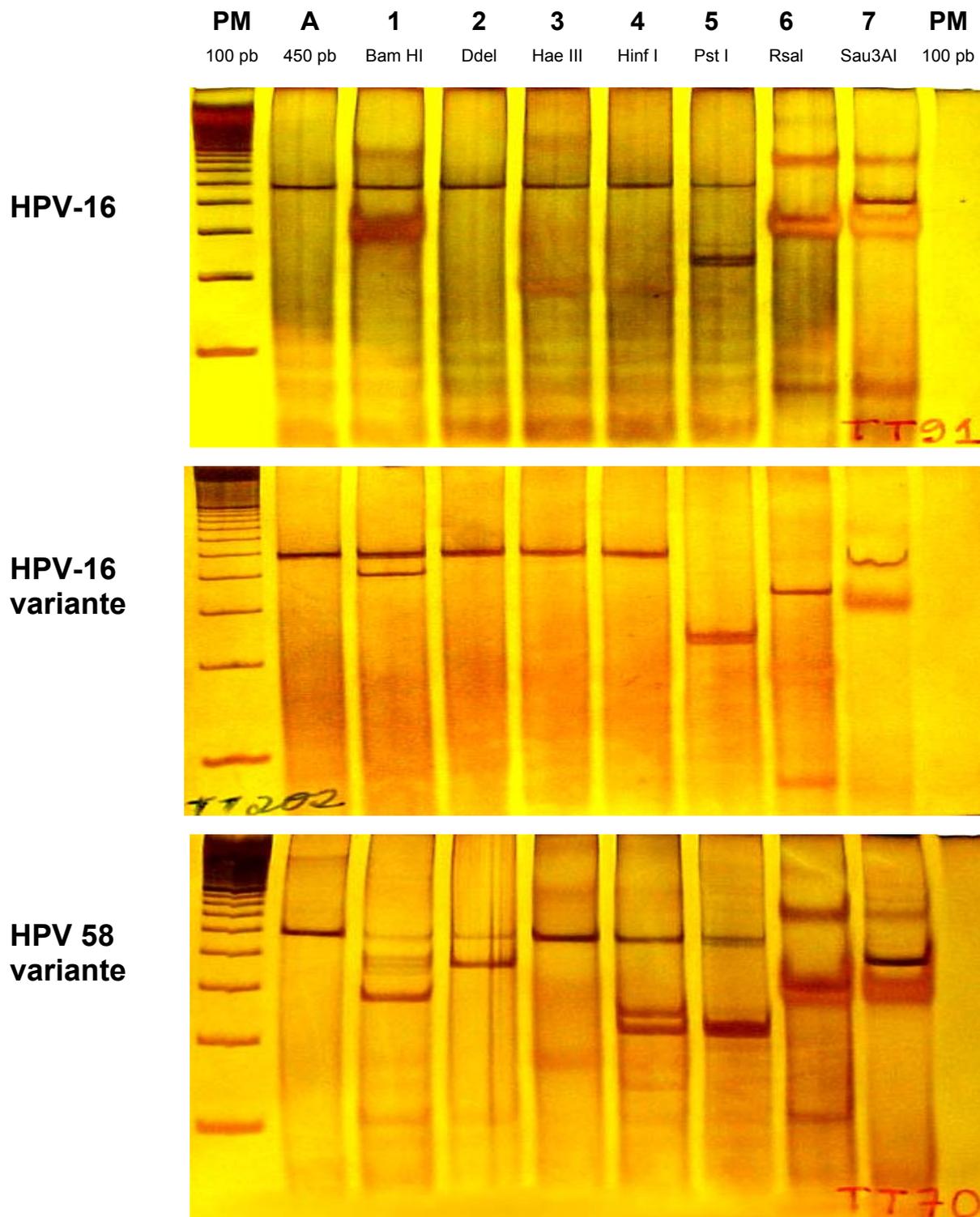


Figura 7 – Análise por polimorfismo de fragmentos de restrição RFLP, visualizados em gel de poli-acrilamida dos produtos de PCR na região L1 do *Papilomavirus* humano

➤ Seqüenciamento automatizado

Para facilidade de compreensão dos diversos passos técnicos que compuseram o seqüenciamento do DNA viral, elaborou-se a Figura 8.

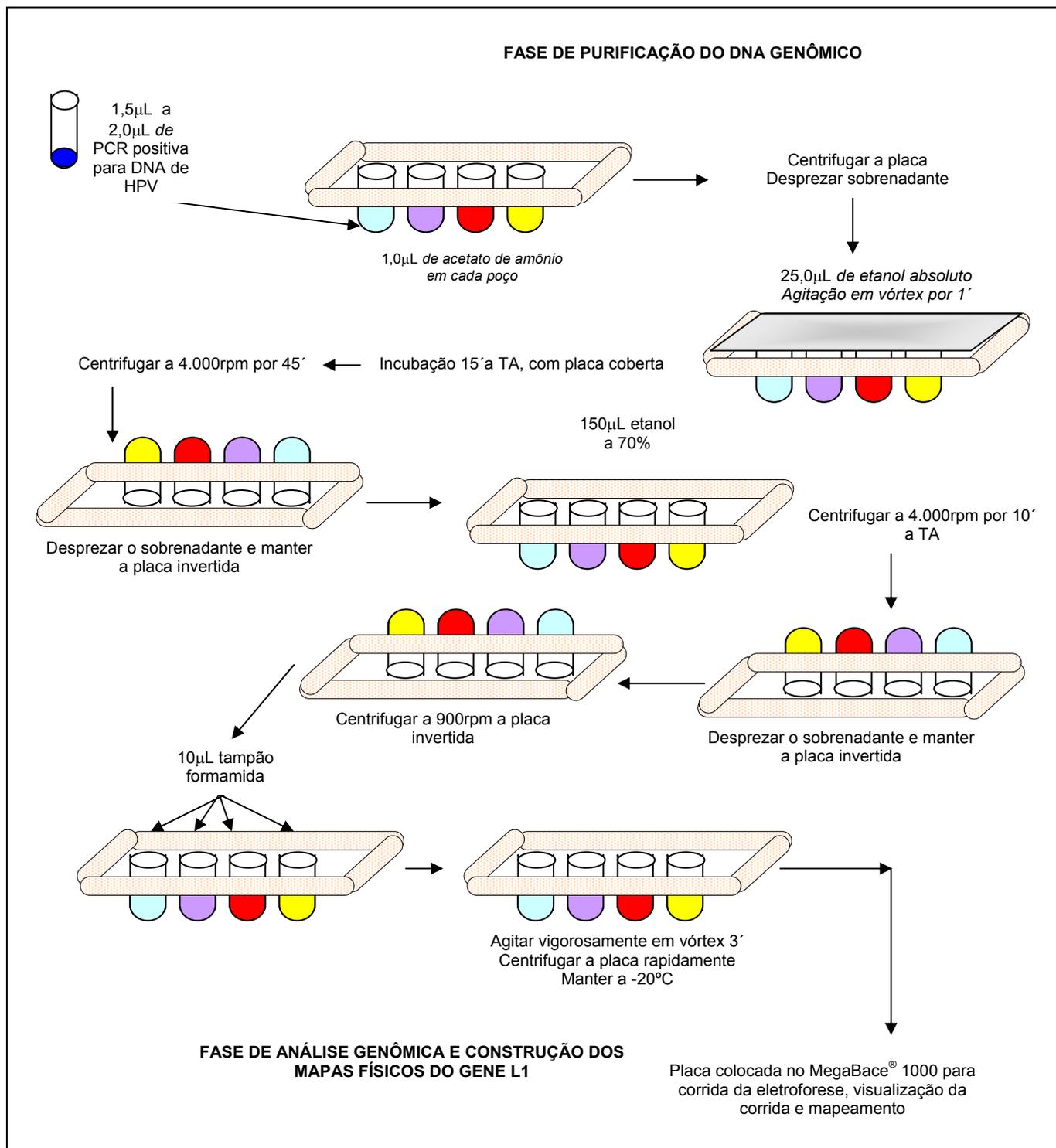


Figura 8 – Esquema de seqüenciamento automático do segmento de DNA da região L1 de HPV

Os produtos de PCR positivos para HPV, porém com resultado indeterminado pela RFLP, foram submetidos às seguintes etapas para seqüenciamento:

- Purificação - com a finalidade de retirar nucleotídeos, enzimas e outras impurezas provenientes da própria reação de PCR

A 1,5 μ L de solução de DNA viral, acrescentaram-se 0,15 μ L de acetato de amônio realizando centrifugação rápida, para precipitar o sal de acetato. Seguiu-se adição de 3,75 μ L de etanol absoluto, procedendo-se à centrifugação a 4.000rpm durante 45'. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 4.000rpm por 10'. Procedeu-se ao escoamento do sobrenadante por inversão suave, seguida por centrifugação a 900rpm com a placa invertida. O precipitado foi ressuspensão em 1,5 μ L de água Milli-Q e por agitação da placa em vórtex por 3'. A solução foi conservada a -20°C.

- Amplificação para incorporação dos cromóforos

A cada poço da placa, acrescentaram-se 0,8 μ L de oligonucleotídeo MY09 ou MY11 e 8,0 μ L de mix. A microplaca foi vedada com selante, centrifugada rapidamente para homogeneizar a solução e colocada em termociclador, para reação em 35 ciclos, respeitados sucessivos tempos e temperaturas: 95°C por 2", 95°C por 10", 50°C por 15", 60°C por 1', 4°C por tempo indeterminado.

- Precipitação do produto de PCR

A 1,5 μ L de solução de DNA viral, acrescentou-se 1,0 μ L de acetato de amônio, realizando centrifugação rápida, para precipitar o sal de acetato. Seguiu-se adição de 2,5 μ L de etanol absoluto, com posterior agitação em vórtex por 1'. Incubou-se por 15' à temperatura ambiente com a placa coberta com papel aluminizado; centrifugou-se a 4.000rpm durante 45'. Após desprezar o sobrenadante por inversão, o precipitado foi lavado com 150 μ L de etanol a 70% e centrifugado a 4.000rpm por 10' a temperatura ambiente. Procedeu-se ao escoamento do sobrenadante por inversão suave, seguida por centrifugação a 900rpm com a placa invertida. O precipitado foi ressuspensão em 10 μ L de tampão formamida por agitação

da placa em vórtex por 3', seguindo-se centrifugação a 900rpm e conservação da placa a -20°C.

- Eletroforese das amostras

Inicialmente procedeu-se à calibração do MegaBace[®] 1000, hidratando os capilares com água Milli-Q e os colocando no anodo, para que a água injetada sob alta pressão, vazasse para o catodo. Nesse procedimento foi calibrado o volume ejetado, assim como foram determinados os parâmetros físicos e químicos da corrida eletroforética.

- Obtenção dos dados

Por meio de sistema computadorizado, o aparelho MegaBace[®] 1000 procedeu à injeção das amostras a serem seqüenciadas, à visualização da eletroforese, permitindo a obtenção dos dados, e à análise por similaridade BLAST, por meio de alinhamento local das seqüências de nucleotídeos, com seqüências similares disponíveis no banco de dados genético internacional (NCBI, 2003).

- Análise das seqüências de nucleotídeos

A otimização das seqüências foi realizada por meio da comparação das seqüências complementares obtidas com os dois *primers*. A análise dos picos do eletroforograma permitiu a confirmação das bases nitrogenadas incertas.

3.6.3.1 Colposcopia

Foi utilizado o colposcópico de marca INAMI[®]. Inicialmente foi colocada solução fisiológica a 0,9% para inspeção cervical. A seguir, fez-se uma embebição do colo do útero com solução de ácido acético a 3%, para delimitação e caracterização das áreas acetorreagentes anormais, localização da JEC e da zona de transformação. Por fim, com utilização do lugol, foi realizado o teste de Schiller.

A biópsia dirigida, quando indicada, foi realizada com a pinça de Gaylor-Medina. As descrições das imagens colposcópicas obedeceram à classificação da nomenclatura internacional dos aspectos colposcópicos de Roma (STAFI,

WILBANKS, 1991), referendada pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (WALKER et al., 2003) (ANEXO 1).

3.6.3.2 Histopatologia

Logo após a realização da biópsia dirigida pela colposcopia, os fragmentos cervicais foram colocados em vidros devidamente identificados, contendo solução de formalina a 10%. Os fragmentos fixados foram desidratados com álcool etílico, diafanizados pelo xilol e incluídos em blocos de parafina, com utilização de processador manual. Obtiveram-se cortes histológicos para cada caso, com utilização de micrótomo ajustado para cinco micrômetros.

Feita a montagem em lâmina de vidro identificada, utilizou-se coloração pela hematoxilina-eosina, sendo as lâminas analisadas sob microscopia óptica. Para o diagnóstico de NIC, foram considerados os critérios descritos por Richart (1990) e os critérios baseados no Sistema Bethesda (BEREK, 2003).

3.7 Análise estatística

Numa fase inicial da análise, foi verificada a associação de cada variável com presença de neoplasia intra-epitelial cervical. A magnitude dessa associação foi expressa através da razão dos produtos cruzados (*Odds Ratio*), tomando como valor de referência a categorização considerada risco para NIC na literatura consultada. Para avaliar a significância estatística dos resultados encontrados, utilizou-se o intervalo de confiança dos *Odds Ratio* estimados e o teste do *qui quadrado* com correção de Yates ou de Fisher, quando indicado, sendo considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

A partir da identificação das variáveis independentes, cuja associação com presença de NIC foi estatisticamente significativa na análise bivariada, realizou-se análise multivariada, utilizando regressão logística múltipla, que permite controlar o efeito de cada um dos fatores de risco pelos demais. O modelo foi inicialmente saturado com a inclusão de todas as variáveis. A retirada, passo a passo, de cada

variável do modelo proposto foi testada e seu significado expresso pelo valor de p com teste de máxima verossimilhança. As variáveis associadas à presença de NIC, mesmo quando controladas pelas demais, permaneceram no modelo final.

As categorias de variáveis independentes, quando maiores que duas, foram agrupadas para garantir maior estabilidade estatística dos resultados.

Foi utilizado o programa de análise estatística Epi-Info 2002 revisão 1, de novembro de 2002, para análise univariada, cálculo de médias, distribuição de freqüências, determinação de acurácia da colpocitologia em relação à histopatologia (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo), preparo dos dados para a análise multivariada e para regressão logística múltipla.

Os intervalos de confiança de 95% foram estimados a partir do anti-logaritmo dos valores obtidos através das fórmulas 1 e 2:

$$IC (LI)=\beta - (1,96. EP)$$

onde:

IC (LI): limite inferior do intervalo de confiança

EP: erro padrão

β : logaritmo neperiano do *odds ratio*

Fórmula 1 –Cálculo do limite inferior do intervalo de confiança do erro padrão da estimativa

$$IC (LS)= \beta + (1,96. EP)$$

onde

IC (LS): limite superior do intervalo de confiança

EP: erro padrão

β : logaritmo neperiano do *odds ratio*

Fórmula 2 –Cálculo do limite superior do intervalo de confiança do erro padrão da estimativa

Foi utilizado o teste Kappa para análise da concordância entre os diagnósticos morfológicos de presença de infecção por HPV feitos pela colpocitologia e pela histopatologia e a identificação do DNA-HPV realizada mediante a PCR-RFLP, cuja interpretação obedeceu aos critérios expostos no Quadro I.

Quadro I – Critério de interpretação dos valores de Kappa

<i>KAPPA</i>	<i>CONCORDÂNCIA</i>
< 0,00	ruim
0,00 – 0,20	fraca
0,21 – 0,40	sofrível
0,41 – 0,60	regular
0,61 – 0,80	boa
0,81 – 0,99	ótima
1,00	perfeita

3.8 Aspectos éticos

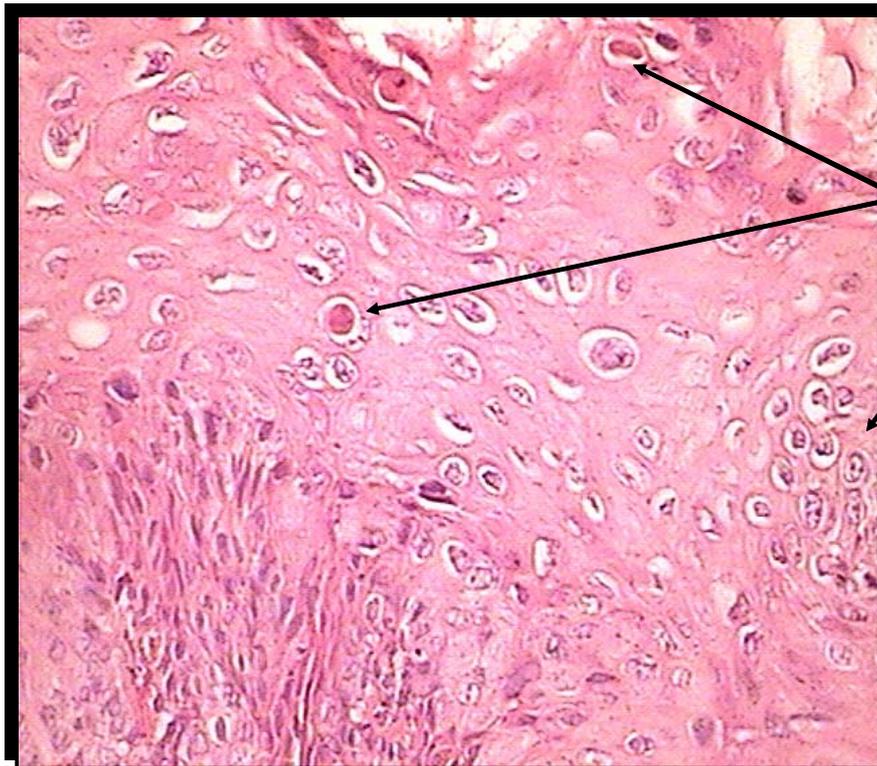
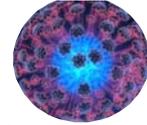
O projeto de estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, registrado sob número 195/2000, tendo sido aprovado sem pendência em 05 de dezembro de 2000 (APÊNDICE 1).

Ao serem convidadas a participar da pesquisa, todas as pacientes foram informadas sobre os objetivos, tendo-lhes sido esclarecido que, caso não concordassem em participar, ser-lhes-ia assegurado o direito de receber o mesmo atendimento e o tratamento, quando necessário. Foi-lhes também assegurado que seria mantido o sigilo quanto a sua identidade, não sendo mencionado nome, número de registro ou qualquer outra forma de identificação da paciente, em toda e qualquer publicação a ser elaborada com esses dados.

Para as que concordaram em participar, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme preceitua a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, em concordância com a Declaração de Helsinki VI, aprovada em 1996 em Hong-Kong e referendada em 2000 na Bélgica.

Os dados serão mantidos por cinco anos na posse da pesquisadora para eventuais comprovações.

Microfotografia
do HPV

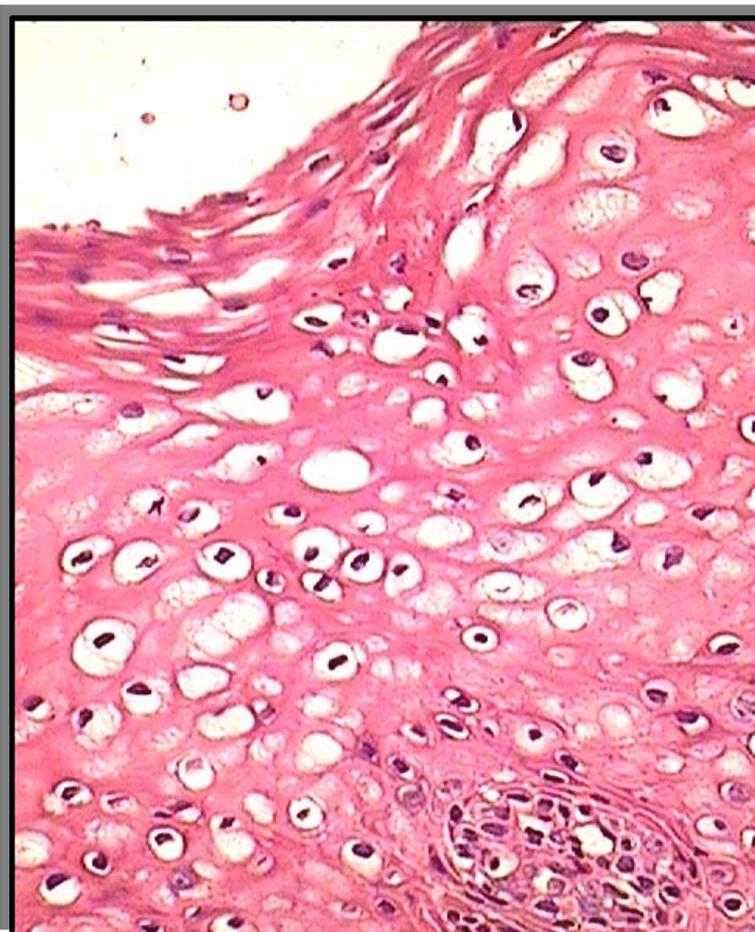


Disqueratose

Coilocitose

HE 400X – Lesão
escamosa de alto grau
HPV induzida

Células
disqueratóticas em
necrose com núcleo
picnótico ou em lise



Vacúolos glicogenados,
situados nas camadas
intermediária e superficial

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
COM COILÓCITO**

- Os núcleos são uniformes e
pequenos, rodeados por halo
citoplasmático, com contorno
definido

4 RESULTADOS

A apresentação dos resultados obedeceu à seqüência: caracterização amostral e verificação de associação entre a presença de NIC e características biológicas, reprodutivas, hábitos e infecção pelo HPV.

Foram estudadas as seguintes variáveis: idade, estado civil, grau de instrução; idade da primeira relação sexual, método contraceptivo utilizado, número de gestações, número de parceiros sexuais, referência de qualquer DST anterior e a infecção pelo HPV. Seguiu-se a análise de associação entre infecção pelo HPV e demais variáveis independentes e, subseqüentemente, a análise multivariada. Finalmente foram apresentados os resultados da biologia molecular, colposcopia, colpocitologia e histopatologia.

4.1 Caracterização da análise de associação entre NIC e potenciais fatores de risco

Na distribuição etária amostral dos grupos em estudo, observou-se variação de 18 a 50 anos, com média igual a $34,0 \pm 8,3$ anos e moda de 38 anos. Os limites inferiores dos intervalos de idade igualaram-se a 19 e 18 anos, respectivamente nos grupos caso e controle, ao passo que o limite superior foi 50 anos para ambos. A média etária dos controles foi semelhante à dos casos, alcançando valor de $34,3 \pm 8,5$ anos, contra $33,8 \pm 8,2$ anos. Cinquenta por cento das pacientes do grupo caso tinham idade maior que 34 anos, e as do grupo controle, maior que 33 anos. As pacientes dos grupos caso e controle apresentaram predomínio de idade entre 30 a 39 anos (em 40,2% dos casos e 35,4% dos controles, respectivamente) (Tabela 1).

