

**Universidade Federal Fluminense
Departamento de Microbiologia e
Parasitologia do Instituto Biomédico**

Maria Odete de Oliveira Carvalho

**Diagnóstico molecular das infecções
causadas pelos papilomavírus
humanos no colo uterino**

Niterói

2004

Maria Odete de Oliveira Carvalho

**Diagnóstico molecular das infecções
causadas pelos papilomavírus
humanos no colo uterino**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação "*Strictu Sensu*" (Mestrado) em Patologia Experimental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Dr^a Sílvia Maria Baeta Cavalcanti

Niterói
2004

Carvalho, Maria Odete de Oliveira

**Diagnóstico molecular das infecções causadas pelos
papilomavírus humanos no colo uterino**

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)

Universidade Federal Fluminense – UFF

Niterói, 2004.

p.80

Bibliografia 63-78.

Papilomavirus humano	PCR
Captura do Híbrido	Câncer Cervical

MARIA ODETE DE OLIVEIRA CARVALHO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES CAUSADAS PELOS
PAPILOMAVÍRUS HUMANOS NO COLO UTERINO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Patologia Experimental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Ledy do Horto dos Santos Oliveira
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rita de Cássia Cubel Garcia
Universidade Federal Fluminense - UFF

Gutemberg Leão de Almeida Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Niterói
2004

**“Somos o que fazemos repetidamente. Logo,
a excelência não é um ato, mas um hábito”.**
(Aristóteles)

Aos meus pais, **Djalma** e **Creusa** que através dos “sim”
me fizeram crescer, mas que através dos “não”
me fizeram fortalecer.

Obrigado

**Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um
novo fim.**

(Chico Xavier).

Ao meu marido, **Nélio**.

Aos meus irmãos **Eduardo** e **Paulo** e aos
agregados **Carlinhos** e **Marcos**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a alguém muito especial, que está comigo em todos os momentos da vida, sejam eles bons ou ruins, mas que continua sempre me dando forças para continuar e seguir em frente, ficando ao meu lado e me apoiando nos momentos de fragilidade, se alegrando nos meus momentos de alegria e enxugando as minhas lágrimas quando eu penso que não vou conseguir chegar adiante, **DEUS**.

À Dr^a Sílvia Maria Baeta Cavalcanti, minha orientadora que me aceitou como sua orientanda, o meu carinho e sincero agradecimento pela orientação durante todos esses anos e por ser a grande responsável pelo meu desenvolvimento profissional, o meu muito obrigado de coração. Agradeço também por sua amizade, paciência e dedicação no desenvolvimento desse trabalho.

À Dr^a Ledy do Horto dos Santos Oliveira pelo carinho e pelos conselhos que chegavam sempre na hora certa.

Ao professor Licínio Esmeraldo da Silva, do Departamento de Estatística que com toda a sua paciência e conhecimento me ajudou na análise estatística dos resultados dessa pesquisa.

À professora Rita Cubel Garcia pelo carinho, amizade e atenção que me dispensou nos momentos de alegria e de tristeza.

À professora Ana Maria Viana Pinto por toda atenção e carinho dispensados durante todo o meu trabalho.

Ao Departamento de Virologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio financeiro.

A todo o pessoal do Setor de Genética do Laboratório Sérgio Franco, por toda atenção e carinho dispensados durante todo o ano de 2000.

Aos amigos Ricardo Wagner e Fátima Maria, do Laboratório Sérgio Franco, pela colaboração na realização desse trabalho.

Ao amigo Fábio Messias Barboza pelo apoio dispensado com seus trabalhos na parte de informática.

Ao meu tio Maurício que sempre me incentivou para continuar na minha carreira.

Ao meu sogro José Soares, que com carinho e atenção, entre risos e lágrimas continua me incentivando.

O meu carinho especial a amiga Maria da Penha Trindade Xavier, pela paciência e tolerância em me ouvir, muitas vezes mais do que podia, sobre as dificuldades que passei durante a realização desse trabalho.