Quanto ao estado civil, houve maior número de mulheres casadas, em ambos os grupos, seguindo-se em freqüência as solteiras, e a distribuição de viúvas e separadas foi semelhante em ambos os grupos (Tabela 1).

Quanto ao grau de instrução, 22% dos casos e 9,4% dos controles possuíam nenhuma ou grau de instrução elementar, sendo a diferença estatisticamente significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Associação entre NIC e características biossociais em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

CARACTERÍSTICAS AMOSTRAIS	GRUPOS				OR	IC 95%	p
	caso		controle				
	n	%	n	%			
grupo etário (anos)							0,88
10 – 29	46	34,8	33	34,4	1,00		
30 – 39	53	40,2	34	35,4	1,12	0,60-2,08	0,57
40 – 59	33	25,0	29	30,2	0,82	0,42-1,60	0,67
estado civil							0,84
casada	63	47,7	46	47,9	1,00		
solteira	53	40,2	36	37,5	1,07	0,61-1,90	0,92
viúva ou separada	16	12,1	14	14,6	0,83	0,37-1,88	0,82
grau de instrução							0,02
sem instrução ou elementar fundamental a superior	29	22,0	9	9,4	1,00		
	103	78,0	87	90,6	0,37	0,17-0,82	

Na Tabela 2, estão expressas as características reprodutivas das 228 pacientes estudadas, referentes a idade ao primeiro coito, número de gestações, número de parceiros sexuais, método contraceptivo utilizado e referência a qualquer DST anterior.

Em ambos os grupos houve maior freqüência de mulheres com idade ao primeiro coito entre 10 e 19 anos, sendo a chance de desenvolver NIC três vezes mais elevada nesse grupo, quando comparado com o grupo que teve o primeiro coito entre 20 e 30 anos. As médias etárias da primeira relação sexual igualaram-se a $17,2 \pm 3,4$ anos, $16,5 \pm 2,9$ anos e $18,2 \pm 3,8$ anos, para as 228 pacientes, as do grupo caso e do grupo controle, respectivamente. Os limites de idade corresponderam a 12 a 30 anos, para a amostra e para o grupo controle, enquanto que no grupo caso os limites inferior e superior igualaram-se a 12 anos e 29 anos, respectivamente.

Identificou-se que mais freqüentemente as mulheres do grupo caso eram multigestas e as do grupo controle, paucigestas, sendo a diferença quanto ao número de gestações estatisticamente significativa (Tabela 2).

Constatou-se ter havido de um a dois parceiros sexuais em 50,8% e 64,6% das pacientes do grupo caso e controle, respectivamente. No entanto o relato de três ou mais parceiros sexuais foi mais freqüente entre aquelas pertencentes ao grupo caso (Tabela 2).

Tabela 2 – Associação entre NIC e características reprodutivas em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS	GRUPOS				OR	IC 95%	p
	caso		controle				
	n	%	n	%			
idade ao primeiro coito							0,00
20 – 30	17	12,9	30	31,2	1,00		
10 – 19	115	87,1	66	68,8	3,07	1,58-5,99	
número de gestações							0,17
nuligesta	11	8,3	13	13,5	1,00		
primigesta	20	15,2	16	16,7	1,48	0,52-4,17	0,64
paucigesta	49	37,1	42	43,8	1,38	0,56-3,40	0,64
multigesta	52	39,4	25	26,0	2,46	0,97-6,26	0,09
número de parceiros sexuais							0,03
1 – 2	67	50,8	62	64,6	1,00		
3 ou mais	65	49,2	34	35,4	1,77	1,03-3,04	
método contraceptivo utilizado							0,12
nenhum	33	25,0	33	34,4	1,00		
não hormonal	67	50,8	49	51,0	1,37	0,75-2,51	0,39
hormonal	32	24,2	14	14,6	2,29	1,04-5,05	0,06
referência de DST anterior							0,00
não	63	47,7	66	68,8	1,00		
sim	69	52,3	30	31,2	2,41	1,39-4,18	
soropositividade HIV							0,00
não	114	86,4	65	67,7	1,00		
sim	18	13,6	31	32,3	3,02	1,57-5,82	

Quanto ao uso de método contraceptivo, 66 (28,9%) mulheres negaram-no, estando 50% distribuídas em cada um dos grupos. Dentre as 162 (71,1%) usuárias de algum método, 99 (61,1%) eram do grupo caso e 63 (38,9%) do controle (Tabela 2).

A referência de antecedente de doença sexualmente transmissível, anterior à pesquisa, foi mais freqüente nas pacientes do grupo caso, sendo a chance de apresentar NIC aproximadamente duas vezes maior no grupo com antecedente de DST (Tabela 2).

Considerando a distribuição de soropositividade para HIV nos grupos em estudo, detectou-se que no grupo controle houve maior número de pacientes soropositivas, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo caso (32,3% e 13,6, respectivamente) (Tabela 2).

Distribuídas as pacientes segundo hábito de fumar, verificou-se que a maioria não era tabagista, independentemente do grupo a que pertencia, no entanto as fumantes estiveram concentradas no grupo caso. A chance de desenvolver NIC foi cinco vezes maior no grupo de fumantes, quando comparado ao de não fumantes. Também observou-se uma associação entre NIC, o tempo de tabagismo e o número de cigarros consumidos por dia. Das 72 mulheres tabagistas, independentemente de ser grupo caso ou controle, 50 (60,4%) fumavam por tempo igual ou superior a 10 anos e 41 (55,9%) consumiam 20 cigarros ou mais por dia (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição de 132 casos e 96 controles conforme tempo de tabagismo e consumo diário de cigarros – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

CARACTERÍSTICAS DO TABAGISMO	GRUPOS				OR	IC 95%	p
	caso		controle				
	n	%	n	%			
tabagismo							0,00
não	73	55,3	83	86,5	1,00		
sim	59	44,7	13	13,5	5,16	2,62-10,16	
tempo de tabagismo (anos)							0,75
1 – 9	18	30,5	4	30,8	1,00		
≥ 10	41	69,5	9	69,2	1,01	0,28-3,72	
consumo diário de cigarros							0,95
1 – 19	26	44,1	5	38,5	1,00		
≥ 20	33	55,9	8	61,5	0,79	0,23-2,71	

A partir dos dados da Tabela 4, identificou-se que a chance de mulheres com HPV de alto risco oncogênico, determinado por PCR, desenvolverem NIC foi treze vezes maior no grupo caso que no controle, ao passo que a não identificação do HPV foi mais freqüente entre aquelas do grupo controle.

Tabela 4 – Associação entre NIC e o risco oncogênico do HPV, determinado por PCR, em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

RISCO ONCOGÊNICO DO HPV	GRUPOS				OR	IC 95%	p
	caso		controle				
	n	%	n	%			
ausente	68	51,5	82	85,4	1,00		0,00
alto	44	33,3	4	4,2	13,26	4,54-38,78	0,00
baixo ou intermediário	20	15,2	10	10,4	2,41	1,06-5,50	0,03

4.2 Análise de associação entre infecção pelo HPV e demais variáveis independentes

Determinadas as variáveis significantes, que se associavam à variável dependente, ou seja, à presença de NIC, foram analisadas as associações entre a exposição principal, positividade para DNA-HPV e potenciais fatores de confusão, conforme consta das Tabelas 5, 6 e 7.

Identificou-se predomínio de HPV de risco oncogênico intermediário entre as pacientes mais jovens e de risco oncogênico alto, entre aquelas com idade entre 30 e 39 anos. Em relação ao estado civil, a presença de HPV de alto risco oncogênico foi observada nas pacientes casadas e solteiras, enquanto que aqueles de risco oncogênico intermediário predominaram entre as casadas. Quanto ao nível de instrução, observou-se entre aquelas que o relataram como fundamental a superior maior freqüência de HPV de risco oncogênico alto ou intermediário (Tabela 5).

Tabela 5 – Associação entre risco oncogênico de HPV e características biossociais em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

VARIÁVEIS DE CONFUNDIMENTO DE CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL	RISCO ONCOGÊNICO						TOTAL	TESTES ESTATÍSTICOS
	ausente		alto		intermediário			
	n	%	n	%	n	%		
faixas etárias								
10 – 29	47	31,3	19	39,6	13	43,3	79	$\chi^2=5,77$, p=0,22
30 – 39	55	36,7	21	43,7	11	36,7	87	
40 – 59	48	32,0	8	16,7	6	20,0	62	
estado civil								
casada	73	48,7	19	41,3	17	56,7	109	$\chi^2=2,85$ p=0,24
solteira	61	40,6	19	41,3	7	23,3	87	
viúva - separada	16	10,7	8	17,4	6	20,0	30	
nível de instrução								
sem instrução ou elementar	21	14,0	13	27,1	4	13,3	38	$\chi^2=4,76$ p=0,09
fundamental a superior	129	86,0	35	72,9	26	86,7	190	

Quanto à idade ao primeiro coito, predominou HPV de risco oncogênico alto ou intermediário entre as pacientes que iniciaram atividade sexual entre 10 e 19 anos, assim como entre as multigestas e aquelas que utilizavam método contraceptivo não hormonal. Quanto ao número de parceiros sexuais, identificou-se maior freqüência de HPV de risco oncogênico intermediário entre as pacientes que

referiram um a dois parceiros. Houve freqüência estatisticamente significativa do HPV de alto risco oncogênico entre as pacientes que referiram doença sexualmente transmissível, anterior à pesquisa. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição da soropositividade para HIV quanto ao risco oncogênico (Tabela 6).

Tabela 6 – Associação entre risco oncogênico e características reprodutivas em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DE CONFUNDIMENTO	RISCO ONCOGÊNICO						TOTAL	TESTES ESTATÍSTICOS
	ausente		alto		intermediário			
	n	%	n	%	n	%		
idade ao primeiro coito								$\chi^2 = 2,45$
20 – 30	34	22,7	6	12,5	7	23,3	47	p=0,29
10 – 19	116	77,3	42	87,5	23	76,7	181	
número de gestações								$\chi^2 = 3,22$
nuligesta	17	11,3	2	4,2	5	16,7	24	p=0,36
primigesta	21	14,0	7	14,6	8	26,7	36	
paucigesta	65	43,3	19	39,5	7	23,3	91	
multigesta	47	31,3	20	41,7	10	33,3	77	
número de parceiros sexuais								$\chi^2 = 1,44$
1 – 2	86	57,3	24	50,0	19	63,3	129	p=0,49
3 ou mais	64	42,7	24	50,0	11	36,7	99	
método contraceptivo utilizado								$\chi^2 = 4,35$
nenhum	44	29,3	11	22,9	11	36,7	66	p=0,36
não hormonal	80	53,4	23	47,9	13	43,3	116	
hormonal	26	17,3	14	29,1	6	20,0	46	
referência de DST anterior								$\chi^2 = 10,03$
não	95	63,3	18	37,5	16	53,3	129	p=0,01
sim	55	63,7	30	63,5	14	46,7	98	
soropositividade HIV								$\chi^2 = 0,49$
não	117	78,0	37	77,1	25	83,3	179	p=0,78
sim	33	21,0	11	22,9	5	16,7	49	

Houve maior número de casos de HPV de risco oncogênico alto ou intermediário entre as pacientes que eram tabagistas e, dentre essas, aquelas que fumavam há 10 anos ou mais, assim como entre as que declararam fumar 20 cigarros ou mais por dia (Tabela 7).

Tabela 7 – Risco oncogênico de HPV e tabagismo em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001- Agosto 2002

VARIÁVEIS DE CONFUNDIMENTO SOBRE TABAGISMO	RISCO ONCOGÊNICO						TOTAL	TESTES ESTATÍSTICOS
	ausente		alto		intermediário			
	n	%	n	%	n	%		
tabagismo								
não	110	73,3	23	47,9	23	76,7	156	$\chi^2 = 11,96$
sim	40	26,7	25	52,1	7	23,3	72	$p < 0,01$
tempo de tabagismo								
1 a 9 anos	11	27,5	11	44,0	-		22	$\chi^2 = 0,40$
10 ou mais	29	72,5	14	56,0	7	100,0	50	$p = 0,53$
consumo diário de cigarros								
< 20	17	43,6	12	48,0	2	28,6	31	$\chi^2 = 0,00$
≥ 20	22	56,4	13	52,0	5	71,4	40	$p = 0,99$

4.3 Análise multivariada

Para a análise multivariada, foram incluídas no modelo todas as variáveis que, na análise bivariada, apresentaram um valor de p menor que 0,20, quais sejam: grau de instrução, idade ao primeiro coito, número de gestações, número de parceiros sexuais, método contraceptivo utilizado, referência de DST anterior, soropositividade HIV, tabagismo e risco oncogênico.

O modelo foi inicialmente saturado com a inclusão de todas as variáveis, testando-se a significância estatística de retirada de cada uma delas. O modelo final está representado na Tabela 8.

Identificaram-se como fatores de risco para NIC, em ordem decrescente de grandeza, risco oncogênico do HPV, referência de DST anterior, idade ao primeiro coito e tabagismo. A soropositividade para HIV constituiu-se em fator de proteção para NIC (Tabela 8).

Tabela 8 –Odds Ratios ajustados e intervalos de confiança da associação entre NIC e demais variáveis: risco oncogênico, referência de DST anterior, idade ao primeiro coito, tabagismo e soropositividade HIV, em pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

FATORES DE RISCO	ODDS RATIOS AJUSTADOS E INTERVALOS DE CONFIANÇA	
	Odds Ratio ajustado	IC 95%
risco oncogênico		
não	1,00	
sim	12,32	3,79 – 40,08
referência de DST anterior		
não	1,00	
sim	8,23	2,82 – 24,04
idade ao primeiro coito		
20 – 30	1,00	
10 – 19	4,00	1,70 – 9,39
tabagismo		
não	1,00	
sim	3,94	1,73 – 8,98
soropositividade HIV		
não	1,00	
sim	0,04	0,01 – 0,13

4.4 Caracterização dos resultados de biologia molecular, colpocitologia, colposcopia e histopatologia

Considerada a distribuição amostral do presente estudo, a positividade para DNA-HPV igualou-se a 34,2%, correspondentes a 78 amostras, nas quais identificaram-se diversos tipos de HPV pela técnica de PCR/RFLP. No grupo caso, em 64 das 132 pacientes houve positividade, e no grupo controle, em 14 das 96 pacientes, o que correspondeu a taxa igual a 48,5% e 14,6%, respectivamente (Tabela 9).

Das 78 amostras positivas para DNA-HPV, 64 (82,1%) integravam o grupo caso e 14 (17,9%) eram do grupo controle (Tabela 9).

No grupo caso, dentre os diversos tipos identificados, houve predomínio do HPV-16 ou variante 16 (30 casos \Rightarrow 46,9%). O HPV-16 foi tipo único em 18 (60%)

amostras e esteve associado a outros tipos em três (10%); a variante do mesmo tipo viral foi identificada em nove (30%) pacientes. Houve 15 (23,4%) casos, nos quais, apesar da positividade do DNA-HPV e da tentativa de seqüenciamento, o tipo viral não pode ser determinado (Tabela 9).

No grupo controle, o HPV-16 e a variante 16 estiveram ausentes. Houve nove (64,3%) amostras nas quais não se pode tipar o HPV, no entanto, dentre as amostras com HPV tipado, quatro (28,6%) eram de alto risco oncogênico e uma (7,1%) de baixo risco (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição das 78 amostras segundo tipo de HPV identificado por PCR/RFLP por grupos de pesquisa– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

TIPO DE HPV	GRUPO				TOTAL	
	caso		controle		n	%
	n	%	n	%		
HPV 58+indeterminado	1	1,6	-	-	1	1,3
CP 141/LVX	1	1,6	1	7,1	2	2,5
HPV 13	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV-16	18	28,1	-	-	18	23,1
HPV-16 13	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV-16 53	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV-16 67	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV 18 35	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV 33	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV 35	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV 51	-	-	1	7,1	1	1,3
HPV 58	2	3,0	-	-	2	2,5
HPV 83	1	1,6	-	-	1	1,3
HPV 83 52	2	3,0	-	-	2	2,5
indeterminado	15	23,4	9	64,3	24	30,8
VAR 16	9	14,0	-	-	9	11,5
VAR 33	1	1,6	-	-	1	1,3
VAR 44	1	1,6	-	-	1	1,3
VAR 51	2	3,0	2	14,4	4	5,1
VAR 58	3	4,7	1	7,1	4	5,1
VAR 83	1	1,6	-	-	1	1,3
TOTAL	64	100,0	14	100,0	78	100,0

Considerando a presença de HPV-16 ou variante 16, para o grupo caso, identificou-se ter sido mais freqüente a presença desse tipo viral nas pacientes com NIC 2 ou NIC 3, que naquelas com NIC 1 (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição dos 64 pacientes positivas para HPV segundo NIC– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

PRESENÇA DE HPV-16 OU DE VARIANTE 16	NIC				TOTAL
	1		2 ou 3		
	n	%	n	%	
sim	9	34,6	21	80,8	30
não	17	65,4	17	65,4	34
TOTAL	26	40,6	38	59,4	64

$$\chi^2=1,88, p=0,17$$

Dentre as 49 pacientes HIV soropositivas, 18 (36,7%) eram portadoras de NIC, com predomínio de lesões de baixo grau (16 \Rightarrow 88,9%); os casos de alto grau foram um de NIC 2 e um de NIC 3. Houve positividade para HPV em 16 (32,6%) pacientes HIV soropositivas, sendo 11 (68,8%) do grupo caso e cinco (31,2%) do grupo controle. Em seis (54,5%) pacientes do grupo caso, houve tipagem de HPV-16 (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição das 16 amostras de pacientes HIV soropositivas, segundo tipo de HPV e grupo– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

TIPO DE HPV	GRUPO				TOTAL	
	caso		controle		n	%
	n	%	n	%		
HPV-16	6	54,5	-	-	6	37,50
HPV 18 35	1	9,1	-	-	1	6,25
HPV 33	1	9,1	-	-	1	6,25
HPV 35	1	9,1	-	-	1	6,25
HPV 83	1	9,1	-	-	1	6,25
indeterminado	-	-	4	80,0	4	25,00
VAR 33	1	9,1	-	-	1	6,25
VAR 51	-	-	1	20,0	1	6,25
TOTAL	11	100,0	5	100,0	16	100,00

NOTA: Para obedecer às regras de arredondamento, obtendo total percentual em 100,00, foram adotadas duas casas decimais.

Em relação aos microorganismos descritos nos exames colpocitológicos das 228 pacientes, constatou-se diferença estatística entre casos e controles, de tal forma que, entre os casos, houve predomínio de *Gardnerella vaginalis* e de bactérias cocóides, enquanto que no grupo controle foram mais freqüentes *Lactobacillus* e fungos. Considerando as regras de Cochran para inferência estatística, foi necessário agrupar as floras *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*, uma vez

que houve a presença deste protozoário em apenas uma paciente do grupo controle. (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição de 228 pacientes segundo flora vaginal e grupo de estudo – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001- Agosto 2002

FLORA VAGINAL	GRUPO				TOTAL	
	caso		controle		n	%
	n	%	n	%	n	%
<i>Lactobacillus</i>	17	12,9	48	50,0	65	28,5
fungos	10	7,6	28	29,2	38	16,7
<i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i>	93	70,5	26	27,1	119	52,2
Bactérias cocóides	53	40,2	11	11,6	64	28,1

$\chi^2=79,51$, $p<0,00$

Na Figura 9, observa-se a distribuição da flora vaginal das 49 pacientes HIV soropositivas, identificando-se ter sido mais freqüente o encontro de fungos (65,3%) e de *Gardnerella vaginalis* (30,6%) e, mais raramente, de bactérias cocóides (14,3%) e de *Lactobacillus* (10,2%).

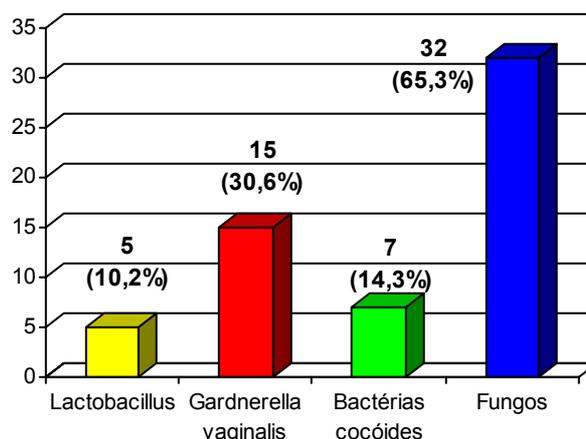


Figura 9 – Distribuição de 49 pacientes HIV soropositivas, segundo flora vaginal

NOTA: Percentuais calculados com base em 49 pacientes, pois houve casos de flora mista.

Na Tabela 13 estão expressas as relações entre a gravidade dos achados colposcópicos e a intensidade das alterações citológicas para as 132 pacientes do grupo caso. Identificou-se terem sido mais freqüentes epitélio acetobranco acentuado e mosaico áspero nas pacientes com NIC 2 ou NIC 3 do que naquelas com NIC 1, diferenças essas estatisticamente significantes. A ocorrência de

pontilhado áspero predominou nas pacientes com lesões de alto grau e não diferiu significativamente daquelas de baixo grau.

Tabela 13 – Distribuição das 132 pacientes do grupo caso quanto à gravidade dos achados colposcópicos e à intensidade da NIC – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

GRAVIDADE DOS ACHADOS COLPOSCÓPICOS ANORMAIS	NIC		TESTE ESTATÍSTICO
	1	2 ou 3	
epitélio acetobranco			
leve	17	18	$\chi^2=4,11$ p=0,04
acentuado	22	59	
pontilhado			
leve	17	15	$\chi^2=2,49$ p=0,11
áspero	5	14	
mosaico			
leve	10	13	p _{Fisher} <0,00
áspero	2	34	

Identificou-se concordância regular entre as positivities de colpocitologia e PCR para DNA-HPV nos casos de NIC 1, avaliada pelo índice Kappa, o mesmo não se verificando para os casos de NIC 2 ou NIC 3. A histopatologia concordou com a positividade de todos os casos de PCR para DNA-HPV, no entanto diagnosticou um maior número de alterações morfológicas compatíveis com HPV positivo que a reação de cadeia de polimerase, independente do grau de NIC (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados de colpocitologia e histopatologia em pacientes com DNA-HPV tipificado conforme graduação de NIC – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

EXAMES COMPLEMENTARES SEGUNDO NIC	PCR PARA DNA-HPV				ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA KAPPA E INTERPRETAÇÃO
	positivo		negativo		
	n	%	n	%	
colpocitologia*					
NIC 1					
presente	22	84,6	11	44,0	K = 0,41±0,13 (regular) p = 0,001
ausente	4	15,4	14	56,0	
NIC 2 e 3					
presente	24	63,1	28	65,1	K = - 0,02 ± 0,10 (ruim) p = 0,57
ausente	14	36,9	15	34,9	
histopatologia*					
NIC 1					
presente	26	100,0	23	92,0	K = 0,08 ± 0,06 (fraca) p = 0,07
ausente	-	-	2	8,0	
NIC 2 e 3					
presente	38	100,0	42	97,7	K = 0,02 ± 0,02 (fraca) p = 0,17
ausente	-	-	1	2,3	

NOTA: * - Em colpocitologia e histopatologia foram considerados 64 pacientes com HPV tipificado.

A validade da colpocitologia em relação à histopatologia cervical foi calculada para as 78 pacientes com resultado de PCR para DNA-HPV positivo (Tabela 15), assim como para as 132 pacientes do grupo caso (Tabela 17).

Para as pacientes com DNA-HPV positivo, os resultados de colpocitologia apresentaram concordância boa, estatisticamente significativa, com o encontro de coilocitose no exame histopatológico. Houve 59% de positividade de coilocitose identificada pela colpocitologia e 83,3%, pela histopatologia (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultados dos aspectos citopáticos compatíveis com presença de HPV identificados por colpocitologia e histopatologia, nos grupos com positividade para DNA-HPV– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

RESULTADOS COLPOCITOLÓGICOS	RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS				ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA KAPPA
	positivo		negativo		
	n	%	n	%	
presente	46	70,8	-	-	K = 0,75± 0,09 p < 0,00
ausente	19	29,2	13	100,0	
TOTAL	65	100,0	13	100,0	

NOTA: Foram incluídas apenas as 78 pacientes com DNA-HPV positivas.

Quando foram consideradas as 78 pacientes com DNA-HPV positivo, detectou-se menor sensibilidade, alta especificidade e baixo valor preditivo negativo da colpocitologia em relação à histopatologia (Tabela 16).

Tabela 16 – Dados de validade diagnóstica da colpocitologia comparada à histopatologia cervical, para diagnóstico de infecção por HPV– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

DADOS DE VALIDADE DIAGNÓSTICA	PACIENTES COM DNA-HPV (+)
sensibilidade	70,8% (IC95% 58,0 – 81,1%)
especificidade	100,0% (IC95% 71,7% - 100,0%)
valor preditivo positivo	100,0% (IC95% 90,4% - 100,0%)
valor preditivo negativo	40,6% (IC95% 24,2% - 59,2%)

Para as 132 pacientes do grupo caso, identificou-se concordância estatisticamente significativa entre os resultados de colpocitologia e da histopatologia quanto ao encontro de coilocitose (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultados dos aspectos citopáticos compatíveis com presença de HPV por colpocitologia e histopatologia, em 132 pacientes do grupo caso – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

RESULTADOS COLPOCITOLÓGICOS	RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS				p
	positivo		negativo		
	n	%	n	%	
presente	85	65,9	-	-	0,04
ausente	44	34,1	3	100,0	
TOTAL	129	100,0	3	100,0	

Na Tabela 18 apresentam-se os parâmetros de validade diagnóstica da colpocitologia, comparada à histopatologia cervical, de 132 mulheres do grupo caso. A colpocitologia das 132 pacientes do grupo caso apresentou especificidade e valor preditivo positivo elevados, para o diagnóstico de infecção por HPV com base na presença de colicitose identificada por histopatologia. No entanto, o intervalo de confiança da especificidade foi amplo.

Tabela 18 – Dados de validade diagnóstica da colpocitologia comparada à histopatologia cervical, para diagnóstico de infecção por HPV– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

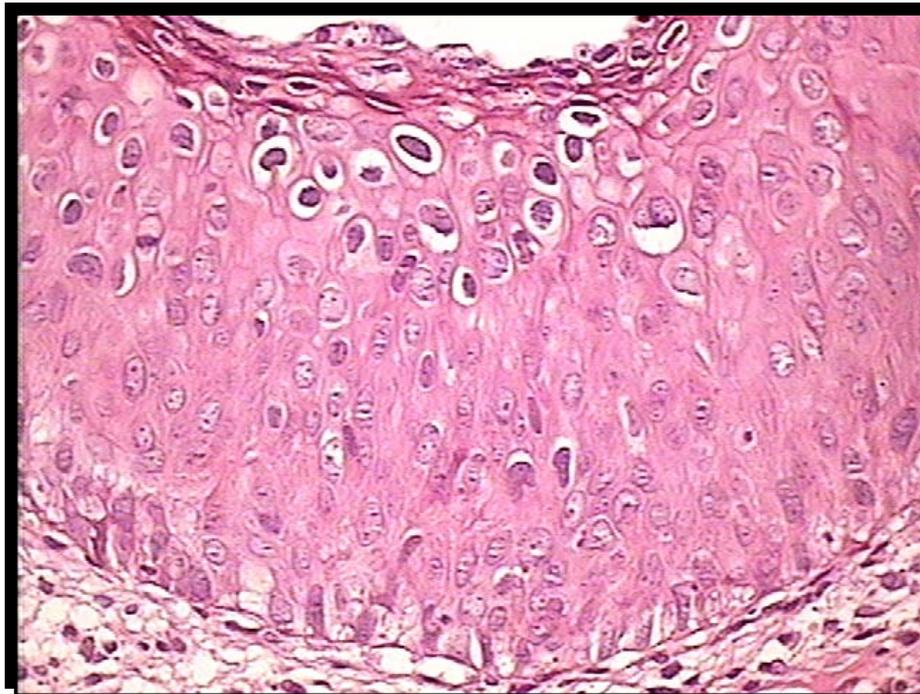
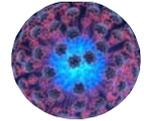
PARÂMETROS DE VALIDADE DIAGNÓSTICA	VALORES E INTERVALOS DE CONFIANÇA
sensibilidade	65,9% (IC95% 57,0% - 73,9%)
especificidade	100,0% (IC95% 31,0% - 100,0%)
valor preditivo positivo	100,0% (IC95% 94,4% - 100,0%)
valor preditivo negativo	6,4% (IC95% 1,7% - 18,6%)

Na Tabela 19 apresenta-se a distribuição das 132 mulheres portadoras de NIC, segundo resultado da pesquisa de HPV. Identificou-se semelhança entre as variáveis: faixa etária, estado civil, grau de instrução, idade ao primeiro coito, número de gestações, número de parceiros sexuais, método contraceptivo utilizado, referência de DST anterior, tabagismo e soropositividade HIV, entre as pacientes com HPV negativo e as HPV positivo.

Tabela 19 – Distribuição de 132 portadoras de NIC segundo faixa etária, estado civil, grau de instrução, idade ao primeiro coito, número de gestações, número de parceiros sexuais, método contraceptivo utilizado, referência de DST anterior, tabagismo e soropositividade HIV segundo pesquisa de HPV – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Pernambuco – Novembro 2001-Agosto 2002

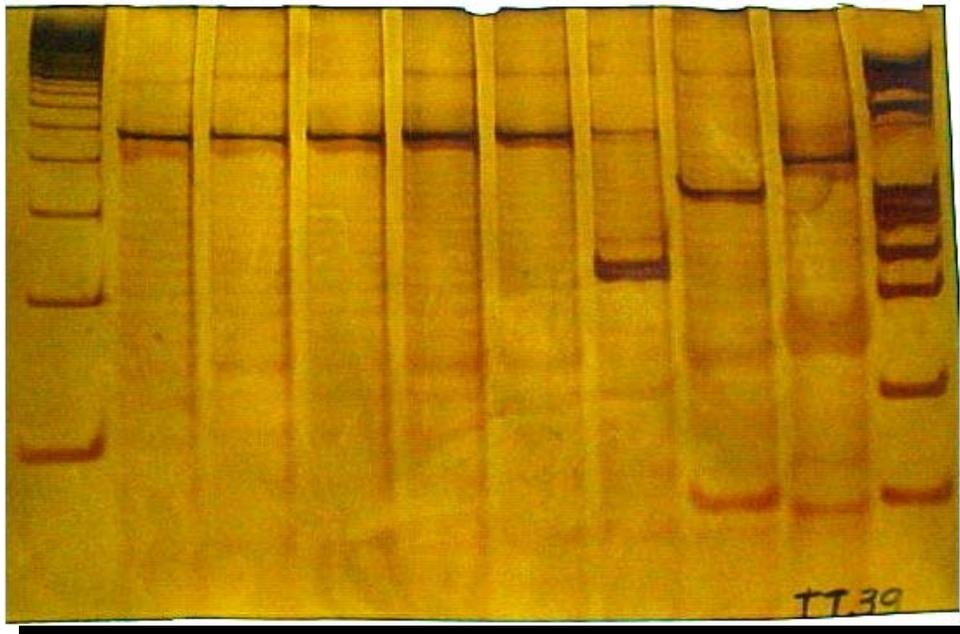
VARIÁVEIS	PESQUISA DE HPV				TOTAL	OR	IC 95%	p
	negativa		positiva					
	n	%	n	%				
faixas etárias								0,05
10 a 29	20	29,4	26	40,6	46	1,00		
30 a 39	25	36,8	28	43,8	53	0,86	0,39-1,91	0,87
40 a 59	23	33,8	10	15,6	33	0,33	0,13-0,86	0,04
estado civil								0,47
casada	33		30		63	1,00		
solteira	29		24		53	0,91	0,44-1,89	0,95
viúva ou separada	6		10		16	1,83	0,59-5,66	0,43
grau de instrução								0,49
fundamental	31	45,6	34	53,1	65	1,00		
sem instrução	37	54,4	30	46,9	67	1,35	0,68-2,68	
idade ao primeiro coito								0,89
20 - 30	9	13,2	8	12,5	17	1,00		
10 – 19	59	86,8	56	87,5	115	0,94	0,34-2,60	
número de gestações								0,74
nuligesta	6	8,8	5	7,8	11	1,00		
primigesta	9	13,2	11	17,2	20	1,47	0,33-6,43	0,89
paucigesta	28	41,2	21	32,8	49	0,90	0,24-3,35	0,86
multigesta	25	36,8	27	42,2	52	1,30	0,35-4,78	0,95
número de parceiros sexuais								1,00
1 – 2	34	50,0	33	51,6	67	1,00		
3 ou mais	34	50,0	31	48,4	65	1,06	0,54-2,11	
método contraceptivo utilizado								0,54*
nenhum	18	26,5	22	34,4	40	1,00		
não hormonal	3	4,4	1	1,6	4	0,27	0,03-2,85	0,54
hormonal	47	69,1	41	64,0	88	0,71	0,34-1,51	0,49
referência de DST anterior								0,45
não	36	52,9	27	42,2	63	1,00		
sim	32	47,1	37	57,8	69	1,54	0,78-3,07	0,54
hormonal	47	69,1	41	64,0	88	1,16	0,61-2,23	0,77
tabagismo								0,51
não	40	58,8	33	51,6	73	1,00		
sim	28	41,2	31	48,4	59	1,34	0,67-2,67	
soropositividade HIV								0,93
não	117	78,0	62	79,5	178	1,00		
sim	33	22,0	16	20,5	49	0,91	0,44-1,89	

NOTA: * No cálculo da relação entre método contraceptivo utilizado e tipagem de HPV considerou-se a categorização hormonal e diferente de hormonal (nenhum e não hormonal), devido às frequências menores que cinco



Histopatologia – HE 400X – Atipia neoplásica atingindo mais de dois terços do epitélio. Coilocitose nas camadas superficiais – NIC 2 HPV

PM	A	1	2	3	4	5	6	7	PM
100 pb	450 pb	Bam HI	Ddel	Hae III	Hinf I	Pst I	RsaI	Sau3AI	100 pb



Amostra TT 39 – HPV-16 – JEF, 38 anos, primeiro coito aos 14 anos, um parceiro sexual, G VI/P V, nível de instrução 1º grau incompleto, contracepção por ligadura tubária, não tabagista, sem história de DST anterior, NIC 3, HIV soronegativa

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho realizado em Pernambuco, com o objetivo de pesquisar fatores de risco para NIC, utilizando-se como exames complementares colposcopia, colpocitologia, histopatologia e a identificação do HPV por técnica de PCR/RFLP, em pacientes atendidas em um Hospital Universitário.

Para que se possam discutir os resultados desse estudo, é necessário iniciar com comentários sobre suas peculiaridades e restrições em função do desenho metodológico utilizado e da população estudada. Dado que no estudo caso-controle, tanto a exposição quanto a doença já ocorreram, há maior vulnerabilidade a *bias*, especialmente de seleção e de informação. Sobrepondo-se a isto, este é um dos desenhos mais utilizados em pesquisas científicas, devendo os pesquisadores adotar condutas para reduzir os possíveis *bias* em sua execução.

Por se tratar de população hospitalar, estão excluídas do estudo as mulheres com pouca aderência ao sistema de saúde, as menos motivadas e aquelas com dificuldade para comparecer à instituição. Por se tratar de hospital escola e por suas características, a clientela pode ser diferente daquela de outros serviços. Vale ressaltar que no presente estudo, a seleção das pacientes, casos e controles, foi realizada entre aquelas que procuraram o mesmo serviço.

Como não houve recusa de participação ou perda de amostras do estudo, esses fatores não contribuíram para o surgimento de *bias* de seleção.

Na Figura 10, observa-se a distribuição de procedência dos casos e dos controles em relação à tipagem do HPV, na qual constata-se que a amostra, como um todo, teve maior representatividade entre as pacientes procedentes do Recife e da Região Metropolitana. Dois motivos principais podem justificar a menor representatividade de pacientes oriundas da Zona da Mata e do Agreste: a pouca adesão das mesmas aos exames preventivos e a existência de encaminhamento dos casos suspeitos pelas Divisões Regionais de Saúde para outros serviços na Capital.

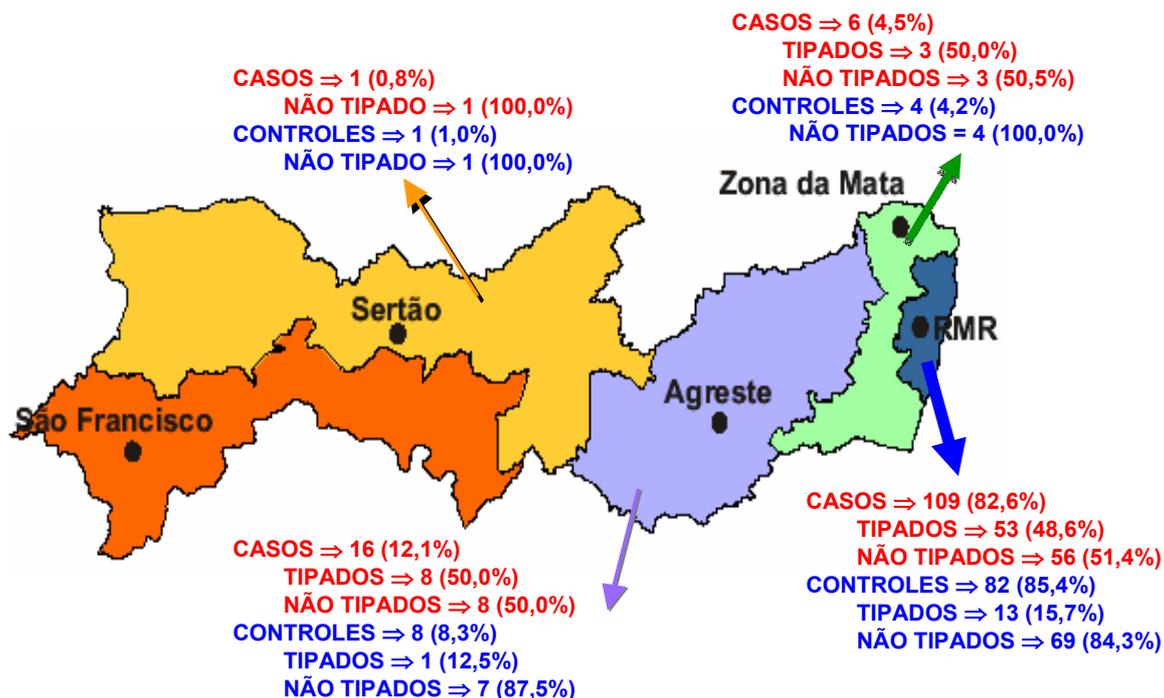


Figura 10 – Distribuição de procedência dos casos e dos controles em relação à tipagem do HPV

No que diz respeito a *bias* de informação, em relação a ser caso ou controle, é pouco provável que tenha havido erro de classificação. Todas as pacientes pertencentes ao grupo caso, mesmo aquelas encaminhadas com algum exame complementar, tiveram o diagnóstico de NIC confirmado por alterações no exame colposcópico, colpocitológico e histopatológico, realizados no mesmo setor.

Os controles foram obtidos entre as pacientes procedentes de regiões semelhantes àsquelas do grupo caso e que apresentavam ausência de neoplasia cervical, confirmada por três exames normais e sucessivos de colposcopia e de colpocitologia.

Quanto à presença do vírus, na tentativa de evitar a ocorrência de diagnósticos falso-positivos, ou seja, existência de pacientes DNA-HPV positivas não infectadas pelo HPV, utilizou-se, para o diagnóstico, além dos métodos morfológicos, outro por técnica de biologia molecular, com elevada especificidade. Além do mais, cuidados técnicos ao nível laboratorial foram adotados para evitar

contaminação das amostras, incluindo treinamento de pessoal técnico, procedimentos de biossegurança e utilização de congelador específico para armazenamento temporário das amostras destinadas à pesquisa de HPV.

Para explicar a ocorrência de amostras, principalmente entre os casos, possivelmente positivas para infecção pelo HPV apresentarem negatividade de PCR, salientam-se a existência de processos inflamatórios cervicais, facilitando o sangramento por ocasião da coleta do espécime; a possibilidade da hemoglobina prejudicar a execução do processo de amplificação do DNA viral e a utilização de *primers* com sensibilidade insuficiente para detectar a presença do vírus.

A ocorrência desses possíveis erros de classificação teria como consequência principal a redução da força de associação entre NIC e infecção pelo HPV, o que significa que o resultado obtido pode estar subestimando.

Comparando as portadoras de NIC com positividade de DNA-HPV àquelas DNA-HPV negativas, observou-se ter havido semelhança nas demais variáveis estudadas (Tabela 19). Admitindo-se ter havido falha técnica na identificação do HPV, caso não tivesse ocorrido tal falha, não haveria motivo para supor que os vírus identificados e a frequência dos mesmos fossem diferentes nessas pacientes.

Não se pode afastar a possibilidade de um erro de classificação quanto às demais variáveis. No entanto, para diminuir a possibilidade de que o mesmo, se ocorresse, fosse diferente nos casos e nos controles, utilizou-se um formulário elaborado especificamente para esse fim, tendo sido aplicado a todas as pacientes, pela mesma pessoa e no mesmo ambiente.

Feitas essas considerações, salienta-se que, na última década, a maior descoberta sobre a etiologia da carcinogênese na espécie humana, foi o reconhecimento de que o carcinoma cervical é uma rara consequência da infecção por certos tipos de HPV de alto risco (ANHANG et al., 2004). Atualmente, a infecção pelo HPV vem sendo melhor estudada, como decorrência da íntima relação desse vírus com as neoplasias do trato genital inferior. Tal infecção ocorre, freqüentemente, durante a juventude e é dependente do comportamento sexual.

A NIC, seqüela comum da infecção pelo HPV, tem elevada incidência na faixa etária entre 29 e 35 anos, enquanto que a maior incidência do câncer cervical

invasivo está entre 55 e 65 anos, podendo ser mais precoce em certas populações, inclusive a do Brasil (IARC, 1995).

Entre as pacientes do presente estudo, houve semelhança de idade entre controles e casos, nos quais a NIC ocorreu em maior proporção no grupo etário de 30 a 39 anos. Assim também foi semelhante a distribuição das pacientes quanto ao estado civil.

Recife, capital de Pernambuco, apresenta incidência de câncer cervical de 83,2 por 100.000 habitantes, a maior registrada mundialmente. Possui centros de referência para diagnóstico e tratamento oncológico, para onde são encaminhadas as pacientes que residem no Recife, em Área Metropolitana e no Interior do Estado. A cobertura dos serviços de prevenção da neoplasia cervical é deficitária, quadro que se torna ainda mais preocupante ao constatar que, dentre as mulheres atendidas em um setor de colpocitologia do Sistema Único de Saúde, 64,5% dos exames colpocitológicos foram diagnosticados como processos inflamatórios e em 5,4%, continha material inadequado, isto é, contribuindo para a má qualidade da análise oncológica (LORENZATO, 2001).

A dificuldade de acesso aos serviços de prevenção do câncer do colo do útero pode ser agravada pelo deficiente grau de escolaridade nesta região, tal como constatado na presente pesquisa, na qual no grupo caso, houve elevado contingente de pacientes detentoras apenas de conhecimentos elementares ou sem instrução. O nível baixo de escolaridade também pode estar associado a outras medidas que dificultem a proteção à saúde.

No presente estudo, o início precoce de relações sexuais mostrou-se como fator de risco para NIC (OR=3,07 IC95% 1,58-5,99) tal como estudos realizados por Ho et al. (1998); Kahn (2001) e Frega et al. (2003).

Ho et al. (1998), após estudo de coorte prospectivo sobre a história natural da infecção por HPV em mulheres jovens, concluíram ser mais elevada a frequência da infecção transiente entre aquelas que iniciaram atividade sexual precocemente e referiram, durante o período de 36 meses de observação, mais de quatro parceiros sexuais. Nesse estudo, a persistência da infecção por mais de seis meses esteve relacionada com tipos específicos de HPV, entre eles 16 e 18, e infecção por múltiplos tipos de HPV. A referência de tabagismo não influenciou a persistência da

infecção, contrariamente a outros trabalhos publicados (SCHIFFMAN et al., 1993; FRANCO et al., 1999b; BOSCH et al., 2002; GIULIANO et al., 2002).

Entre as jovens, há reconhecida vulnerabilidade biológica às infecções sexualmente transmissíveis, de um modo geral. A ectopia cervical, também freqüente nesta fase evolutiva, induz à metaplasia, como mecanismo natural de reparação, favorecendo a transmissão do HPV (WASSERHEIT, 1992).

O início precoce da atividade sexual faculta à paciente maior freqüência de intercursos ao longo de sua existência, inclusive com a possibilidade de surgimento de novos parceiros e, conseqüentemente, elevação do risco de infecções. Esta seqüência de acontecimentos tem sido relatada, em associação com NIC, por vários pesquisadores (SCHIFFMAN et al., 1993; WIKSTRÖM, 1995).