À amiga Fernanda Carestiato pela colaboração, especialmente quando eu e meu computador brigamos.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
HISTÓRICO.....	1
AGENTE ETIOLÓGICO.....	3
ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	5
Genes iniciais.....	6
Genes tardios.....	7
Genes reguladores da transcrição.....	7
CICLO DE REPLICAÇÃO.....	8
PATOGENIA.....	11
DIAGNÓSTICO.....	15
EPIDEMIOLOGIA.....	18
TRATAMENTO.....	20

PREVENÇÃO.....	23
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXOS.....	73
RESUMO PUBLICADO EM CONGRESSO.....	73
ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA.....	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: fotomicrografia eletrônica mostrando aspecto morfológico das partículas virais de Papilomavírus (University of Cape Town).....	4
Figura 2: Esquema demonstrativo do genoma do HPV.....	8
Figura 3: Esquema demonstrativo do genoma do HPV, apontando genes e suas funções no ciclo viral.....	11
Figura 4: Esquema demonstrativo dos estratos do epitélio estratificado humano indicando processo de infecção e replicação viral.....	13

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Tipos de HPV e suas manifestações clínicas.....	6
Tabela 2: Correlação entre os resultados da Citopatologia por Papanicolaou e segundo Bethesda	28
Tabela 3: Seqüência dos nucleotídeos genéricos MY 09/ MY 11 e da β -actina.....	33
Tabela 4: Prevalência de HPV de alto e baixo risco detectada pela Captura do Híbrido.....	34
Tabela 5: Prevalência do HPV de acordo com a idade das pacientes.....	35
Tabela 6: Média de idade das pacientes de acordo com o diagnóstico citopatológico.	35
Tabela 7: Prevalência de HPV de baixo (Grupo A) e alto risco (Grupo B) de acordo com o diagnóstico citopatológico.....	36

Tabela 8: Correlação das medidas de carga viral com o diagnóstico citopatológico...	37
Tabela 9: Resultados da Citopatologia, Captura Híbrida e PCR nas pacientes estudadas.....	38
Tabela 10: Resultados do teste citopatológico nas pacientes estudadas.....	39
Tabela 11: Prevalência da infecção por HPV pela técnica de Captura Híbrida de acordo com a citopatologia.....	40
Tabela 12: Prevalência da infecção por HPV pela técnica de PCR de acordo com o diagnóstico citopatológico.....	41
Tabela 13: Resultados das técnicas de PCR e HCA II em relação à Citopatologia..	42
Tabela 14: Avaliação de parâmetros estatísticos da eficiência da PCR e da HCA II.	43
Tabela 15: Relação entre o diagnóstico citopatológico e os valores médios da carga viral obtida pela Captura do Híbrido.....	44
Tabela 16: Relação entre a PCR e a média da carga viral obtida pela Captura Híbrida.....	44

RESUMO

O câncer da cérvix uterina é apontado como a terceira causa de morte entre mulheres em todo o mundo. A partir do ano 2000, a Organização Mundial de Saúde reconheceu alguns tipos de Papilomavírus Humanos (HPV) associados a lesões genitais como agentes etiológicos do carcinoma cervical. Assim, o diagnóstico precoce dessas infecções pode contribuir para a prevenção do câncer. O objetivo de nosso trabalho foi avaliar o emprego de métodos moleculares a fim de comprovar a presença dos HPV no trato genital para utilização em combinação com a Citopatologia, método utilizado para rastreamento das lesões causadas pelos HPV. A pesquisa foi realizada com material de pacientes atendidas no Laboratório Dr Sérgio Franco. As amostras foram analisadas pelas técnicas de Captura Híbrida (HCA II) e de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a utilização dos primers genéricos MY 09/ MY 11. A nossa amostra foi composta de 1055 pacientes com idade entre 15 e 70 anos. Com a técnica de HCA II, o HPV foi detectado em 48,3% das pacientes, com uma prevalência de 45,8% entre as pacientes com idade entre 20 e 30 anos. Observamos que 52,7% (269/510) + 35,5% (181/510) destas lesões infectadas apresentavam tipos oncogênicos, sozinhos ou em infecções múltiplas respectivamente, indicando uma alta prevalência de pacientes com risco aumentado de câncer. Realizamos a análise comparativa da HCA II e da PCR em 40 amostras, com o objetivo de determinar a sensibilidade e a especificidade da HCA II. O HPV foi detectado em 75% dessas amostras quando analisados pela HCA II enquanto pela PCR a detecção ocorreu em 70%. A Citopatologia foi usada como método de referência para avaliar rastreamento das lesões. Os três testes demonstraram concordância absoluta quando a Citopatologia apontou a amostra como NORMAL. Casos discordantes ocorreram onde a Citopatologia diagnosticou como lesão de baixo grau (LSIL), onde a prevalência foi de 100% pela HCA II e de 85% pela PCR. Comparando as duas técnicas com os resultados da Citopatologia, observamos que tanto a HCA II ($p=0$) quanto a PCR ($p=0,002$) demonstram associação positiva. Concluímos que apesar das diferenças observadas, a HCA II apresentou sensibilidade e especificidade adequadas para uso clínico, em combinação com a Citopatologia, em especial a fim de fechar o diagnóstico de alterações do tipo ASCUS e também de lesões LSIL, principalmente quando estas demonstram ser persistentes ou recidivantes. Além disso, a avaliação da medida de carga viral obtida pela HCA II parece relacionar-se com a severidade da lesão e merece estudos adicionais a fim de relacioná-la ao risco de progressão ao câncer.