A multigestação não representou fator de risco para NIC, no presente estudo, embora tenha ocorrido maior freqüência de múltiparas entre os casos do que entre os controles, todavia o valor do p ($p=0,09$) próximo do ponto de corte ($p=0,05$) e o intervalo de confiança relativamente amplo sugerem que, talvez, o tamanho da amostra não tenha sido suficiente para detectar esta diferença. A associação dessa variável com NIC tem sido encontrada devido à presença de fatores confundidores (SCHIFFMAN, BRINTON, 1995). Condições socioeconômicas desfavoráveis, dificultando o acesso à adequada instrução e à assistência médica, aliadas à debilidade do organismo por sucessivas gestações e partos, contribuem para elevar a incidência de neoplasias cervicais entre as múltiparas. Entre as solteiras e múltiparas, principalmente aquelas que não mantêm união estável, é possível maior número de parceiros sexuais, elevando os riscos de infecção pelo HPV. As pacientes DNA-HPV positivas, que relataram sete gestações a termo ou mais, tiveram risco quatro vezes maior para câncer cervical, quando comparadas àquelas semelhantemente positivas para DNA-HPV, que eram nuligestas (BOSCH, FRANCO, 2003). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Lorenzato et al. (2000) que identificaram, como fatores de risco para câncer cervical, a multiparidade e a ocorrência de partos transpelvianos (OR = 5,30 IC95% 1,92–14,86 e OR = 4,27 IC95% 1,58–11,68, respectivamente).

No presente estudo, o relato de três ou mais parceiros sexuais constituiu fator de risco para NIC, em concordância com os resultados de outros autores (BRINTON

et al., 1989; VILLA, 1997; CASTELLSAGUÉ et al., 2002). Apesar da existência de parceiro sexual único em portadoras de NIC e de DST, refletindo a ação do comportamento sexual do parceiro na transmissão dessas doenças, as mesmas podem ser adquiridas, com maior frequência, quando existem intercursos com diferentes indivíduos.

A participação do fator masculino na etiologia do câncer cervical de parceiras monogâmicas foi avaliada em estudo do tipo caso-controle realizado por Brinton et al. (1989), em quatro países da América Latina. O risco de câncer cervical elevou-se significativamente com o número de parceiras sexuais relatado pelos entrevistados. Os autores salientam ainda terem identificado entre esses indivíduos, baixo grau de instrução e higiene genital precária, tendo obtido dados estatisticamente significantes quanto ao relato de DST anterior.

A referência de DST anterior constituiu fator de risco para NIC no estudo ora apresentado (OR = 8,23 IC95% 2,82 -24,04). Esses dados são similares aos encontrados na literatura: CDC (1990), Koustsky et al. (1992), IARC (1995), Bosch et al. (2002) e Ho et al. (2002).

A afirmativa de que o câncer cervical uterino é uma IST é respaldada à luz dos conhecimentos atuais, pelo sinergismo existente entre essas infecções transmitidas durante o ato sexual e a constatação de que a infecção pelo HPV precede as lesões precursoras.

A relação entre infecção pelo HIV e outras IST foi postulada por Wasserheit em 1992 que, após estudo de metanálise, concluiu: existe aumento de transmissão do HIV em presença de outras IST; em paciente HIV soropositivas, há com frequência, modificações na história natural, no diagnóstico e na resposta à terapêutica habitual de outras infecções sexualmente transmissíveis.

O uso de contraceptivo hormonal, na pesquisa ora relatada, constatou-se, entre os casos, maior frequência, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa. Esses resultados são concordes com os encontrados por Shiffman et al. (1993) que consideraram fraca a relação entre o uso de contraceptivo hormonal oral e neoplasia cervical. Analogamente ao que ocorreu em relação à multigestação, o intervalo de confiança amplo e o valor do p ($p=0,06$) muito próximo do ponto de corte ($p=0,05$) sugerem que, talvez, o aumento do tamanho da amostra permita detectar

esta diferença. Esses resultados diferiram dos trabalhos de Moreno et al., em 2002, e de Muñoz et al., em 2003, entre outros, que comprovaram associação entre o uso de contraceptivo hormonal oral e neoplasia cervical. Apesar desses autores terem seus resultados obtidos a partir de estudos multicêntricos realizados em portadoras de câncer invasivo, para eles, o uso de contraceptivo hormonal oral por mais de 10 anos aumenta significativamente o risco de neoplasia (OR = 4,48 IC95% 2,24-9,36). Devido ao importante potencial, na saúde pública, da interação do uso desses hormônios com fins contraceptivos e o desenvolvimento do câncer cervical, alguns autores propõem a utilização dos testes de HPV nos protocolos de rastreamento para mulheres utilizando contraceptivos hormonais orais, durante longo prazo (BOSCH, FRANCO, 2003).

Para Shapiro et al. 2003, ao se analisar o uso de contraceptivos hormonais orais como fator de risco para neoplasia cervical deve-se levar em consideração, possíveis *bias*. Dentre as usuárias de contraceptivos hormonais, as neoplasias cervicais podem apresentar maior frequência, como resultado da melhor atenção à saúde da mulher e solicitação da colpocitologia oncótica. Salientam ainda esses autores, que na literatura constata-se que são em estágios iniciais as neoplasias cervicais diagnosticadas entre as usuárias deste método contraceptivo.

Brinton (1991) reconhece a dificuldade na interpretação dos estudos que avaliam a relação entre uso de contraceptivo hormonal oral e neoplasia cervical. Para a autora, são *bias* de seleção e grupos de controle inapropriados.

A importância de outros microorganismos sexualmente transmissíveis, além do HPV, na etiopatogenia das neoplasias cervicais tem sido investigada, todavia a associação causal não tem sido documentada. A identificação de *Chlamydia trachomatis*, HSV e *Trichomonas vaginalis* em portadoras de NIC é admitida como indicativo de atividade sexual (WIKSTRÖM, 1995). Por outro lado, o processo inflamatório cervical crônico, produzido por outros microorganismos, facilita a instalação da infecção pelo HPV (VIIKKI et al., 2000).

Bosch e Franco (2003), ao concluírem a avaliação do Relatório IARC sobre aspectos epidemiológicos relativos à infecção pelo HPV e câncer cervical, enfatizaram “*a literatura não é inteiramente consistente sobre os fatores adicionais na carcinogênese cervical*”. Ressaltaram, no entanto, que as pacientes, portadoras

de DNA-HPV e soropositivas para anticorpos do HSV ou da *Chlamydia trachomatis*, apresentaram risco moderado para neoplasia cervical.

No estudo ora apresentado, a associação entre tabagismo e NIC foi estatisticamente significativa (OR = 5,16; IC95% 2,62–10,16), resultado similar ao referido por diversos autores (FRANCO et al., 2001; GIULIANO et al., 2002).

A despeito das campanhas esclarecedoras sobre as conseqüências danosas do hábito de fumar, propaladas por diferentes veículos de comunicação, o tabagismo permanece como grande preocupação em saúde pública, em vários países. Calcula-se que quantidade superior a 4.000 substâncias nocivas emana da fumaça do cigarro – algumas mutagênicas e imunossupressoras – e que os efeitos prejudiciais do tabagismo não estão limitados unicamente aos tecidos com os quais têm contato direto (VILLA, 1997; MOSCICKI et al., 1998).

Entre as pacientes que, no presente estudo, referiram o hábito de fumar, o tempo de tabagismo superior a 10 anos e o consumo de mais de 20 cigarros por dia não foram fatores de risco para NIC. Para Giuliano et al. (2002), a maior exposição aos componentes do cigarro, conseqüente ao maior tempo do hábito de fumar e à maior quantidade de cigarros consumidos por dia, que refletem a dose-resposta, teve influência no surgimento de NIC nas pacientes. Para esses autores, os mecanismos pelos quais o tabagismo influencia na carcinogênese cervical - por ação direta dos metabólitos da fumaça, ou, indiretamente, por induzir imunossupressão - permanecem inconclusivos, requerendo futuros estudos elucidativos. No entanto já se constatou na literatura que entre as tabagistas existe uma considerável redução das células de Langerhans, importantes componentes na resposta da imunidade mediada por células (UCHIMURA, 2002).

Sobre esta mesma interação entre tabagismo e câncer cervical, as conclusões a que chegaram Bosch e Franco (2003) são mais enfáticas ao afirmarem: “*entre as mulheres DNA-HPV positivas, qualquer quantidade de fumo foi associada com um aumento dobrado do risco de câncer e com significativa dose-resposta*”.

Na análise da associação entre infecção pelo HPV e as demais variáveis independentes, obteve-se um resultado estatisticamente significativo para referência de DST anterior e tabagismo e limítrofe, para nível de instrução. Essas variáveis, por

apresentarem associação com efeito (NIC) e com a exposição (HPV), seriam os mais prováveis fatores de confusão. No entanto, no modelo multivariado optou-se por introduzi-las.

No presente estudo, os resultados obtidos após análise multivariada, de acordo com dados constantes na tabela 8, identificaram-se como fatores que têm uma associação mais próxima com NIC, infecção por HPV de alto risco oncogênico (OR=12,32 IC95% 3,79 – 40,08); antecedente de doença sexualmente transmissível (OR=8,23 IC95% 2,82 – 24,04), início precoce das relações sexuais (OR=4,00 IC95% 1,70 – 9,39), tabagismo (OR=3,94 IC95% 1,73 – 8,98) e soropositividade para HIV (OR=0,04 IC95% 0,01 – 0,13).

Os fatores de risco para neoplasia cervical invasiva já foram estudados, em pacientes procedentes de dois hospitais do Recife, por Lorenzato et al. (2000), por meio de análise multivariada. Concluíram que o *Odds Ratio* a favor desse tumor, quando a paciente apresentava captura híbrida positiva para HPV de alto risco, foi 3,42 (IC95% 1,47 – 8,20). Outros fatores de risco identificados foram: primeira gestação com menos de 20 anos de idade (OR=4,0 IC95% 1,43 – 11,52); multiparidade (OR=5,30 IC95% 1,92 – 14,86); mais de quatro partos transpelveanos (OR=4,27 IC95% 1,58 – 11,68) e residência em área rural (OR=11,27 IC95% 3,51 – 39,19).

Embora ambos os estudos tenham sido realizados na mesma cidade, em épocas próximas, utilizando metodologia semelhante e tenha sido identificada a infecção por HPV de alto risco oncogênico como fator de risco para neoplasia cervical, esses resultados não são comparáveis em sua totalidade uma vez que no estudo de Lorenzato et al. (2000), as pacientes tinham câncer invasivo, contrariamente ao presente estudo, do qual participaram pacientes com lesões precursoras. Essa diferença metodológica pode explicar o maior valor de *Odds Ratio* do presente estudo, já que, após instalada a invasão tumoral, a identificação do HPV é menos freqüentemente obtida na lesão.

Na amostra estudada, a infecção por HIV foi fator de proteção importante para NIC (OR=0,04 IC95% 0,01 – 0,13). Resultado diferente foi encontrado por Ellerbrock et al., em 2000, em estudo do tipo coorte prospectivo, os quais ao avaliar fatores de risco para NIC, identificaram a presença de infecção cervical por tipos oncogênicos

de HPV, início precoce das relações sexuais e soropositividade para HIV. As conclusões de Kjaer et al. (2002), utilizando o mesmo desenho de estudo, foram semelhantes ao de Ellerbrock et al. (2000), todavia dois aspectos merecem referência especial: a pesquisa ter sido realizada em mulheres mais jovens, com idade média de 25 anos e o risco de desenvolver lesões cervicais de alto grau ter sido maior entre as portadoras de HPV oncogênico, comparadas com as de HPV de baixo risco (OR=34,5 IC95% 19,7 – 60,23 e OR=9,3 IC95% 5,8 – 14,9, respectivamente). Para esses autores, a infecção pelo HPV precede o desenvolvimento das lesões de baixo e alto grau citológico, assim como a infecção persistente pelo mesmo tipo viral eleva o risco de NIC 2 e NIC 3.

A constatação de ser a soropositividade para HIV um fator de proteção para NIC, no estudo atual, pode ser resultante de um conjunto de características específicas dessa amostra. O número de portadoras da infecção por HIV, no presente estudo, foi apenas de 49 pacientes, todas submetidas a terapia antirretroviral e já fazendo parte do estudo de coorte na avaliação das alterações colpocitológicas em portadoras de HIV, por serem tratadas em clínica especializada de infectologia, no mesmo hospital. Talvez por isso leves atipias diagnosticadas em tais pacientes, ou mesmo os processos inflamatórios cervicovaginais que possam apresentar, são de imediato tratados evitando, portanto, a evolução para NIC. Assim sendo, a constatação de que a soropositividade para HIV atuou como fator protetor para NIC, no presente estudo, pode estar refletindo a adesão dessas pacientes ao programa de vigilância da clínica de infectologia, pela qualidade de assistência que recebem, ou mesmo pode decorrer de um melhor perfil imunológico, propiciado pela terapia antirretroviral.

Na pesquisa atual, entre os casos, a presença de HPV de alto risco foi constatada em 48 (33,3%) pacientes, enquanto que em apenas quatro (4,2%) entre os controles. Observando ainda os dados contidos na tabela 4, contata-se o elevado número de pacientes portadoras de NIC, nas quais não se identificou DNA-HPV, pela técnica de PCR-RFLP.

Esses dados foram semelhantes com os da pesquisa de infecção pelo HPV por PCR-RFLP em amostras cervicais provenientes de diferentes regiões de Alagoas, na qual houve positividade em 32,4% das portadoras de NIC 1, 16,2% nos

casos de NIC 2 e ausência de DNA-HPV naquelas com diagnóstico citológico de NIC 3. Relatou ainda positividade DNA-HPV em 27% das amostras, porém com quantidade de nucleotídeos insuficiente para a tipagem, além de 21,6% com padrão indeterminado (VIANA, 2003).

Tal como ocorreu no estudo de Queiroz, em 2003, realizado em Salvador - BA, na presente pesquisa pareceu alto o percentual de negatividade de DNA-HPV, mesmo considerando que essa autora estudou portadoras de carcinoma cervical invasor, além daquelas com NIC. Ambos os dados estão em desacordo com os encontrados na literatura, que têm mostrado positividade maior que 95% da PCR nestas neoplasias (WALBOOMERS et al., 1999; BOSCH et al., 2002).

A explicação dada por Yokoyama et al. (2003), para o encontro de 80% de portadoras de NIC 1 com DNA-HPV negativo, parece adequada também para a elevada negatividade de DNA-HPV da presente pesquisa. Afirmam que “*HPV negativo necessariamente não significa sempre negativo*”, justificando que em muitos casos a seqüência de DNA-HPV pode ser positiva, porém em quantidade tão pequena que os métodos atuais não permitem detectar.

Outro fator que pode interferir na ocorrência de resultados falso-negativos, segundo Ting e Manos (1990), Walboomers et al. (1999), Kleter et al. (1999), Castle et al. (2002a) e Muñoz et al. (2003) são os primers *consensus* utilizados na técnica de PCR-RFLP.

Apesar do valor inquestionável e da alta sensibilidade da PCR para detecção do HPV, esta técnica pode ter resultados falso-negativos. Para Schiffman et al. (1993), a não identificação de HPV em todos os casos de NIC pode resultar de alguns fatores, entre os quais: problemas na coleta dos espécimes; dificuldade nos testes para HPV existentes, em decorrência da incompleta quantidade de vírus descobertos e limitações dos testes atuais. Estes autores investigaram as evidências epidemiológicas de que o HPV é o agente etiológico principal das neoplasias intra-epiteliais cervicais. Entre 472 portadoras desta neoplasia, não conseguiram identificar DNA-HPV em 89 (18,9%). Como fatores de risco para NIC, nomearam: múltiplos parceiros sexuais, tabagismo, início precoce das relações sexuais e baixas condições socioeconômicas.

Analogamente, no presente estudo, outras características da amostra podem ter contribuído, ainda que indiretamente, para o encontro de NIC. Constatou-se maior número de parceiros sexuais, maior frequência de doença sexualmente transmissível anterior, como também tabagismo entre as pacientes do grupo caso.

Na casuística atual, foram identificadas 30 (46,9%) pacientes portadoras de infecção cervical por HPV-16 ou variante 16, 21 (70%) das quais apresentando lesões de alto grau histológico e nove (30%), com diagnóstico de NIC 1. Esta observação motivou um estudo filogenético paralelo deste intratipo viral. Tal pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), cujo resultado embasou a feitura de uma tese de pós-graduação em Biologia Molecular (COSTA, 2004).

Estudos, realizados com base em biologia molecular, apontam que a diferença na incidência das neoplasias cervicais entre populações que residem na Europa e na América do Norte, comparadas com as da África e da América Latina, não se deve apenas aos níveis socioeconômicos. Não restam dúvidas de que baixo nível de instrução, desnutrição, deficientes programas de prevenção, difícil acesso aos cuidados de saúde, entre outras peculiaridades dos países pobres, contribuam para a ocorrência das neoplasias cervicais. No entanto a identificação, pela análise de seqüência do DNA-HPV, de uma diversidade de intratipos virais, também contribui para incidências distintas entre as populações (VILLA et al., 2000; CHAN et al., 2002a).

A comparação da seqüência de nucleotídeos de diferentes HPV permite indicar a proporção destes vírus em populações diversas. Estudos filogenéticos do HPV-16, provenientes de 25 diferentes regiões do mundo, permitiram localizar cinco braços originários deste tipo viral, quais sejam: Europeu (E); Asiático (As); Asiático-Americano (AA); Africano-1 (Af1) e Africano-2 (Af2), além de pequenos braços originários da América do Norte (CHAN et al., 2002a; BURK et al., 2003). As infecções por HPV-16, variantes de braços filogenéticos não europeus, isolados em um estudo brasileiro, apresentaram tendência a persistir por mais tempo, além de forte associação com NIC (VILLA et al., 2000).

Os HPV dos tipos 16, 31, 33, 38, 52, 58 e 67 estão todos agrupados no mesmo ramo da árvore filogenética, indicando similaridade quanto ao potencial

oncogênico (FRANCO et al., 2001; MOTA, 2002). Já foram identificadas, no mundo, 16 variantes do HPV-16 e, no Brasil, foram isoladas sete diferentes variantes deste mesmo tipo viral. Variantes do HPV-16 diferem em suas propriedades biológicas e bioquímicas, o que pode resultar na alteração da patogenicidade (BERNARD et al., 1994; MANOS et al., 1999; VILLA et al., 2000). Burk et al. (2003) relataram a maior frequência de variantes do HPV-16, de origem filogenética do grupo não europeu, em portadoras de adenocarcinoma do que naquelas com carcinoma escamoso do colo do útero.

Para alguns autores, diferenças em poucos nucleotídeos encontrados em HPV-16 podem influir na disposição da cadeia de aminoácidos, interferindo nas propriedades antigênicas do vírus. Este aspecto é de fundamental importância na persistência da infecção e na oncogenicidade viral, o qual, quando for melhor esclarecido, poderá ser útil na produção de vacinas anti-HPV. Nessa mesma linha de pesquisa, no campo da produção de vacina, Chang et al. (1995) demonstraram que duas variantes de HPV-16 por eles identificadas, que diferem em suas regiões L1 por sete aminoácidos, possuem reações sorológicas cruzadas. Tal achado sugere que a vacina desenvolvida com um tipo de HPV-16 variante pode proteger contra todas as infecções por HPV-16.

A utilização de vacinas tem demonstrado soroconversão eficaz com altos títulos de anticorpos. Ao contrário, após infecção natural pelo HPV, a soroconversão, quando ocorre, é um processo lento e requer estímulo antigênico a partir de elevada carga viral ou infecção persistente (HO et al., 2004).

À semelhança dos resultados obtidos no estudo atual, diversos autores relataram a identificação de HPV-16 ou variante deste tipo, em portadoras de lesões cervicais, entre os quais: Bosch et al. (2002), Wright e Schiffman (2003), Camara et al. (2003a), Oliveira et al. (2003), Muñoz et al. (2003), Giuliano et al. (2004) e Bagarelli e Olini (2004).

O conhecimento do tipo viral, quanto ao risco oncogênico, é importante para se avaliar a eventual progressão da lesão para malignidade (BOSCH, FRANCO, 2003). O presente estudo mostrou que, dentre as portadoras de NIC em seus diferentes graus com HPV tipificado, predominaram os de alto risco, incluídos, em ordem de frequência, o HPV-16, o HPV-58 e o HPV-83, com respectivas variantes.

Entre as pertencentes ao grupo controle, apenas quatro (4,2%) tinham HPV de alto risco oncogênico. O HPV-16 ou variante deste tipo viral foi identificado com maior frequência nas pacientes com NIC 2 ou NIC 3 que naquelas com NIC 1.

Assim como no presente estudo, o HPV-16 é o tipo prevalente em lesões neoplásicas cervicais em todo o mundo, com exceção da Indonésia, onde o HPV-18 é mais frequentemente identificado. Na América do Sul e na América Central, os tipos virais mais prevalentes são: 16, 18, 45, 31 e 33 (BOSCH et al., 1995). No Brasil, estudos anteriores de prevalência do HPV em lesões cervicais foram realizados em cinco regiões. Em todas elas, o HPV-16 é predominante em algumas cidades das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul, apesar de ter sido também observada variedade dos outros tipos virais (RABELO-SANTOS et al., 2003).

Camara et al. (2003a), em recente pesquisa realizada em Brasília, identificaram, dentre 129 portadoras de NIC, 62% de positividade para DNA-HPV, entre as quais: HPV-16 em 43,8%, HPV-58 em 12,5%, HPV-31 em 10%, HPV-53 em 6,3% e HPV-18 e HPV-33, ambos em 3,8% das pacientes. Os autores chamam a atenção para a maior frequência de HPV oncogênico entre as pacientes com lesões histopatológicas de alto grau e para o encontro de elevada prevalência do HPV-58, dados dos quais diferiu o atual estudo no que se refere à ausência do HPV-31, ao encontro de HPV-18 em apenas uma paciente e à frequência de HPV-58 em 4,6% dos casos e variante 58, em 4,7%.

O presente estudo contém alguns pontos concordantes e outros discordantes do trabalho de Montoya-Fuentes et al. (2001). Em ambos o HPV-16 foi o mais frequente, no entanto neste trabalho ocorreu em 46,9% das pacientes contra 24% referidos pelos autores. Em relação ao HPV-58, deu-se o contrário, posto que Montoya-Fuentes et al. relataram representar 16% dos casos de NIC, ao passo que identificou-se frequência de 9,4% no presente estudo.

Assim também, nos dados ora apresentados, a frequência de HPV-16 superou a referida por Lorenzato et al. (2000) que, em pesquisa realizada em Recife, utilizando PCR-RPLF, identificaram HPV-16 em 21% das portadoras de NIC 3 ou de câncer cervical invasivo. Todavia, quanto à presença de HPV-18, o atual trabalho assemelhou-se ao desses autores, com percentuais de 1,6% e 2%, respectivamente.

Contrariamente a Dybikowska et al. (2002), que na Polônia referiram como raridade um caso de portadora de HPV-58, dentre as mulheres com neoplasia cervical, Chan et al. (2002b), na China, constataram ter sido o HPV-58 o tipo viral mais prevalente na casuística estudada, do que diferiram os dados ora apresentados, nos quais esse tipo viral foi o segundo de maior frequência.

A diferente distribuição de tipos oncogênicos nas populações, tal como constata-se na literatura, tem importância na estratégia profilática para a produção de vacinas adequadas a cada região, contendo os tipos mais prevalentes.

Na casuística atual, 49 (21,5%) pacientes eram HIV soropositivas e todas utilizavam medicamentos antirretrovirais; 18 (36,7%) eram portadoras de NIC, com predomínio de lesões de baixo grau, resultado similar ao encontrado por Silva (1996), Gonçalves (1998) e Mota (2002), todas estudando pacientes HIV soropositivas em diferentes locais de São Paulo. O predomínio de lesões de baixo grau em portadoras da infecção pelo HIV também foi constatado por Levi et al. (2002), que relataram, no Instituto Emílio Ribas, em São Paulo, prevalência de NIC igual a 19%, entre as quais 12% das pacientes tinham lesões de baixo grau e 7%, NIC 2 e NIC 3. Neste estudo, os autores chamam a atenção para a maior ocorrência de lesões cervicais entre aquelas com contagem de CD4 menor que 100/mm³.

Prevalência semelhante de NIC (35,5%) em pacientes HIV soropositivas, atendidas em serviços públicos no Rio de Janeiro, foi relatada por Silva et al. (2003). Apesar de reconhecerem que os processos inflamatórios cervicovaginais, frequentes entre as pacientes HIV soropositivas, dificultam a interpretação oncológica da colpocitologia, Wright et al. (1994) determinaram sensibilidade e especificidade do método de 81% e 87%, respectivamente.

No presente estudo, identificou-se HPV-18 em apenas uma paciente, que também estava infectada pelo HPV-53, era portadora de NIC 1 e HIV soropositiva, contrariamente aos dados relatados por Oliveira et al. (2003) os quais, estudando 43 pacientes HIV soropositivas, em Hospital Universitário no Rio de Janeiro, identificaram HPV-18 em 14% dos casos e o tipo 16, em 60,4%. Não houve relato de tipos variantes.

Durante os primeiros anos após a instalação da pandemia da AIDS, vários autores mostraram que pacientes HIV soropositivas apresentavam incidência maior

de infecção pelo HPV e progressão para NIC. Pesquisas posteriores confirmaram esta observação, que resulta da combinação de fatores, entre os quais: deficiência na função imunológica, aumento na prevalência da infecção pelo HPV e persistência da mesma (MAIMAN et al., 1991; WRIGHT et al., 1994; SUN et al., 1995; HO et al., 1998; PALEFSKY et al., 1999; ELLERBROCK et al., 2000; COHN et al., 2001; DUERR et al., 2001; LEVI et al., 2002; MOTA, 2002).

Por meio de estudo do tipo coorte, buscou-se avaliar se a infecção pelo HIV era um fator de risco independente para NIC. As conclusões das pesquisas em diferentes países foram semelhantes: mulheres HIV soropositivas são co-infectadas pelo HPV em proporção maior do que as HIV soronegativas; nestas pacientes, detectou-se também tendência elevada de infecção persistente por HPV oncogênico e por tipos diferentes do vírus. Além disso, o maior fator de risco para infecção pelo HPV, nas pacientes HIV soropositivas, é o aumento da imunossupressão, caracterizada pela baixa contagem de CD4 (STIER, 2003).

As constatações da presente casuística, aliadas às dos trabalhos publicados a partir da década de 90, que demonstram que as pacientes HIV soropositivas apresentam frequência maior de lesões cervicais de baixo grau, diferentemente do observado no início da pandemia da AIDS, parecem decorrer da precocidade de diagnóstico de tais lesões ou da resposta indireta à terapia antirretroviral.

Tal como referido por pesquisadores nacionais e de outros países, estudando populações semelhantes (WRIGHT et al., 1994; SUN et al., 1995; GONÇALVES, 1998; MOTA, 2002; LEVI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003), na presente casuística foi o HPV-16 o mais freqüente nas pacientes HIV soropositivas, assim como a ocorrência de outros tipos virais de alto risco oncogênico, como os tipos 18, 33 e 35. No entanto, a concomitância de tipos virais em uma única paciente HIV soropositiva diferiu dos relatos da literatura, o que pode ser atribuído ao pequeno tamanho amostral.

A infecção cervical pelo HPV provoca alterações morfológicas celulares passíveis de serem identificadas pelo estudo citológico ou histopatológico. Os critérios clássicos utilizados pelos citologistas para identificação das células infectadas pelo HPV são coilocitose e disqueratose, os mesmos que os anatomopatologistas empregam ao analisar o fragmento tecidual. Nos últimos anos,

alguns pesquisadores propuseram para diagnóstico citológico da infecção pelo HPV, além dos critérios clássicos, outros, como: bi ou multinucleação, cariorexe, halo perinuclear, células parabasais colicitóticas, queratinização, núcleo hiper cromático e núcleo em fibra (IRIE et al., 2001; JORDÃO et al., 2003).

Outro aspecto relevante fornecido pelo exame colpocitológico é a classificação da flora vaginal. No presente estudo, constatou-se ao exame colpocitológico que, entre os controles, houve predomínio dos *Lactobacillus* de Döderlein em relação às pacientes pertencentes ao grupo caso. Ao contrário, a flora cervicovaginal, alterada pela presença de *Gardnerella vaginalis* e bactérias cocóides, foi preponderante entre os casos, notadamente entre as portadoras de NIC 3. A alteração da flora cervicovaginal, no pequeno número de pacientes HIV soropositivas do presente estudo, é compatível com o observado na literatura. Os fungos são os maiores oportunistas da imunossupressão, porém salienta-se o encontro de *Gardnerella vaginalis* com frequência elevada nessas pacientes. Para Hashemi et al. (1999), determinadas cepas de *Gardnerella vaginalis* ativam a expressão do HIV e, conseqüentemente, a quantidade deste vírus nas células do trato genital, facilitando sua transmissão.

Em estudo anterior ao presente, no qual foram investigadas pacientes não grávidas, HIV soropositivas, atendidas no Setor de Colposcopia do HC-UFPE, as alterações colpocitológicas foram diagnosticadas em 75,5%, entre as quais, 40% de processo inflamatório e 20,2% de NIC associada ao HPV. Na análise microbiológica do conteúdo cervicovaginal, a autora diagnosticou infecção em 73,3% dos casos, com confirmação de fungos do gênero *Candida* em 37,7% e presença de *Gardnerella vaginalis*, em 28,8%. No mesmo período do estudo, a autora identificou, entre 827 pacientes não reconhecidamente infectadas pelo HIV, ocorrência de 44,7% com processo inflamatório e 2,0% com diagnóstico de NIC (HENRIQUES, 2000).

Há décadas, o exame colposcópico tem sido utilizado na prevenção e no diagnóstico das neoplasias cervicais, complementando a colpocitologia ou orientando o melhor local para biópsia. Recentemente, esta técnica também tem sido empregada para avaliar lesões induzidas pelo HPV (GROSS, BARRASSO, 1999).

Várias alterações colposcópicas são atribuídas à infecção por HPV. Dentre os critérios maiores de atipia colposcópica, entre as portadoras de NIC, constatou-se, no atual estudo, que o epitélio acetobranco acentuado, assim como o encontro de pontilhado e mosaico áspero foram mais freqüentes nas lesões de alto grau citohistopatológico.

Esses dados diferem daqueles encontrados por Rodriguez e Sánches (1992) ao constatarem ser a leucoplasia o achado colposcópico predominante entre as portadoras de NIC por eles estudadas, cuja freqüência foi proporcional à intensidade da atipia citohistopatológica.

Apesar da sensibilidade e da especificidade da colpocitologia isolada, para rastreamento nos casos de NIC, serem consideradas baixas, quando a colposcopia e a histopatologia são associadas, os objetivos do diagnóstico precoce são atingidos, se realizadas periodicamente, obedecendo com rigor aos critérios de qualidade da técnica. Contribuem para a reduzida sensibilidade do método, entre outros fatores, os processos inflamatórios, tão freqüentes como causa de consulta ao ginecologista (KOSS, 1989). Nas pacientes HIV soropositivas, nas quais os processos inflamatórios cervicovaginais são mais freqüentes, recomenda-se a realização da colpocitologia com intervalo de tempo inferior a 12 meses, em associação com exame colposcópico (MAIMAN et al., 1991; WRIGHT et al., 1994; HENRIQUES, 2000; BRANCA et al., 1991).

A concordância de identificação da infecção cervical pelo HPV, quando utilizadas colpocitologia e PCR, no presente estudo foi regular nos casos de NIC 1, o mesmo não ocorrendo nas lesões de alto grau. No entanto, para a histopatologia, a concordância com PCR, embora fraca, foi semelhante para as lesões de alto grau.

Na literatura, demonstra-se que, com a progressão da lesão, há menor manifestação de critérios clássicos e maior de critérios não clássicos de HPV no diagnóstico morfológico. Nas lesões de alto grau citohistopatológico, o vírus parece não formar mais a partícula viral completa e apresentar somente o seu genoma integrado ao genoma da célula infectada, ganhando no poder oncogênico, o que implica em expressão citopática menos evidente ou inexistente (WIKSTRÖM, 1995; IRIE et al., 2001; JORDÃO et al., 2003).

Pode-se supor ter sido esta a causa da alteração da validade diagnóstica da colpocitologia comparada à histopatologia, das 78 pacientes com DNA-HPV positivo, que consistiu em menor sensibilidade e menor valor preditivo negativo, já que na avaliação citomorfológica foram utilizados os critérios clássicos, tanto na citologia como na histopatologia, para o diagnóstico da infecção por HPV. Salienta-se que o valor da histopatologia não reside apenas na identificação do tecido infectado ou não pelo HPV, mas, principalmente, na confirmação da gravidade da lesão, norteador o tratamento.

Na atual pesquisa, obteve-se 70,8% de concordância positiva entre colpocitologia, histopatologia e PCR, ao passo que Cavalcanti et al. (1997), comparando esses mesmos exames citohistopatológicos com hibridização *in situ*, encontraram 53,5% de concordância.

A validade da citologia no diagnóstico da infecção cervical por HPV, comparada com o encontro de colicitose no exame histopatológico, em estudo do tipo caso-controle, realizado em Campinas, mostrou sensibilidade de 35%, especificidade de 89,4%, valor preditivo positivo igual a 86,6% e valor preditivo negativo a 41,4% (SILVA, 1996), dados inferiores aos do presente estudo, exceto para este último parâmetro.

Nas pacientes HIV soropositivas, em Santos – São Paulo, houve suspeita de presença de HPV em 18,4% das lâminas estudadas, com lesões de baixo grau em 83,3% e de alto grau, em 16,6% dos casos (GONÇALVES, 1998). A existência de apenas 21,5% de pacientes HIV soropositivas na atual pesquisa pode ter sido uma das causas da diferença entre esses resultados, visto que em pacientes HIV soropositivas há maior frequência de processo inflamatório cervicovaginal, que dificulta a identificação do efeito citopático pelo HPV.

A ocorrência de 50,8% de esfregaços inflamatórios foi relatada por Fialho et al. (2002), ao estudarem 128 pacientes HIV soropositivas, 35,1% das quais com AIDS. Na casuística desses autores, o diagnóstico de NIC 1 foi 29,7%, ao passo que lesões de alto grau foram identificadas em 8,6% das pacientes. Por outro lado, processos inflamatórios ou ulcerativos locais foram atribuídos ao aumento de 10 vezes na excreção do HIV em pesquisa realizada por Wright et al. (2001),

exemplificando, segundo esses autores, como as IST representam fatores de risco na transmissão sexual do vírus da imunodeficiência humana.

Na presente pesquisa, a colicitose foi referida pelo histopatologista em 83,3% das pacientes DNA-HPV positivas. Em estudo anterior, realizado no ambulatório especializado de patologia cervical do mesmo hospital, embasado nos aspectos citohistopatológicos, diagnosticou-se NIC em 87,3% dos casos atendidos no período de 12 meses. A taxa de associação com efeito citopático do HPV foi 58,1% nos casos de NIC 1, 19,4% e 0% para NIC 2 e NIC 3, respectivamente (CAMARA et al., 2003b).

Considerando a frequência geral de DNA-HPV no estudo ora apresentado, em que 34,2% das pacientes tiveram PCR positiva, e que, dentre as 78 amostras positivas, encontraram-se 82,1% no grupo caso e 17,9% no controle, pode-se admitir que a população estudada apresenta risco elevado para neoplasia cervical. O percentual de positividade nos casos é semelhante ao encontrado na literatura: 62% referidos por Camara et al. (2003a), 78,5% por Rabelo-Santos et al. (2003), 82% relatado por Lorenzato et al. (2000) e 91,2% por Muñoz et al. (2003).

Utilizando o método de captura híbrida II, em estudo do tipo caso-controle, na cidade do México, foram identificados HPV de risco oncogênico em 88% das lesões de alto grau, 79% de NIC 1 e 21% dos controles. Os autores enfatizam o achado de tendência ascendente entre positividade do HPV oncogênico e grau de NIC (SANCHEZ et al., 2002). Essa mesma tendência foi constatada na presente pesquisa, embora em percentuais inferiores aos desses autores, provavelmente pela utilização de técnicas distintas para identificação do DNA-HPV.

Em biologia molecular, assim como em outras modalidades de diagnóstico complementar, os resultados estão condicionados à técnica empregada, no que tange à sensibilidade e especificidade.

Por meio da técnica de hibridização *in situ* com deposição de catalisador nos sítios de hibridização, Bagarelli e Oliani (2004) realizaram correlação entre presença de DNA-HPV e aspectos histopatológicos em portadoras de NIC. Dentre 54,8% das pacientes nas quais houve positividade, o padrão epissomal foi mais encontrado naquelas com NIC 1, enquanto que os padrões misto ou integrado predominaram nas lesões de alto grau. Os autores registraram ainda o encontro de 33,6% dos

casos com resultados positivos na sonda de amplo espectro e negativos na tipagem viral. Nas lesões de alto grau, encontraram maior freqüência de HPV-16 e também maior percentual de DNA-HPV não tipado, semelhante ao constatado no presente estudo.

Muñoz et al. (2003) relataram positividade de DNA-HPV indeterminado igual a 27,2%, em estudo multicêntrico, com PCR-RFLP utilizando *primers* MY09/MY11 e GP5+/6+. Dentre as 3.846 participantes de estudos do tipo caso-controle, realizados em nove diferentes países, foram também incluídas pacientes com câncer cervical invasivo e portadoras de colo normal, residentes em São Paulo. Diferentes tipos de HPV foram identificados com *primers* MY09/MY11 em 91,2% e 13,4% entre casos e controles, respectivamente. Quando utilizados os *primers* GP5+/6+, identificou-se DNA-HPV em 96,6% dos casos e 15,6% dos controles.

Para identificar DNA-HPV, utilizou-se o teste PCR, considerado entre os demais testes de biologia molecular, um dos mais sensíveis. A metodologia PCR não fornece *kits* padronizados para detecção do HPV, necessitando otimização para cada laboratório executor. A técnica RFLP permite a identificação de, pelo menos, 44 tipos distintos de HPV (BERNARD et al., 1994), além disso, pode identificar especificamente um ou múltiplos tipos de HPV na mesma amostra. Padrões complexos de RFLP podem ser de difícil interpretação, principalmente nas infecções múltiplas.

Padrões indeterminados de RFLP foram, no presente estudo, encontrados em 25 (11%) pacientes, exigindo que alguns passos adicionais fossem executados, na tentativa de identificação final do tipo específico do HPV. Por isso, a reação de seqüenciamento foi utilizada. Mesmo assim, no material examinado, a quantidade de nucleotídeos seqüenciados não foi suficiente para fornecer um resultado seguro, utilizando-se o programa de alinhamento BLASTn. O estudo complementar e o seqüenciamento do DNA-HPV da pesquisa atual serviram como material para tese de pós-graduação em Biologia Molecular na Universidade Federal de Alagoas, na qual Belo (2003) demonstrou detalhadamente os procedimentos utilizados e os resultados obtidos.

Dado que toda técnica preconizada para identificação do HPV por PCR foi seguida corretamente com *primers* MY09/MY11, a pequena quantidade de

nucleotídeos contida nas amostras indeterminadas, assim como a freqüente negatividade de DNA-HPV em portadoras de NIC, contrariando a literatura, pode ter sido resultante do momento da coleta, ou seja, segundo a metodologia proposta no estudo, a seqüência de coleta de espécimes foi: em primeiro lugar, material para colpocitologia oncótica, utilizando-se espátula de Ayre e escova *cytobrush*, e, a seguir, coleta do material para pesquisar o HPV, utilizando-se escova *cytobrush*, após retirada do muco ectocervical com gaze. É possível que a menor quantidade de células, agora coletada, e o freqüente processo inflamatório local possam ter contribuído para esse resultado. Mesmo confeccionadas com finas cerdas, as escovas utilizadas para coleta do material endocervical para colpocitologia, produziam, com freqüência, discreto sangramento, principalmente quando havia inflamação cervicovaginal. O espécime sanguinolento contém hemoglobina suficiente para impedir o processo de PCR (HARPER et al., 2004).

Mesmo no afã de identificar o vírus, não se poderia prejudicar a avaliação citomorfológica das pacientes, colhendo espécime para PCR em primeiro lugar e postergando a obtenção do espécime para estudo citológico, que resultaria no retardo do diagnóstico e do tratamento, com suas negativas conseqüências.

Os resultados de DNA-HPV indeterminado e negatividade em portadoras de NIC, da presente pesquisa, se assemelharam às de Yokoyama et al. (2003), que seguiram a mesma metodologia descrita, obtendo 80% de negatividade em pacientes NIC 1.

A influência da variação hormonal na detecção do DNA-HPV tem sido estudada, porém, os resultados são contraditórios. Enquanto que, para alguns pesquisadores, a progesterona causa esfoliação mais profunda do epitélio cervicovaginal, facilitando o encontro das células parabasais, nas quais os vírus localizam-se, e os estrogênios promovem a diferenciação e a esfoliação das células superficiais, reduzindo a positividade do teste, para outros, as fases do ciclo menstrual não afetam a identificação do HPV (HARPER et al., 2004). No presente estudo não foi levada em consideração, para efeito da análise estatística, em que fase do ciclo menstrual se encontrava a paciente por ocasião da coleta do espécime.

Para Castle et al. (2002a), a adição de nova polimerase, com melhores características enzimáticas para a reação da PCR, recentemente utilizada, também

influi nos resultados obtidos. Os autores avaliaram o desempenho desses novos testes para DNA-HPV com *primers* MY09/MY11, utilizando *Amplitaq Gold* DNA-polimerase[®] e MY-Taq[®]. Concluíram que MY-Gold[®] é mais sensível para a detecção do DNA-HPV do que MY-Taq[®] e sugeriram que, nos estudos utilizando PCR para identificação do DNA-HPV, seja informado o tipo de polimerase utilizada, com a finalidade de padronização dos testes.

Tal padronização servirá para esclarecer a história natural da infecção pelo vírus, em diferentes regiões, facilitando a utilização dos mesmos, no manejo das lesões cervicais, e a identificação dos fatores que influenciam a probabilidade de regressão ou progressão das lesões precursoras.

Estudos recentes sugerem outra hipótese para explicar a ocorrência de resultados negativos nos testes para HPV, em portadoras de neoplasias cervicais. Para alguns autores, a integração linear do genoma circular do HPV no cromossomo da célula hospedeira pode afetar a região alvo na PCR. Apesar do local preferencial da desruptura ser E2, em alguns casos, a seqüência de *primers* pode coincidir com a desruptura na região E1, dificultando a detecção do HPV, promovendo resultados falso-negativos, conforme relatado por Walboomers et al. (1999). Por outro lado, há relatos da existência de genótipos virais, que possuem menor eficiência de amplificação, os quais não são detectados pelos *primers* comumente utilizados (KLETER et al., 1999).

Recentemente, a instituição que controla o uso de medicamentos e alimentos nos Estados Unidos, *Food and Drug Administration (FDA)*, aprovou a utilização do teste de HPV em conjunto com a colpocitologia, na prevenção do câncer cervical. Esta aprovação refere-se ao método captura híbrida II, que detecta apenas HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 68), em substituição ao uso da captura híbrida I, com potencial para identificar também HPV de baixo risco, reconhecido hoje como impróprio na prevenção das neoplasias cervicais (MONK, WILEY, 2004).

Para Wright et al. (2004), a disponibilização do teste para HPV, como método adjuvante à colpocitologia na prevenção das neoplasias cervicais, é um importante avanço, porém, até o momento, não há dados comprobatórios suficientes de que esta combinação promoverá melhores resultados, redução dos custos ou melhor

aceitação pelas mulheres do que a colpocitologia isolada. Além do mais, para os mesmos autores, metade dos casos de câncer cervical surge entre aquelas que não participam do rastreamento regular. Reconhecem ainda como elevadas a sensibilidade e a especificidade dos dois exames na detecção das lesões de alto grau, quando utilizados em conjunto, em mulheres com idade superior a 30 anos.

Observa-se um considerável aumento de solicitação dos testes de HPV para a prevenção das neoplasias cervicais, em alguns casos, antecedendo o estudo citomorfológico, inclusive para mulheres jovens, nas quais a prevalência da infecção cervical pelo HPV é elevada e transiente. Ressalte-se que a prevalência do HPV é inversamente proporcional à idade (HERRERO et al., 2000; MONSONEGO et al., 2004).

A infecção pelo HPV já foi admitida como doença crônica, à semelhança da infecção pelo HIV, em que a resolução espontânea não ocorre. Para Chan et al. (2002b), há regressão de NIC 2 e NIC 3 em 58% e 47% dos casos, respectivamente, apenas após a biópsia. Cerca de 15% das mulheres, que submetem-se rotineiramente aos testes preventivos e que possuem citologia negativa e DNA-HPV de alto risco, terão citologia anormal em cinco anos (CASTLE et al., 2002b). Por outro lado, tornar-se sabedora de ser infectada pelo HPV provoca, na maioria das mulheres, sentimentos variados, tais como: medo, raiva, culpa, ansiedade, remorso e pânico. Além do mais, ao receber o resultado positivo do teste de HPV, com frequência, a mulher põe em dúvida a fidelidade sexual do parceiro.

Para Anhang et al. (2004), estes fatos sugerem que o público, especialmente as mulheres, é pouco informado sobre o vírus, as conseqüências desta infecção e a história natural das neoplasias cervicais. Para esses autores, com o intuito de promover a informação verdadeira sobre o HPV, evitando-se as conseqüências da ignorância, alguns pontos devem ser rotineiramente alardeados: a infecção pelo HPV é sexualmente transmissível; infecção pelo HPV é mais comum entre mulheres sexualmente ativas; a maioria das mulheres com infecção pelo HPV não vai desenvolver câncer; o propósito da colpocitologia é detectar anormalidades celulares, inclusive câncer ou lesões precursoras, induzidas ou não pelo HPV.