ABSTRACT

Cervical cancer is the third major cause of death from cancer in female worldwide. From 2000, World Health Organization accepted a few types of genital Human Papillomavirus (HPV) as etiological agents of cervical cancer. Nevertheless, the diagnosis of such viral infections still needs improvements in order to contribute to cancer prevention. The objective of our study was to evaluate the use of molecular methodologies to access HPV DNA, in association to Cytopathology, the classical method of screening cervical lesions. The research was conducted by using samples from cervical smears of women attended at Laboratórios Dr Sérgio Franco, at Rio de Janeiro. They were analyzed by the Hybrid Capture Assay II (HCA II) and the Polymerase Chain Reaction (PCR) with generic primers MY 09/ MY 11. The study was composed by 1055 patients aging from 15 to 70 years old. HPV was detected in 48.3% of the smears, by HCA II, with a prevalence of 45.8% in patients aging from 20 to 30 years old. We observed that 88.2% of the infected women showed oncogenic HPV types, pointing to a high prevalence of patients with a high risk of cancer. We also conducted a comparative analysis between HCA II and PCR, for 40 samples, with the objective to determine the sensibility and the specificity of HCA II. HPV was detected in 75% of the samples, by HCA II, while PCR showed HPV in 70% of the patients. Cytopathology was used as a reference method of screening the lesions. The three tests showed absolute agreement when Cytopathology referred the sample as NORMAL. Disagreements occurred when Cytopathology pointed low squamous intraepithelial lesions (LSIL), in which HCA II showed 100% of HPV detection and PCR pointed only 85% of DNA detection. After comparing the two molecular techniques with Cytopathology results, we observed that in HCA II ($p=0$) as well as in PCR ($p=0.002$) a positive association was demonstrated. Hence, we concluded that, despite a few disagreements, HCA II showed to be sensitive and specific enough to be used in combination with cytopathology, especially in order to confirm ASCUS diagnosis and the presence of LSIL that shows persistence or recurrence. Besides that, the evaluation of viral load measures obtained by HCA II showed to be related to the severity of the lesion and merits further studies to analyze possible association to risk of progression to malignancy.

INTRODUÇÃO

Histórico

As verrugas genitais, causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV), são descritas desde a Antiguidade. Porém, nesta época acreditava-se que estas verrugas estariam associadas à sífilis, sendo ambas vistas como um “veneno venéreo” de etiologia comum. Outros estudos passaram a relacionar estas verrugas genitais (condilomas acuminados) à blenorragia, mas a idéia foi desprezada após o isolamento do gonococo por Neisser (Passos et al, 1995). Foi, então, concebida a idéia de que as verrugas genitais poderiam ser causadas por irritações cutâneas devido à higiene precária, descargas genitais e outros agentes. A partir de então, entrou em vigor a teoria do “irritante inespecífico” com ampla aceitação até meados do século passado. A demonstração da natureza viral dessas verrugas ocorreu após a observação da semelhança histológica entre as lesões genitais e as lesões cutâneas que já possuíam sua etiologia estabelecida (Passos, 1995). Entretanto, somente após os relatos de Champion na segunda metade do século XX, a comunidade científica levantou a hipótese de uma transmissão sexual, devido ao aparecimento dessas verrugas em esposas de soldados veteranos da Guerra da Coréia e Japão, os quais haviam se relacionado com mulheres nativas. Em 1970, Oriel e Almeida confirmaram que os dois tipos de verrugas, genitais e cutâneas, eram patologias independentes.