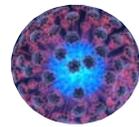
Diante do exposto, admite-se que a identificação de tipos de HPV, associados às neoplasias genitais, em diferentes regiões geográficas, tem implicações nas

estratégias de prevenção do câncer, incluindo o desenvolvimento de vacinas efetivas, porém o grande fator limitante das metodologias moleculares é o elevado custo, tornando-as inviáveis para o exame de grandes populações, para programas governamentais de saúde ou, até mesmo, como procedimento rotineiro em serviços de saúde privados, apesar de alguns autores proporem o teste de DNA para HPV como complemento para triagem citológica.

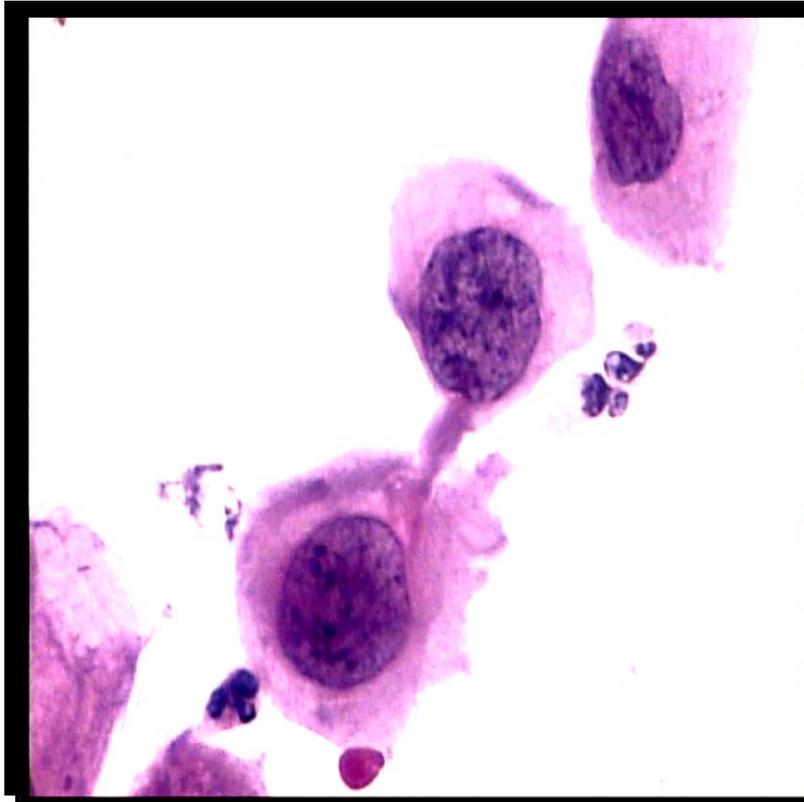
É possível que o surgimento de novas técnicas em biologia molecular ou o aprimoramento das atuais facilite a utilização das mesmas em larga escala, reduzindo o custo.

No mundo atual, globalizado e sem fronteiras, torna-se imperativo o médico ter um vasto conhecimento, mesclando, inteligente e humanamente, o que há de melhor para beneficiar suas pacientes. Assim sendo, face aos resultados do presente estudo e à realidade socioeconômica das pacientes, o diagnóstico definitivo das lesões neoplásicas deve ser embasado nas alterações da morfologia celular, utilizando-se a colpocitologia oncótica como rastreo, aliada sempre à colposcopia e à histopatologia em programa abrangente e eficaz de prevenção, e, quando possível, à biologia molecular.

O estudo permitiu identificar grupos que têm uma maior probabilidade de desenvolver NIC, quais sejam, aquelas pacientes portadoras de HPV de alto risco, com antecedente de DST, que tiveram início precoce da relação sexual e as tabagistas. Para esses grupos de pacientes deve haver um esforço maior dos programas de prevenção, no sentido de identificá-los e, a seguir, garantir um atendimento diferenciado com os métodos de diagnóstico e aconselhamento, objetivando evitar o surgimento ou a progressão dessas lesões.

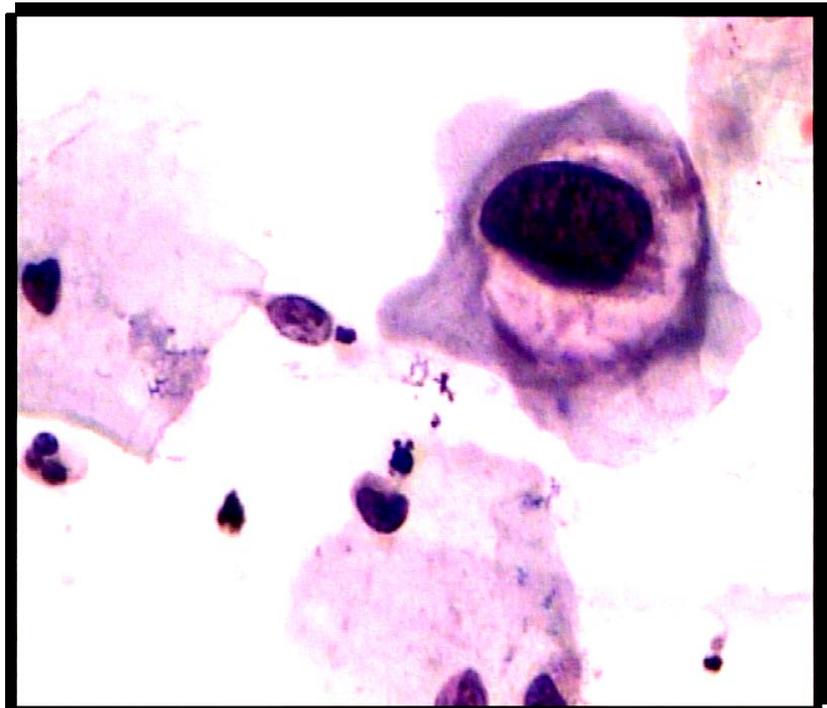


Microfotografia do HPV



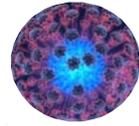
Colpocitologia – 400X – Células metaplásicas escamosas. Exibindo citoplasma bem delimitado, núcleos volumosos com alteração núcleo-citoplasmática, leve irregularidade nuclear e cromatina finamente granular com cromocentros – Lesão de alto grau

Colpocitologia – 400X – Célula escamosa, intermediária, exibindo núcleo volumoso, hiper-cromático, com cromatina condensada. Presença de cavitações perinucleares, com bordas bem demarcadas, características de coilocito. Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (NIC 1), associada a alterações citopáticas pelo HPV



6 CONCLUSÕES

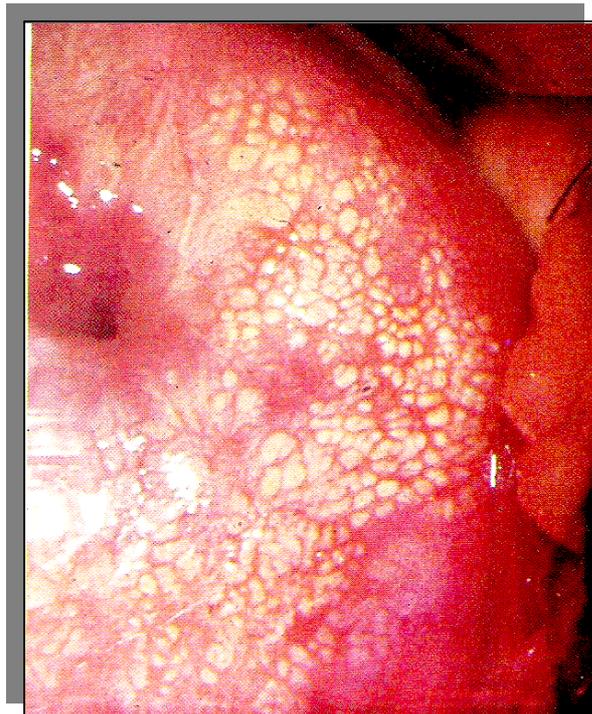
- Foram identificados como fatores de risco para NIC: infecção cervical por HPV de alto risco oncogênico, referência de DST anterior, início precoce de relações sexuais e tabagismo. A soropositividade para HIV mostrou-se como fator protetor para NIC. A associação com cada um desses fatores é independente da associação com os demais.
- Não se observou associação entre NIC e faixa etária, estado civil, nível de instrução, número de gestações e uso de contraceptivo. A associação com grau de instrução e número de parceiros sexuais permaneceram na análise multivariada.
- Para as pacientes sem patologia cervical, houve quatro casos de HPV de alto risco oncogênico 51, variante 51 e variante 58. Em presença de NIC, identificaram-se os tipos: 13, 16, 18, 33, 35, 44, 51, 52, 58, 67, 83 e CP141/LVX, além dos variantes 16, 33, 44, 51, 58 e 83.
- Os HPV-16 e variante 16 foram mais freqüentes nos casos de lesão cervical de alto grau.
- Em presença de positividade de DNA-HPV, a colpocitologia apresentou boa concordância com o encontro de colicitose no exame histopatológico pelo teste de Kappa.
- Nas pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical, houve predomínio de epitélio acetobranco acentuado e mosaico áspero nas pacientes com NIC 2 ou NIC 3, diagnosticados pela colpocitologia e pela histopatologia.



Microfotografia
do HPV



Colpofotografia Ectopia cervical



**Colpofotografia
Mosaico**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1

ADAM, E.; BERKOVA, Z.; DAXNEROVA, Z.; ICENOGLE, J.; REEVES, W. C.; KAUFMAN, R. H. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. **Am J Obstet Gynecol**, v. 182, n. 2, p. 257-264, 2000.

ANHANG, R.; STRYKER, J. E.; WRIGHT, T. C.; GOLDIE, S. J. News media coverage of human Papillomavirus. **Cancer**, v. 100, n. 2, p. 308-314, 2004.

BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. Tipagem e estado físico de Papilomavírus humano por hibridização *in situ* em lesões intra-epiteliais do colo uterino. **RBGO**, v. 26, n. 1, p. 59-64, 2004.

BECKER, T. M.; WHEELER, C. M.; MCGOUGH, N. S.; PARMENTER, C. A.; JORDAN, S. W.; STIDLEY, C. A.; MCPHERSON, S.; DORIN, M. H. Doenças sexualmente transmissíveis e outros fatores de risco para displasia cervical em mulheres hispânicas e brancas não hispânicas do Sudoeste. **JAMA**, v. 271, p. 1181-1188, 1994.

BELO, M. L. M. **Seqüenciamento de DNA e diagnose eletrônica de tipos indeterminados de Papillomavirus humano (HPV) em Alagoas e Pernambuco**. 2003. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e Naturais. Departamento de Química. Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. 2003. 85p.

BEREK, J. S. Simplification of the New Bethesda 2001 Classification System. **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, p. S2-5, 2003.

BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M.; ONG, C. K.; VILLA, L. L.; DELIUS, H.; PEYTON, C. L.; BAUER, H. M.; WHEELER, C. M. Identification and assessment of known and novel human Papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Inf Dis**, v. 170, p. 1077-1085, 1994.

BIBBO, M. **Comprehensive cytopathology**. 1st. ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1991.

BOSCH, F. X.; FRANCO, E. **HPV e câncer cervical**. **Epidemiologia**. Disponível em <http://www.digene.com.br>. Acesso em 30/05/2003.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V. The causal relation between human Papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, p. 244-265, 2002.

¹ Referências Bibliográficas elaboradas com base na NBR 6023 ABNT de agosto de 2000

BOSCH, F. X.; MANOS, M. N.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human Papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, n. 11, p. 796-802, jun. 1995.

BOUGHART, E. Site and origin of squamous clinical cancer: a histomorphologic study. **Obstet Gynecol**, v. 62, p. 117-127, 1983.

BRANCA, M.; ROSSI, E.; ALDERISIO, M.; MIGLIORE, G.; MOROSINI, P. L.; VECCHIONE, A.; SOPRACORDEVOLE, F.; MUDU, P.; LEONCINI, L.; BRINTON, L. A. Oral contraceptives and cervical neoplasia. **Contraception**, v. 43, n. 6, p. 581-95, jun. 1991.

BRINTON, L. A. Oral contraceptives and cervical neoplasia. **Contraception**, v. 43, n. 6, p. 581-595, 1991.

BRINTON, L. A.; HOOVER, R. N. Epidemiology of gynecologic cancers. In: HOSKINS, W. J.; PEREZ, C. A.; YOUNG, R. C. (ed). **Principles and practice of gynecologic oncology**. Philadelphia: Lippincott, p. 3-26, 1992.

BRINTON, L. A.; REEVES, W. C.; BRENES, M. M.; HERRERO, R.; GAITAN, E.; TENORIO, F.; BRITTON, R. C.; GARCIA, M.; RAWLS, W. E. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. **Int J Cancer**, v. 44, p. 199-203, 1989.

BURK, R. D.; TERAJ, M.; GRAVITT, P. E.; BRINTON, L. A.; KURMAN, R. J. BARNES, W. A. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. **Cancer Research**, v. 63, p. 7215-7220, 2003.

CAMARA, G. N. L.; CERQUEIRA, D. M.; OLIVEIRA, A. P. G.; SILVA, E. O.; CARVALHO, L. G. S.; MARTINS, C. R. F. Prevalence of human Papillomavirus types in women with pré-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 98, n. 7, p. 879-883, 2003a.

CAMARA, P. D.; PIRES, T.; ALVES, J. R.; CASTRO, I.; BARBOSA, M. Incidência das patologias cervicais das pacientes do Ambulatório de Patologia cervical do HC – UFPE. 50^o Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia. **Anais...** 2003b.

CAMPION, M. J.; McCONCE, D. J.; CUZICK, J. Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study. **Lancet**, v. 2, p. 237-240, 1986.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V.; SANJOSÉ, S.; ELUF-NETO, J, et al. Male circumcision, penile human Papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. **N Engl J Med**, v. 346, n. 15, p. 1105-1111, 2002.

CASTLE, P. E.; SCHIFFMAN, M.; GRAVITT, P. E.; KENDALL, H.; FISHMAN, S.; DONG, H.; HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; BRATTI, M. C.; SHERMAN, M. E.; LORINCZ, A.; SCHUSSLER, J. E.; BURK, R. D. Comparisons of HPV DNA detection by MYO9/11 PCR methods. **J Med Virol**, v. 68, p. 417-423, 2002a.

CASTLE, P. E.; WACHOLDER, S.; SHERMAN, M. E.; LORINCZ, A. T.; GLASS, A. G.; SCOTT, D. R.; RUSH, B. B.; DEMUTH, F.; SCHIFFMAN, M. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human Papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. **CANCER**, v. 95, n. 10, p. 2145-2151, nov. 2002b.

CAVALCANTI, S. M. B.; ZARDO, L. G.; OLIVEIRA, H. S. Human Papillomavirus infection: correlation of colposcopy, cytology, histopathology and in situ hybridization. **J Bras Patol**, v. 33, n. 2, p. 62-69, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Epidemiologic notes and reports risk for cervical disease in HIV-infected women – New York City. **MMWR**, v. 39, n. 47, p. 846-849, nov. 1990.

CHAN, P. K. S.; LAM, C. W.; CHEUNG, T. H.; LI, W. W. H.; LO, K. W. K.; CHAN, M. Y. M.; CHEUNG, J. L. K.; XU, L. Y.; CHENG, A. F. Human Papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in Southern China. **J Infect Dis**, v. 186, p. 696-700, 2002a.

CHAN, P. K. S.; MAK, K. H.; CHEUNG, J. L. K.; TANG, N. L. S.; CHAN, D. P. C.; LO, K. K.; CHENG, A. F. Genotype spectrum of cervical human Papillomavirus infection among sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong. **J Med Virol**, v. 68, p. 273-277, 2002b.

CHANG, D. Y.; CHEN, R. J.; LEE, S. C. Prevalence of single and multiple infection with human Papillomavirus in various grades of cervical neoplasia. **J Med Microbiol**, v. 46, p. 54-60, 1995.

COHN, J. A.; GAGNON, S.; SPENCE, M. R.; HARRISON, D. D.; KLUZAK, T. R.; LANGENBERG, P.; BRINSON, C.; STEIN, A.; HELLINGER, J. The role of human Papillomavirus deoxyribonucleic acid assay and repeated cervical cytologic examination in the detection of cervical intraepithelial neoplasia among human immunodeficiency virus-infected women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 184, p. 322-330, 2001.

COSTA, F. C. P. **Diagnóstico do Papilomavírus humano através de PCR seqüenciamento de DNA e Biologia computacional**. 2004. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e Naturais (Universidade Federal de Alagoas – UFAL). 2004. 85p.

CULLEN, A. P.; REID, R.; CAMPION, M.; LORINCZ, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **J Virol**, v. 65, p. 606, 1991.

CULLEN, T. S. **Cancer of the uterus**. NY: Appleton, 1900.

DUERR, A.; KIEKE, B.; WARREN, D.; SHAH, K.; BURK, R.; PEIPERT, J. F.; SCHUMAN, P.; KLEIN, R. S. Human Papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 184, n. 4, p. 584-590, 2001.

DYBIKOWSKA, A.; LICZNERSKI, P.; PODHAJSKA, A. HPV detection in cervical cancer patients in northern Poland. **Oncol Reports**, v. 9, p. 871-874, 2002.

ELLERBROCK, T. V.; CHIASSON, M. A.; BUSH, T. J.; SUN, X. W.; SAWO, D.; BRUDNEY, KI.; WRIGHT, T. C. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **JAMA**, v. 283, n. 8, p. 1031-1037, feb. 2000.

FERENCZY, A.; WRIGHT, T. C. JR. Anatomy and histology of the cervix. In: KURNAN, R. **Blaustein's pathology of the female genital tract**. 5th ed. New York, NY: Springer; 2002.

FIALHO, S. C. A.V.; ALMEIDA FILHO, G. L.; PASSOS, M. R. L.; MALDONADO, P. M.; VAL, I. C.; ANDRADE, A. C. V. Cytological abnormalities and the accuracy cytology as the screening method in HIV seropositives/AIDS women. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v. 14, n. 1, p. 16-19, 2002.

FLEISS, J. L. **Statistical methods for rates and proportions**. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, p. 44-45, 1981.

FLEMING, D. T.; WASSERHEIT, J. N. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. **Sex Transm Inf**, v. 75, p. 3-17, 1999.

FRANCO, E. Epidemiology of anogenital warts and cancer. In: REID, R.; CORINCZ, A. (ed). **Human Papillomaviruses: obstetrics and gynaecology clinics of North America**. Philadelphia: WB Saunders. 1996. p. 597-623.

FRANCO, E. L. The sexually transmitted disease model for cervical cancer: incoherent epidemiologic findings and the role of misclassification of human Papillomavirus infection. **Epidemiol**, v. 2, p. 98-106, 1991.

FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; PRADO, J. M.; ROUSSEAU, M. C.; DÉSY, M.; ROHAN, T. E. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human Papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **J Infect Dis**, v. 180, p. 1415-1423, 1999a.

FRANCO, E. L.; VILLA, L.; ROHAN, T.; FERENCZY, A.; PETZI-ERLER, M.; MATLASHEWSKI, G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human Papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. **Pan Am J Public Health**, v. 6, n. 4, p. 223-233, 1999b.

FRANCO, E. L.; DUARTE, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human Papillomavirus infection. **CMAJ**, v. 164, n. 7, p. 1017-1025, 2001.

- FREGA, A.; STENTELLA, P.; IORIS, A. D.; PIAZZE, J. J.; FAMBRINI, M.; MARCHIONNI, M.; COSMI, E. V. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human Papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. **Cancer Letters**, v. 196, p. 127-134, 2003.
- GALLOWAY, D. A.; McDOUGALL, J. K. The viral DNA integration and carcinogenesis. **Adv Virus Res**, v. 37, p. 125-171, 1989.
- GIULIANO, A. R.; DENMAN, C.; ZAPIEN, J. G.; HENZE, J. L. N.; ORTEGA, L.; DJAMBAZOV, B.; GALAZ, E. M. B.; HATCH, K. Design and results of the USA México border human Papillomavirus (HPV), cervical dysplasia, and *Chlamydia trachomatis* study. **Pan Am J Public Health**, v. 9, n. 3, p. 172-181, 2001.
- GIULIANO, A. R.; PAPENFUSS, M.; GALAZ, E. M. B.; FENG, J.; ABRAHAMSEN, M.; DENMAN, C.; ZAPIEN, J. G.; HENZE, J. L. N.; GARCIA, F.; HATCH, K. Risk factors for squamous intraepithelial lesions (SIL) of the cervix among women residing at the US-Mexico border. **Int J Cancer**, v. 109, p. 112-118, 2004.
- GIULIANO, A. R.; SEDJO, R. L.; ROE, D. J.; HARRIS, R.; BALDWIN, S.; PAPENFUSS, M. R.; ABRAHAMSEN M.; INSERRA, P. Clearance of oncogenic human Papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). **Cancer Causes Control**, v. 13, p. 839-846, 2002.
- GONÇALVES, M. A. G. **Prevalência da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) e de neoplasia intra-epitelial genital em amostra de mulheres HIV-positivas da cidade de Santos, SP**. 1998. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998. 149p.
- GONZÁLEZ-LOSA. M. R.; TERAN, M. A. L. M.; PUERTO-SOLÍS, M.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. **J Clin Virol**, v. 29, p. 95-98, 2004.
- GREENBLAT, M. S.; BENNET, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res**, v. 54, p. 485-487, 1994.
- GROSS, G. E.; BARRASSO, R. **Infecção por Papilomavírus humano. Atlas clínico de HPV**. Porto Alegre: Artmed, p. 1-432, 1999.
- HARMSEL, B. T.; SMEDTS, F.; KUIJPERS, J. Relationship between human Papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. **Obstetrics Gynecology**, v. 93, p. 46-50, 1999.
- HARPER, D. M.; LONGACRE, M. R.; NOLL, W. W.; BELLONI, D. R.; COLE, B. F. Factors affecting the detection rate of human Papillomavirus. **Ann Fam Med**, v. 1, p. 221-227, 2004.
- HASHEMI, F. B.; GHASSEMI, M.; ROEBUCK, K. A.; SPEAR, G. T. Activation of human immunodeficiency virus type 1 expression by *Gardnerella vaginalis*. **J Infect Dis**, v. 179, p. 924-930, 1999.