O primeiro papilomavírus isolado e descrito como agente etiológico de verrugas epiteliais foi o papilomavírus de coelho - Cottontail Rabbit Papillomavirus - CRPV. Mas o interesse pelo estudo dos papilomavírus só aumentou de forma expressiva a partir da década de 70, quando ficou demonstrado que essas verrugas poderiam ter regressão

espontânea, persistir de forma benigna ou mesmo progredir para um carcinoma invasivo (Shope, 1933).

Até o momento, tem-se o conhecimento de que existem em torno de uma centena de tipos diferentes de HPV e que, muitos destes encontram-se associados a lesões epiteliais específicas (Stephen K. Tying, 2000). Atualmente, sabe-se que o câncer de colo de útero é a terceira causa de morte por câncer nas mulheres brasileiras, e é causado por alguns destes tipos de HPV.

Diversos estudos epidemiológicos demonstraram que alguns tipos virais como o HPV 6 e o HPV 11, são predominantemente encontrados em lesões benignas (Broker, 1987). As displasias de alto grau e os cânceres invasivos são predominantemente associadas aos tipos 16 e 18 e mais raramente aos tipos 31, 33, 35 entre outros (Muñoz et al, 2003). Walboomers e Meijer (1997) demonstraram que esses vírus ditos oncogênicos podem ser encontrados em praticamente 100% dos carcinomas cervicais. Corroborando essa proposição, a partir das publicações de Muñoz (2000), o HPV é aceito como o agente etiológico do câncer cervical. Entretanto, grande parte dos pacientes que apresentam infecção por HPV, não evolui para uma condição maligna da doença, sugerindo que outros fatores podem ser necessários para que ocorra transformação neoplásica.

Historicamente, porém, o diagnóstico das lesões causadas pelo HPV foi dificultado devido à relação direta da infecção viral com a diferenciação celular, não sendo possível cultivar os HPV em culturas de células ou em qualquer outro sistema de cultivo. A princípio, apenas a observação clínica das lesões foi possível, como método diagnóstico. Em seguida, os estudos de Meisels et al (1977) permitiram a padronização de técnicas como a citopatologia e a histopatologia para o diagnóstico de lesões compatíveis com a infecção viral. Há muitos anos, o método de escolha utilizado para realizar o rastreamento das lesões causadas por HPV é o teste citopatológico enquanto a histopatologia é o padrão ouro para definir as lesões associadas à infecção pelo HPV. Atualmente, vários métodos para confirmar a infecção estão disponíveis (zur Hausen, 2000). Novas metodologias que utilizam os princípios da Biologia Molecular comprovam a presença dos diferentes tipos de HPV nas lesões e permitem estudar a infecção viral a fim definir o risco de oncogênese na população, visando a prevenção do câncer.

Agente etiológico

Os diversos tipos de HPV estão classificados na família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*.

As partículas virais medem em torno de 55nm e apresentam genoma ADN com 7900 pares de bases. O capsídeo viral é composto por 72 subunidades denominadas capsômeros. A simetria icosaédrica, apresentada pelas partículas virais, justifica a forma esférica observada em microscopia eletrônica.