- HAVERKOS, H.; ROHERER, M.; PICKWORTH, W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. **Biomed & Pharmacother**, v. 54, p. 54-59, 2000.
- HELBERG, D.; NILSSON, S.; HALEY, N. J.; HOFFMAN, D.; WYNDER, E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia nicotine and cotidine in serum and cervical mucus in smokers and non-smokers. **Am J Obstet Gynecol**, v. 158, p. 910-913, 1998.
- HENRIQUES, A. P. C. **Infecções genitais em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) acompanhadas no Hospital das Clínicas da UFPE**. 2000. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical. Recife 2000. 96p.
- HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; BRATTI, C.; SHERMAN, M. E.; HUTCHINSON, M.; MORALES, J. et al. Population-based study of human Papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J Natl Cancer**, v. 92, p. 464-474, 2000.
- HERRERO, R.; SCHIFFMAN, M. H.; BRATTI, C. Design and methods of a population-based natural history study of cervical neoplasia in a rural province of Costa Rica. **Pan Am J Public Health**, v. 1, p. 362-374, 1996.
- HINSELMANN, H. Verbesserung der inspektionmöglichkeiten con vulva und portio. **Münch. Med Wehr**, v. 72, p. 1733, 1925.
- HO, G. Y. F.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C. J.; BURK, R. D. Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med**, v. 338, p. 423-428, 1998.
- HO, G. Y. F.; STUDENTSOV, Y.; BIERMAN, R.; BURK, R. D. Natural history of human Papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. **Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention**, v. 13, p. 110-116, 2004.
- HO, G. Y. F.; STUDENTSOV, Y.; HALL, C. B.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; LEMPA, M.; BURK, R. D. Risk factors for subsequent cervicovaginal human Papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. **J Infect Dis**, v. 186, p. 737-42, 2002.
- HOWLEY, P. M. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (ed). **Fields virology**. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven, p. 1045-1076, 1996.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon France, v. 49, p. 1-409, 1995.
- IRIE, M. M.; SUZUKI, L. E. O; YOSHIDA, C. S. O; LOPES, D. C.; CONSOLARO, M. E. L. Evaluation of the HPV classicals and not classicals morphological criteria in the colposcycological diagnosis. **Arq Ciên Saúde Unipar**, v. 5, n. 3, p. 259-265, 2001.

JORDÃO, A. V.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R.; PIVA, S.; CONSOLARO, M. E. L. Application of non-classical morphological criteria in the cytological diagnosis of human Papillomavirus. **J Bras Patol Med Lab, Rio de Janeiro**, v. 39, n. 1, p. 81-89, 2003.

KAHN, J. A. An update on human Papillomavirus infection and Papanicolaou smears in adolescents. **Curr Opin Pediatr**, v. 13, p. 303-309, 2001.

KARLSSON, R.; JONSSON, M.; EDLUND, K.; EVANDER, M.; GUSTAVSSON, A.; BODÉN, E.; RYLANDER, E.; WADELL, G. Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human Papillomavirus infection: a population-based study. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 22, n. 2, p. 119-127, 1995.

KJAER, S. K.; VAN DEN BRULE, A. J. C.; PAULL, G.; SVARE, E. I.; SHERMAN, K. E.; THOMSEN, B. L.; SUNTUM, M.; BOCK, J. E.; POLL, P. A.; MEIJER, J. L. M. 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**, v. 325, p. 572-576, sep 14. 2002.

KLETER, B.; SCHRAUWEN, M.; MILIJIN, A.; SASTROWIJOTO, S. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human Papillomavirus. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 2508-2517, 1999.

KOSS, I. G. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. **JAMA**, v. 261, n. 5, p. 737-743, feb 3. 1989.

KOUTSKY, L. A.; HOLMES, K. K.; CRITCHLOW, C. W.; STEVENS, C. E.; PAAVONEN, J.; BECKMANN, A. M.; DEROUEN, T. A.; GALLOWAY, D. A.; VERNON, D.; KIVIAT, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to Papillomavirus infection. **N Engl J Med**, v. 327, n. 18, p. 1272-1278, oct. 1992.

KWASNIEWSKA, A.; TUKENDORF, A.; GOZDZICKA-JÓZEFIAK, A.; SEMCZUK-SIKORA, A.; KOROBOWICZ, E. Content of folic acid and free homocysteine in blood serum of human Papillomavirus-infected women with cervical dysplasia. **Eur J Gynaec Oncol**, XXIII, n. 4, p. 311-316, 2002.

LAI, W.; CHEN, C. Y.; MORSE, S. A.; HTUN, YE.; FEHLER, H. G.; LIU, H.; BALLARD, R. C. Increasing relative prevalence of HSV-2 infection among men with genital ulcers from a mining community in South Africa. **Sex Transm Infect**, v. 79, p. 202-207, 2003.

LANE, D. P53 guardian of the genome. **Nature**, v. 358, p. 15-16, 1992.

LEVI, J. E.; FINK, M. C. S.; CANTO, C. L. M.; CARRETIERO, N.; MATSUBARA, R.; LINHARES, I.; DORES, G. B.; CASTELO, A.; SEGURADO, A.; ELUF NETO, D. E. U. J. Human Papillomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. **BJID**, p. 129-134, jun. 2002.

LIAW, K. L.; GLASS, A. G.; MANOS, M.; GREER, C. E.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M.; BURK, R. D.; KURMAN, R. J.; WACHOLDER, S.; RUSH, B. B.; CADELL, D. M.; LAWLER, P.; TABOR, D.; SCHIFFMAN, M. Detection of human Papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 11, p. 954-960, jun. 1999.

LORENZATO, F. R. B. Cervical cancer prevention and the role of human Papillomavirus. 2001. Tese (Doutorado) – University College of London. London. 2001. 249p.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L. C.; DE BATISTA, L. R.; LUBAMBO, T. The use of human Papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**, v. 10. p. 143-150, 2000.

LORENZATO, F.; SINGER, A.; MOULD, T.; SANTOS, L. C.; MAIA, A.; CARIRI, L. Cervical cancer detection by hybrid capture TM and evaluation of local risk factors. **Int J Gynecol Obstet**, v. 73, p. 41-46, 2001.

MACIAG, P. C. **Infecções por Papilomavírus humano e neoplasia do colo uterino: efeito do polimorfismo dos genes HLA-DRB1 e DQB1 e respostas linfoproliferativas contra peptídeos virais**. 2002. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química. São Paulo. 2002. 132p.

MAICHE, A. G.; PYRHÖNEN, S. Risk of cervical cancer among wives of men with carcinoma of the penis. **Acta Oncol**, v. 29, fasc. 5, p. 569-571, 1990.

MAIMAN, M.; TARRICONE, N.; VIEIRA, J.; SUAREZ, J.; SERUR, E.; BOYCE, J. G. Colposcopic evaluation of human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstet Gynecol**, v. 78, n. 1, p. 84-88, jul. 1991.

MALIK, S. N.; WILKINSON, E. J.; DREW, P. A.; HARDT, N. S. Benign cellular changes in pap smears. Causes and significance. **Acta Cytologica**, v. 45, n. 1, p. 5-8, 2001.

MANOS, M. M.; KINNEY, W. K.; HURLEY, L. B.; SHERMAN, M. E.; SHIEH-NGAI, J.; KURMAN, R. J.; RANSLEY, J. E.; FETTERMAN, B. S.; MCINTOSH, K. M.; PAWLICK, G. F.; HIATT, R. A. Identifying women with cervical neoplasia. Using human Papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. **JAMA**, v. 281, n. 17, p. 1605-1609, 1999.

MONK, B. J.; WILEY, D. J. Human Papillomavirus infections. Truth or consequences. **Cancer**, v. 100, n. 2, p. 225-227, 2004.

MONSONEGO, J.; BOSCH, F. X.; COURSAGET, P.; COX, J. T.; FRANCO, E.; FRAZER, I.; SANKARANARAYANAN, R.; SCHILLER, J.; SINGER, A.; WRIGHT, T.; KINNEY, W.; MEIJER, C. LINDER, J. Cervical cancer control, priorities and new directions. **Int J Cancer**, v. 108, p. 329-333, 2004.

- MONSONEGO, J.; MAGDALENAT, H.; CATALAN, F. Estrogen and progesterone receptors in cervical human Papillomavirus related lesions. **Int J Cancer**, v. 48, p. 533-539, 1991.
- MONTOYA-FUENTES, H.; SUÁREZ RINCÓN, A. E.; RAMÍREZ-MUÑOZ, M. P.; ARÉVALO-LAGUNAS, I.; MORÁN MOGUEL, M. C.; GALLEGOS ARREOLA, M. P.; FLORES-MARTÍNEZ, S. E.; ROSALES QUINTANA, S.; SÁNCHEZ CORONA, J. Detección de Papillomavirus humano tipos 16, 18, 35 y 58 en cáncer cervicouterino y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado en el occidente de México: correlación clínico-molecular. **Obstet Gynecol (México)**, v. 69, p. 137-142, apr. 2001.
- MORENO, V.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V.; WALBOOMERS, J. M. M.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human Papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **LANCET**, v. 359, p. 1085-1092, mar 30, 2002.
- MOSCICKI, A. B.; SHIBOSKI, S.; BROERING, K.; POWELL, L.; STONE, J.; PALEFSKY, J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. **J Pediatr**, v. 132, p. 277-284, 1998.
- MOTA, G. R. **Avaliação da infecção e caracterização de tipos de Papilomavírus humano (HPV) em gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina. São Paulo. 2002. 89p.
- MUÑOZ, N. Valor del test del virus del papilloma humano en el diagnóstico y cribado de la neoplasia cervical. **Med Clin (Barc)**, v. 121, n. 12, p. 455-456, 2003.
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. **The epidemiology of cervical cancer and human Papillomavirus**. Oxford, UK. Oxford University Press. 1992. p. 251-261.
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. E.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, J. L. M. Epidemiologic classification of human Papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, p. 518-527, feb. 2003.
- NAKAO, Y.; YANG, X.; YOKOYAMA, M.; PATER, M. M.; PATER, A. Malignant transformation of human ectocervical cells immortalized by HPV 18: *in vitro* model of carcinogenesis by cigarette smoke. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 577-583, 1996.
- NCBI. **National Center for Biotechnology**. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 23/07/2004.
- OLIVEIRA, L. H. S.; RODRIGUES, E. V. M.; LOPES, A. P. T. A. S.; FERNANDEZ, A. P.; CAVALVANTI, S. M. B. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA changes in p53 gene. **São Paulo Med J**, v. 121, n. 2, p. 67-71, 2003.

- PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 4, p. 415-428, 1995.
- PALEFSKY, J. M.; MINKOFF, H.; KALISH, L. A.; LEVINE, A.; SACKS, H. S.; GARCIA, P.; YOUNG, M.; MELNICK, S. MIOTTI, P. BURK, R. Cervicovaginal human Papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 3, p. 226-236, feb. 1999.
- PATER, M. M.; MITTAL, R.; PATER, A. Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human Papillomavirus. **Trends Microbiol**, v. 2, p. 229-234, 1994.
- PHILIPS, A. N.; SMITH, G. Cigarette smoking as a potential cause of cervical cancer: has confounding been controlled. **Int Epidemiol**, v. 23, p. 42-49, 1994.
- POPPE, W. A. J.; PEETERS, R.; Van ASSCHE, F. A. Cervical cotidine and macrophage-Langerhans cell density in the normal human uterine cervix. **Gynecol Obstet Invest**, v. 41, p. 253-259, 1995.
- QUEIROZ, C. M. P. **Expressão de proteínas do ciclo celular e de moléculas de adesão na carcinogênese cervical**. 2003 128 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Salvador.
- RABELO-SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; AMARAL, R. G.; MAGALHÃES, A. V. Human Papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, mar. 2003.
- REAGAN, J. W.; HARMONIC, M. J. Dysplasia of the uterine cervix. **Ann NY Acad Sci**, v. 63, p. 1236-1244, 1956.
- RIBEIRO, E. R. **Biologia e patologia do colo uterino**. cap. 3. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1994. p. 5-19.
- RICHART, R. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obst Gynecol**, v. 75, p. 131-133, 1990.
- RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. A review. In: SOMMERS, S. C. (ed). **Citology**. New York: Path Ann Appleton, 1973. p. 301-328.
- RICHART, R. M. Natural history of the cervical intraepithelial neoplasia. **Clin Obstet Gynecol**, v. 110, p. 110-148, 1967.
- RIOU, G.; FAVRE, M.; JEANNEL, D.; ORTH, G. Human Papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 335, p. 1171-1174, 1990.
- ROCHE, J. K.; CRUM, C. P. Local immunity and the uterine cervix: implications for cancer-associated viruses. **Cancer Immunol Immunother**, v. 33, p. 203-209, 1991.

- RODRÍGUEZ, C. A. D.; SÁNCHEZ, A. Correlación citológica e histológica de las imágenes colposcópicas en el diagnóstico de neoplasia cervical. **Rev Colombiana Obstet Ginecol**, v. 43, n. 2, p. 122-133, 1992.
- RUBIN, I. C. The pathological diagnosis of incipiente carcinoms of the uterus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 62, p. 668-676, 1910.
- SÁNCHEZ, J. L. G.; BRAMBILA, J. C.; HERNÁNDEZ, D. M. H.; SÁNCHEZ, S. M.; CARRANCA, A. G. Infección por virus del Papiloma humano de alto y bajo riesgo en mujeres con NIC. Características diferenciales. **Gynecol Obstet (México)**, v. 70. p. 11-16, 2002.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polycrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 915-214, 1994.
- SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, A. G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; WACHOLDER, S.; STATON, C. K.; MANOS, M. M. Epidemiologic evidence showing that human Papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Nat Cancer Inst**, v. 85, n. 12, p. 958-964, jun. 1993.
- SCHIFFMAN, M. H.; BRINTON, L. A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer**, v. 76, p. 1888-1901, 1995.
- SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; SHERMAN, M. E.; BRATTI, M.; WACHOLDER, S.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; MORALES, J.; GREENBERG, M. D.; LORINCZ, A. T. HPV DNA testing in cervical cancer screening results from women in a high-risk province of Costa Rica. **JAMA**, v. 283, n. 1, p. 87-93, jan. 2000.
- SCHLESSELMAN, J. J. **Case- control studies. Design, conduct, analysis**. New York:Oxford University Press, cap 6. 1982. p. 145-170.
- SHAH, K.; SOLOMON, L.; DANIEL, R.; COHN, S.; VLAHOW, D. Comparison of PCR and hybrid capture methods for detection of human Papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 517-519, 1997.
- SHAPIRO, S.; ROSENBERG, L.; HOFFMAN, M.; KELLY, J. P. et al. Risk of invasive cancer of the cervix in relation to the use of injectable progestogen contraceptives and combined estrogen/progestogen oral contraceptives (South Africa). **Cancer Causes and Control**, v. 14, p. 485-495, 2003.
- SILVA, C. S.; SOUZA, M. A. H.; ÂNGELO, A. G.; PAVANI, R.; ADAD, S. J.; MURTA, E. F. C. Increased frequency of abnormal Papanicolaou smears in adolescents. **Arch Gynecol Obstet**, v. 266, p. 154-156, 2002.
- SILVA, E. M. A. F. **Características epidemiológicas e doenças do trato genital inferior associadas à infecção por HIV em mulheres sob risco de doenças de**

- transmissão sexual**. 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Campinas – UNICAMP. 1996. 139p.
- SILVA, R. J. O.; REIS, A. F. F.; RUSSOMANO, F. B.; FIALHO, S. C. A. V.; GRINSZTEJN, B. Cervical intraepithelial lesions among HIV infected patients. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v. 15, n. 3, p. 16-20, 2003.
- SILVANY FILHO, A. M. Lesões precursoras do câncer do colo do útero. In: DIAS, H. E. A. **Manual do câncer ginecológico**. cap. 5. Rio de Janeiro: Revinter. 1998. p. 47-79.
- STAFIL, A.; WILBANKS, D. An international terminology of colposcopy: report of the Nomenclature Committee of the International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstet Gynecol**, v. 77, n. 2, p. 313-314, feb. 1991.
- STIER, E. Cervical neoplasia and the HIV-infected patient. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 17, p. 873-878, 2003.
- SUN, X. W.; ELLERBROCK, T. V.; LUNGU, O.; CHIASSON, M. A.; BUSH, T. J.; WRIGHT, T. C. Human Papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstet Gynecol**, v. 85, m. 5, part 1, p. 680-686, may. 1995.
- SYRJÄNEN, K.; MÄNTYJÄRVI, R.; VÄYRYNEN, M.; SYRJÄNEN, S.; PARKKINEN, S.; YLISKOSKI, M.; SAARIKOSKI, S.; CASTREN, O. Human Papillomavirus (HPV) infections involved in the neoplastic process of the uterine cervix as established by prospective follow-up of 513 women for two years. **Eur J Gynaec Oncol**, v. 8, p. 5-16, 1987.
- TING, Y.; MANOS, M. M. Detection and typing of genital human Papillomavirus. In: INNIS, A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, p. 356-367, 1990.
- UCHIMURA, N. S. **Alterações das células de Langerhans e sua relação com lesão histopatológica do colo uterino por Papilomavírus humano em pacientes com captura híbrida positiva**. 2002. Tese (doutorado em Medicina) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo. 2002. 97p.
- Van der BURG, S. H.; RESSING, M. E.; KWAPPENBERG, K. M. C.; de JONG, A.; STRAATHOF, K.; de JONG, J.; GELUK, A.; van MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K. L. M. C.; OTTENHOFF, T. H. M.; FLEUREN, G. J.; KENTER, G.; MELIEF, C. J. M.; OFFRINGA, R. Natural T-helper immunity against human Papillomavirus type 16 (HPV 16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leucocyte antigen class II-restricted epitopes. **Int J Cancer**, v. 91, p. 612-618, 2001.
- VERREAULT, R.; CHU, J.; MANDELSON, M.; SHY, K. A case-control study of diet and invasive cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 43, p. 1050-1054, 1989.
- VIANA, L. S. **Estudo preliminar do perfil genômico do vírus do Papiloma humano (HPV) no Estado de Alagoas**. 2003. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências

Exatas e Naturais. Departamento de Química. Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas (UFAL). 2003. 62p.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica**, v. 39, n. 1, p. 71-75, 2000.

VILLA, L. L. Human Papillomavirus and cervical cancer. **Cancer Research**, p. 321-341, 1997.

VILLA, L. L.; SICHERO, L.; RAHAL, P.; CABALLERO, O.; FERENCZY, A.; ROHAN, T.; FRANCO, E. L. Molecular variants of human Papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J. General Virol**, v. 81, p. 2959-2968, 2000.

WALBOOMERS, J. M. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDRES, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M.; MUNOZ, N. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WALKER, P.; DEXEUS, S.; DE PALO, G.; BARRASSO, R.; CAMPION, M.; GIRARDI, F.; JACOB, C.; ROY, M. International terminology of colposcopy: an update report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstet Gynecol**, v. 101, n. 1, p. 175-177, 2003.

WASSERHEIT, J. N. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 19, n. 2, p. 61-77, mar/apr. 1992.

WIKSTRÖM, A. **Clinical and serological manifestations of genital human Papillomavirus infection**. 1995. (Monografia) – Department of Dermatovenereology, Karolinska Hospital and Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. 1995. 85 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cervical cancer control in developing countries: memorandum from a WHO meeting. **WHO (bulletin)**, v. 74, n. 4, p. 345-351, 1996.

WRIGHT JR, T. C.; SUBBARAO, S.; ELLERBROCK, T. V.; LENNOX, J. L.; EVANS-STRICKFADEN, T.; SMITH, D. G.; HART, C. H. Human immunodeficiency virus 1 expression in the female genital tract in association with cervical inflammation and ulceration. **Am J Obstet Gynecol**, v. 184, p. 279-285, 2001.

WRIGHT, T. C.; ELLERBROCK, T. V.; CHIASSON, M. A.; VAN DEVANTER, N.; SUN, X. W. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. **Obstet Gynecol**, v. 84, n. 4, part 1, p. 591-597, oct. 1994.

WRIGHT, T. C.; SCHIFFMAN, M. Adding a test for human Papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 489-490, 2003.

WRIGHT, T. C.; SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D.; COX, J. T.; GARCIA, F.; GOLDIE, S.; HATCH, K.; NOLLER, K.; ROACH, N.; RUNOWICZ, C.; SASLOW, D. Interim guidance for the use of human Papillomavirus DNA testing as an adjunct cervical cytology for screening. **Obstet Gynecol**, v. 103, n. 2, p. 304-309, 2004.

WRIGHT, T. C.; SUN, X. W. Infecção pelo Papillomavirus anogenital e neoplasia nas mulheres imunodeficientes. In: LÖRINCZ, A. T.; REID, R. **Clínicas obstétricas e ginecológicas da América do Norte**. 1996, v. 4, p. 837-869.

YOKOYAMA, M.; IWASAKA, T.; NAGATA, C.; NOZAWA, S.; SEKIYA, S.; HIRAI, Y.; KANAZAWA, K.; SATO, S.; HOSHIAI, H.; SUGASE, M.; KAWANA, T.; YOSHIKAWA, H. Prognostic factors associated with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan. **Cancer Letters**, v. 192, p. 171-179, 2003.

ZUR HAUSEN, H. Genital Papillomavirus infections. In: RIGBY, P. W.; WILKIE, N. M. (ed). **Viruses and cancer**. Cambridge (UK): Cambridge University Press, p. 83-90, 1986.

ZUR HAUSEN, H. Viruses in human cancers. **Science**, v. 254, p. 1167-1173, nov. 1991.



Microfotografia do HPV

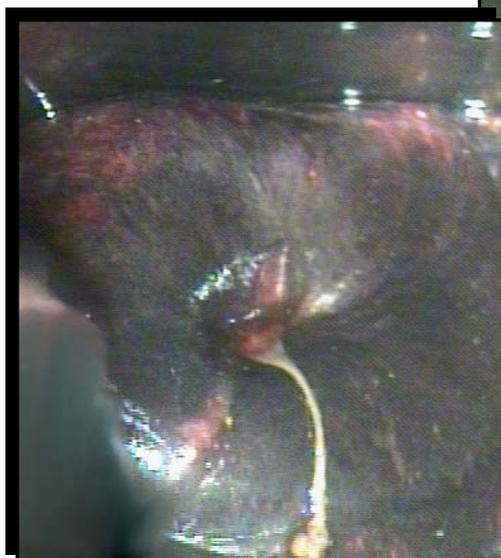


Colposcopia – Zona de transformação imatura, periorificial, ilhota de epitélio colunar às 13h

Teste de Schiller



Colposcopia – Epitélio escamoso ectocervical sem alteração. Orifício cervical circular com muco cervical



Teste de Schiller – orifício cervical circular com muco

8 APÊNDICES

8.1 APÊNDICE 1 – Aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco



Serviço Público Federal
Universidade Federal De Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício nº 390/2000 – CEP/CCS

Recife, 06 de dezembro de 2000.

Prezada Professora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde analisou o Protocolo de Pesquisa nº 195/2000-CEP/CCS, intitulado “*Estudo do DNA de HPV em portadores de Neoplasia Intra-epitelial Cervical Infectadas ou não pelo Virus da Imunodeficiências Humana (HIV) .*”, aprovando-o sem pendência, em 06 de dezembro de 2000, bem como o Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado.

Atenciosamente,


 Profª Maria Clara Albuquerque
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

À

Profa. Terezinha Tênorio da Silva
Departamento de Materno Infantil

8.2 APÊNDICE 2 – Formulário pré-codificado

Instrumento de coleta de dados
**FATORES DE RISCO PARA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL EM
 PACIENTES SUBMETIDAS À AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E PESQUISA DE DNA-HPV**

Caso Nº Registro Data/...../.....

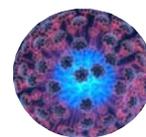
1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

- 1.1 Nome:
- 1.2 Endereço:
- 1.3 Idade: (anos).
- 1.3.1 Qual a data do seu aniversário? / /
- 1.3.2 Quantos anos a senhora fez no seu último aniversário? (anos).
- 1.4 Qual o seu estado civil?
 (1) Casada (2) Solteira (3) Viúva (4) Separada
- 1.5 Escolaridade:
- 1.5.1 A senhora sabe ler? (1) Sim (2) Não
- 1.5.2 A senhora sabe escrever? (1) Sim (2) Não
- 1.5.3 Qual a última série que a senhora concluiu com aprovação?
 (1) não sabe ler nem escrever (5) 2º grau completo
 (2) 1º grau incompleto (6) 3º grau incompleto
 (3) 1º grau completo (7) 3º grau completo
 (4) 2º grau incompleto

2. ANTECEDENTES

- 2.1 Idade do primeiro coito: (anos)
- 2.1.1 Com que idade a senhora teve a primeira relação sexual? (anos)
- 2.2 Número de gestação:
- 2.2.1 Quantos filhos a senhora teve?
- 2.2.2 Quantas vezes a senhora engravidou?
- 2.2.3 Número de parceiro(s) sexual(is)
- 2.2.4 A senhora tem um companheiro? (1) Sim (2) Não
- 2.2.5 A senhora já teve companheiro? (1) Sim (2) Não
- 2.2.6 Quantos companheiros a senhora já teve?
- 2.3 Método contraceptivo: (1) Sim (2) Não
- 2.3.1 A senhora usa algum método para evitar filhos? (1) Sim (2) Não
 Se sim, especifique
 (1) Pílula (2) Injeção (3) Condom (4) DIU (5) Diafragma
 (6) Ligadura tubária (7) Coito interrompido
- 2.3.2 A senhora já usou algum método para evitar filhos? (1) Sim (2) Não
 Se sim, especifique
 (1) Pílula (2) Injeção (3) Condom (4) DIU (5) Diafragma
 (6) Ligadura tubária (7) Coito interrompido
- 2.4 Antecedente de doenças sexualmente transmissíveis? (1) Sim (2) Não
 Se sim, especifique

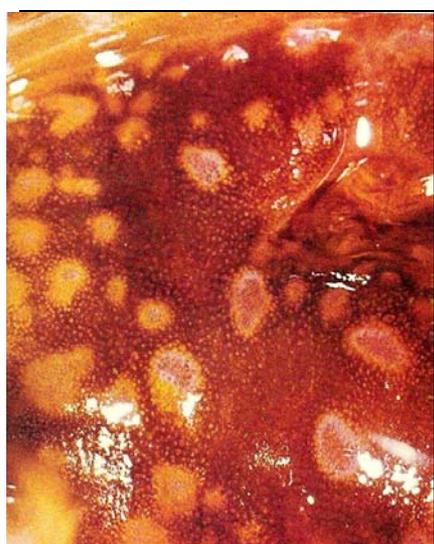
- 2.4.1 Seu(s) companheiro(s) já teve alguma doença venérea ou do mundo? (1) Sim (2) Não
- 2.4.2 A senhora pegou a doença dele? (1) Sim (2) Não
Se sim, qual foi à doença? _____
- 2.5 Tabagismo: (1) Sim (2) Não
- 2.5.1 A senhora fuma? (1) Sim (2) Não
- 2.5.2 Quanto(s) cigarro(s) a senhora fuma por dia?
- 2.5.3 Há quanto tempo a senhora fuma?
- 2.5.4 A senhora já fumou? (1) Sim (2) Não
- 2.5.5 Há quanto tempo a senhora deixou de fumar?
3. EXAMES
- 3.1 HIV (1) Positivo (2) Negativo
- 3.2 Contagem CD4 _____ CD8 _____
- 3.3 Carga viral _____ Log _____
- 3.4 Alterações colposcópicas: (1) Sim (2) Não
- 3.4.1 Alterações colposcópicas:
(1) Epitélio acetobranco (2) Epitélio plano (3) Epitélio micropapilar (4) Pontilhado
(5) Mosaico (6) Leucoplasia (7) Vasos atípicos (8) Outros
- 3.5 Alterações colpocitológicas: (1) Sim (2) Não
- 3.5.1.- Adequabilidade da amostra:
(1) Satisfatória (2) Satisfatório, porém limitada (3) Insatisfatória
- 3.5.2 Categorização geral:
(1) Dentro dos limites normais (2) Alterações celulares benignas
(3) Anormalidades de células epiteliais
- 3.5.3 Flora vaginal:
(1) Lactobacilos (2) *G. vaginalis* (3) Bactérias cocóides
(4) *T. vaginalis* (5) Fungos (6) Outros
- 3.5.4 Alterações celulares benignas reativas associada com:
(1) Inflação (2) Reparação (3) Atrofia (4) Irradiação (5) Outros
- 3.5.5. Anormalidades de células epiteliais escamosas:
(1) Atipia de significado indeterminado (2) Lesão intra-epitelial de baixo grau (3) NIC1 HPV
(4) Lesão intra-epitelial de alto grau NIC2 (5) NIC3 (6) Carcinoma de células escamosas
- 3.5.6.- Anormalidades de células epiteliais glandulares:
(1) Atipia de significado indeterminado (2) Adenocarcinoma endometrial
(3) Adenocarcinoma *in situ* não especificado (4) Adenocarcinoma endocervical
(5) Adenocarcinoma extrauterino
- 3.6 Presença de HPV por critérios citológicos: (1) Sim (2) Não
- 3.7 Presença de HPV por critérios histopatológicos: (1) Sim (2) Não
- 3.8 DNA-HPV por PCR: (1) Positivo (2) Negativo
- 3.8.1 Tipo de HPV:
(1) Alto risco (2) Baixo risco (3) Risco indeterminado



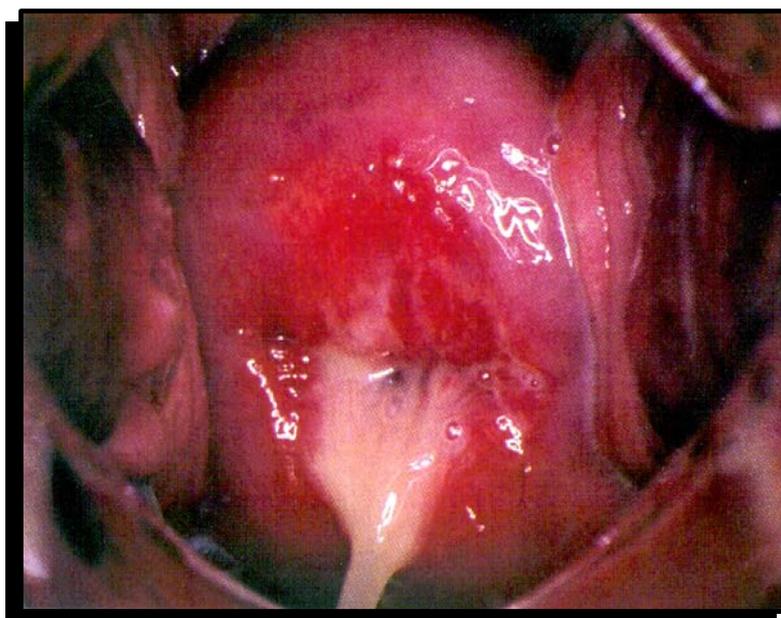
Microfotografia do HPV



Condiloma cervical



Teste de Schiller - Colpíte



Mácula rubra

9 ANEXOS

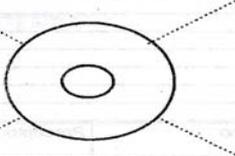
9.1 ANEXO 1 - Classificação da Nomenclatura Internacional dos Aspectos Colposcópicos de Roma

- | | |
|--|---|
| <p>A Achados colposcópicos normais
 Epitélio escamoso original
 Epitélio colunar
 Zona de transformação normal</p> <p>B Achados colposcópicos anormais</p> <p>1 Dentro da zona de transformação
 Epitélio acetobranco*
 Epitélio plano
 Epitélio micropapilar ou microcircunvoluções
 Pontilhado*
 Mosaico*
 Leucoplasia*
 Zona iodo negativa
 Vasos atípicos</p> <p>2 Fora da zona de transformação (ectocérvice e vagina)
 Epitélio acetobranco*
 Epitélio plano</p> | <p>Epitélio micropapilar ou microcircunvoluções
 Pontilhado*
 Mosaico*
 Leucoplasia*
 Zona iodo negativa
 Vasos atípicos</p> <p>C Achados colposcópicos sugestivos de câncer invasor</p> <p>D Achados colposcópicos insatisfatórios
 JEC não visível
 Inflamação intensa ou atrofia
 Cérvix não visível</p> <p>E Achados vários
 Superfície micropapilar não acetobranca
 Condiloma exofídico
 Inflamação
 Atrofia
 Úlcera
 Outros achados</p> |
|--|---|
- **Indicador de alterações maiores ou menores**

<p>ALTERAÇÕES MENORES Epitélio acetobranco leve Mosaico leve Pontilhado leve Leucoplasia tênue</p>

<p>ALTERAÇÕES MAIORES Epitélio acetobranco acentuado Mosaico áspero Pontilhado áspero Leucoplasia densa Erosão</p>
--

Formulário de descrição dos achados colposcópicos

		COLPOSCOPIA E CITOLOGIA		Nº Registro	
Nome do Paciente				Nº Colpo	
				Idade	Data
EXAME MACROSCÓPICO					
EXAME COLPOSCÓPICO					
					
JEC	Anterior:				
	Posterior:				
Teste de Schiler Negativo <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/>		Iodo Claro <input type="checkbox"/> Iodo Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/> Zona Iodo Negativo <input type="checkbox"/>	Médico	Preceptor
OBS. Caso esta Citologia seja: Negativa - Repetir com <input type="checkbox"/> 2 anos <input type="checkbox"/> 1ano <input type="checkbox"/> 6anos <input type="checkbox"/>					
Anormal - Retomar para biopsia (Biopsia Positiva → Patologia Cervical)					
Citologia		Colheita Tríplice <input type="checkbox"/> Outras <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> Biópsia <input type="checkbox"/> Data / /	
Data: / /		PREGAR EXAME CITOLOGICO AQUI		A: FRAGS. B: FRAGS.	
		PREGAR EXAME ANATOMO PATOLOGICO AQUI			

9.2 ANEXO 2 – Formulário de descrição dos achados citológicos segundo os critérios baseados no Sistema Bethesda

	COLPOCITOLOGIA ONCOLÓGICA	NÚMERO REGISTRO:
		DATA:
NOME DO PACIENTE:		CITO N.º
1) ADEQUACIDADE DA AMOSTRA: SATISFATÓRIA <input type="checkbox"/> SATISFATÓRIA MAS LIMITADA <input type="checkbox"/> INSATISFATÓRIA <input type="checkbox"/>		
2) CATEGORIZAÇÃO GERAL: DENTRO DOS LIMITES NORMAIS <input type="checkbox"/> ALTERAÇÕES CELULARES BENIGNAS <input type="checkbox"/> ANORMALIDADE DE CÉLULAS EPITELIAIS <input type="checkbox"/>		
3) FLORA VAGINAL: LACTOBACILOS <input type="checkbox"/> GARDNERELLA VAGINALIS <input type="checkbox"/> BACTÉRIAS COCÓIDES <input type="checkbox"/> ALTERAÇÕES CELULARES ASSOCIADAS COM VÍRUS HERPES SIMPLEX <input type="checkbox"/> TRICHOMONAS VAGINALIS <input type="checkbox"/> ORGANISMOS FÚNGICOS CONSISTENTES COM CÂNDIDA SSP <input type="checkbox"/> OUTROS <input type="checkbox"/>		
4) ALTERAÇÕES CELULARES BENIGNAS REATIVAS ASSOCIADAS COM: INFLAMAÇÃO <input type="checkbox"/> REPARAÇÃO <input type="checkbox"/> ATROFIA <input type="checkbox"/> IRRADIAÇÃO <input type="checkbox"/> OUTROS <input type="checkbox"/>		
5) ANORMALIDADES DE CÉLULAS EPITELIAIS ESCAMOSAS: ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO <input type="checkbox"/> LESÃO INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU <input type="checkbox"/> NIC2 <input type="checkbox"/> NIC3 <input type="checkbox"/> LESÃO INTRAEPITELIAL DE BAIXO GRAU <input type="checkbox"/> NIC1 <input type="checkbox"/> HPV <input type="checkbox"/> CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS <input type="checkbox"/>		
6) ANORMALIDADES DE CÉLULAS EPITELIAIS GLANDULARES: ATIPIA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO <input type="checkbox"/> ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL <input type="checkbox"/> ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL <input type="checkbox"/> ADENOCARCINOMA EXTRAUTERINO <input type="checkbox"/> ADENOCARCINOMA DE SÍTIO NÃO ESPECIFICADO <input type="checkbox"/>		
7) OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS:		
OBSERVAÇÃO:	ASSINATURA CITOPATOLOGISTA	

9.3 ANEXO 3 – Reagentes utilizados na técnica de amplificação e tipagem de DNA-HPV

➤ Isolamento do DNA genômico

❖ Soluções e materiais

- *KIT GFX™* - conjunto de purificação de DNA genômico (*Amerham Pharmacia Biotech®*), contendo:
 - Tampão TE;
 - Solução de extração (solução tamponada contendo detergente);
 - Água Mille-Q deionizada;
 - Solução de lavagem –Tris-HCl (pH 7,7) 10mM

ácido etileno diaminotetracético	1mM
Etanol a 100%	q.s.p.(adicionado de acordo com o protocolo do fabricante)
 - Colunas *GFX, MicroSpin™* com matriz de fibra de vidro;
- Micro tubos cônicos de 1mL Eppendorf;
- Agitador de tubo em vórtex.

➤ Visualização do DNA por meio de eletroforese em gel de agarose

❖ Soluções e materiais

- Cuba de eletroforese horizontal (*Horizon® 11.14*, marca *Life Technologies*)
- Agarose polimerizada a 0,8%
- Corante de brometo de etídio 2µL (10mg/mL)
- TBE-1X - Tris base 10,8g

ácido bórico	5,5g
ácido etileno diaminotetracético a 0,5M	4,0 mL
água destilada	1000 mL
- Tampão de corrida - azul de bromofenol 0,25%

xileno cianol	0,25%
solução de sacarose em água	40,00%
- Marcador de peso molecular; 1000 pares de bases (1Kb DNA Ladder, marca *Life Technologies*).
- Transiluminador de luz ultra-violeta TFX-20M, marca *Life Technologies*.
- ❖ Preparo do gel de agarose montado – Dissolve-se a agarose a quente, em TBE-1X, até obtenção de solução homogênea. Acrescenta-se o corante brometo de etídio e procede-se à homogeneização até coloração uniforme da solução, sem depósito de corante. Distribui-se o gel líquido, quente, sobre lâmina de vidro limpa, até que se forme uma camada homogênea, de bordas arredondadas. Antes que o gel se solidifique por completo, por compressão de ponteiras montadas em um pente de pipetagem, fazem-se os poços, nos quais serão aplicadas as amostras.

➤ Genotipagem do Papilomavírus humano por meio de reação de cadeia de polimerase

- Amplificação parcial do gene L1 viral por *Polimerase Chain Reaction* (PCR) em Termociclador *Master Cycler Eppendorf®*
- ❖ Reagentes para amplificação do DNA viral (Quadro I).

Quadro II - Volumes e concentrações finais dos reagentes utilizados para amplificação PCR do DNA viral

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME
Tampão PCR 10X*		
Cloreto de potássio	50 mM	[1X]
Tris-HCl pH 9	10 mM	
Cloreto de magnésio	2mM	
dNTP mix	200µM	8,0µL
MY 09*	1µM	0,6µL
MY 11*	1µM	0,6µL
PC 04**	1µM	0,6µL
GH 20**	1µM	0,6µL
Taq DNA Polimerase	5U	1,0µL
DNA Molde	20-50ng/50µL	2,0-5,0µL

NOTA: *Primers MY 09 e MY 11, utilizados na amplificação da região L1 do vírus

**Primers PC 04 e GH 20, utilizados na amplificação do gene da β globulina humana.

Seqüências de primers consensus específicos (TING, MANOS, 1990), sintetizados pela Life Technologies™:

- Primer MY09: 5'CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC3'
- Primer MY11: 5'GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG3'
- Oligonucleotídeos
 - ◆ GH20 - 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC3'
 - ◆ PC04 - 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC3'

❖ Soluções e materiais para visualização do DNA viral

Cuba de eletroforese horizontal (Horizon® 11.14, marca *Life Technologies*)

Agarose polimerizada a 1,2%

Corante de brometo de etídio 2µL (10mg/mL)

TBE-1X - Tris base 10,8g

 ácido bórico 5,5g

 ácido etileno diaminotetracético a 0,5M 4,0mL

 água destilada 1000mL

Tampão de corrida - azul de bromofenol 0,25%

 xileno cianol 0,25%

 solução de sacarose em água 40,00%

Marcador de peso molecular; 1000 pares de bases (1Kb DNA Ladder, marca *Life Technologies*).

Transiluminador de luz ultra-violeta TFX-20M, marca *Life Technologies*.

- Análise genômica por RFLP e construção de mapas físicos da região L1

❖ Reagentes para digestão do fragmento de DNA da região L1

○ **Solução mix de produto de PCR**

 Produto de PCR 40µL

 Tampão One-Phor-All plus 4µL

 Tris-acetato (pH 7,5) 100mM

 Acetato de magnésio 100mM

 Acetato de potássio 500mM

 Água Milli-Q q.s.p. 45µL

○ **Tampão específico da enzima React 4**

 Tris-HCL, pH 7.4 10mM

Cloreto de potássio	50mM
Ácido etileno diaminotetracético	0,1mM
Deoxitimidina trifosfato	1mM
<i>Bovine Serum Albumin</i>	500µg/mL
Solução de glicerol 50% v/v	0,5µL
o Enzimas para digestão dos fragmentos	
enzima <i>BamHI</i>	0,5µL
enzima <i>DdeI</i>	0,5µL
enzima <i>HaeIII</i>	0,5µL
enzima <i>Hinfl</i>	0,5µL
enzima <i>PstI</i>	0,5µL
enzima <i>RsaI</i>	0,5µL
enzima <i>Sau 3AI</i>	0,5µL
o Tampão de corrida	
Blue Juice 10X	0,5µL

Quadro III - Bateria de microtubos de 0,6mL para digestão do DNA-HPV

TUBO n°	mix	CONTEÚDO	Amostra	Tampão <i>React4</i>
1	4,5 µL	Tubo branco e enzimas amostra com DNA não digerido (MANOS et al., 1989; BERNARD et al., 1994) para fins comparativos	0,5 µL -	-
2	4,5 µL	enzima <i>BamHI</i>	0,5 µL	-
3	4,5 µL	enzima <i>DdeI</i>	0,5 µL	-
4	4,5 µL	enzima <i>HaeIII</i>	0,5 µL	-
5	4,5 µL	enzima <i>Hinfl</i>	0,5 µL	-
6	4,5 µL	enzima <i>PstI</i>	0,5 µL	-
7	4,5 µL	enzima <i>RsaI</i>	0,5 µL	-
8	-	enzima <i>Sau 3AI</i>	0,5 µL	4,0 µL

➤ Eletroforese dos produtos de digestão enzimática

- ❖ Reagentes e materiais
 - o Gel de poliacrilamida a 8% (Quadro II)

Quadro IV – Volumes e reagentes utilizados na preparação do gel de poliacrilamida a 8%

REAGENTES	VOLUME (para duas amostras)
Acrilamida/ Bis Acrilamida	
Acrilamida 29g	
Bis Acrilamida 1g	3,5mL
Água Milli-Q autoclavada q.s.p. 100mL	
Tampão Tris-ácido bórico-ácido etileno diaminotetracético a 10% (TBE)	1,25mL
Água Milli-Q estéril	7,5mL
Solução aquosa saturada de persulfato de amônia - APS 10%	125µL
Tetrametiletilenodiamina - TEMED	12,5µL

- o Cuba de eletroforese vertical Mini-V 8.10 – *Life Technologies*

◆ Preparo do gel de poliacrilamida a 8%

Em um béquer, foram misturadas as soluções de acrilamida/bis acrilamida, TBE a 10% e água Milli-Q autoclavada. Adicionaram-se à mistura do gel, 125µL de persulfato de amônia (APS 10%) e 12,5µL de TEMED, que atuaram como catalisadores na reação. O gel foi imediatamente aplicado com uma seringa sobre duas placas de vidro, sendo uma recortada na parte superior, separadas uma da

outra por espaçadores de 0,1cm de espessura, presos com grampos de aço. Foi introduzido um pente na superfície do gel, formando molde para os poços de aplicação das amostras. Aguardou-se a polimerização por, no mínimo, 30 minutos e retirou-se o pente.

O gel foi montado em cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE 1X. Cada produto de digestão foi aplicado em poços distintos ao lado de padrões de peso molecular (100pb e ϕ X174pb) e de um controle constituído pela amostra de DNA não digerido. Procedeu-se à corrida eletroforética à 4V/cm, por duas horas, por meio da qual os fragmentos digeridos foram separados.

➤ **Coloração com nitrato de prata**

❖ Reagentes de coloração dos fragmentos de DNA

- Solução fixadora do gel
 - Ácido acético 0,5% 7,5mL
 - Etanol a 10% q.s.p. 150,0mL
- Solução corante
 - Nitrato de prata 0,2% 150,0mL
- Solução reveladora
 - Hidróxido de sódio 4,5mL
 - Formaldeído 0,5% q.s.p. 150,0mL

➤ **Seqüenciamento automatizado**

❖ Reagentes e materiais

- Precipitação dos produtos de PCR
 - ◆ Acetato de amônio 0,15 μ L
 - ◆ Etanol absoluto 3,75 μ L
 - ◆ Etanol a 70% 150 μ L
 - ◆ Água Milli-Q 1,5 μ L
 - ◆ Tampão de formamida 10,0 μ L
- Agitador de tubo em vórtex
- Amplificação para incorporação dos cromóforos
 - ◆ Oligonucleotídeos MY09 e MY11 0,8 μ L
 - ◆ Solução mix
 - Água Milli Q 4,0 μ L
 - *Dynamic ET kit* 4,0 μ L
 (constituído por dideoxinucleotídeos terminadores, corados com fluoresceína e termossequenase DNA polimerase, enzima especificamente construída para o seqüenciamento de DNA)