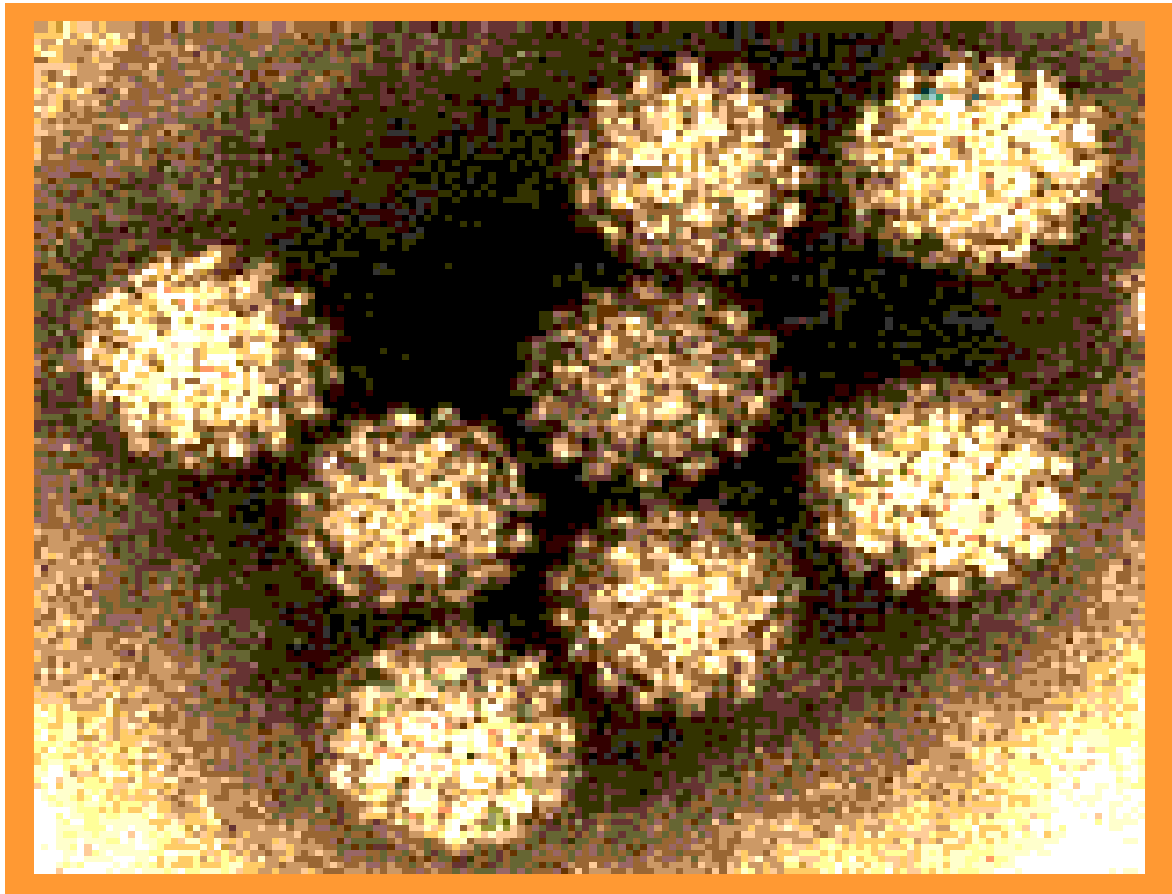


FIGURA 1: fotomicrografia eletrônica mostrando aspecto morfológico das partículas virais de Papilomavírus

(University of Cape Town)

(disponível em <<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>>).

Atualmente a família *Papillomavirus* compreende mais de 100 genótipos humanos já descritos (zur Hausen, 2000) com cerca de 80 já caracterizados por sequenciamento. Em 1979, Coggin & zur Hausen revelaram que o grau de homologia do ADN viral existente entre os diversos tipos de HPV determina a divisão do grupo nos tipos distintos. Atualmente, a tipagem dos HPV baseia-se nas eventuais diferenças que podem ocorrer nas regiões E6, E7 e L1 do genoma viral. Assim, por definição, os novos tipos de HPV devem apresentar homologia inferior a 90% em relação a essas mesmas regiões em outros tipos já existentes. Da mesma forma, os subtipos devem ser entendidos como aqueles que apresentam similaridade de 90% a 98% para as regiões em questão, quando comparados aos já existentes. Finalmente, considera-se que uma homologia entre 98% e 100% deve ser vista apenas como variante viral (Chan et al, 1995; Stewart et al, 1996).

Os papilomavírus podem ser observados em uma ampla gama de grupos animais como répteis, pássaros e mamíferos mas, possuem alto grau de espécie-especificidade, ou seja, os HPV (papilomavírus humanos) infectam exclusivamente seres humanos. Entretanto, a grande heterogeneidade do grupo reflete não apenas a aquisição de modificações no genoma, ao longo da evolução animal, mas também uma história marcante de adaptação do vírus a células específicas do hospedeiro e também do controle dessas infecções pelo próprio hospedeiro (zur Hausen & de Villiers, 1994).

Apesar do grande interesse da comunidade científica em estudar os HPV, grande parte do que se conhece até os nossos dias ocorreu após o desenvolvimento de experimentos baseados em técnicas de detecção do ADN, uma vez que não há disponível qualquer metodologia rotineira de propagação desses vírus, seja em culturas de células ou animais de laboratório.

Organização genômica

O genoma do vírus consiste de uma molécula de ADN circular dupla fita sendo composto por três regiões. Na figura que segue abaixo, podemos ter uma visão esquemática da organização molecular do genoma dos papilomavírus. Para um melhor entendimento, a figura foi feita de forma linear e com distinção de cores para as diferentes regiões genômicas.

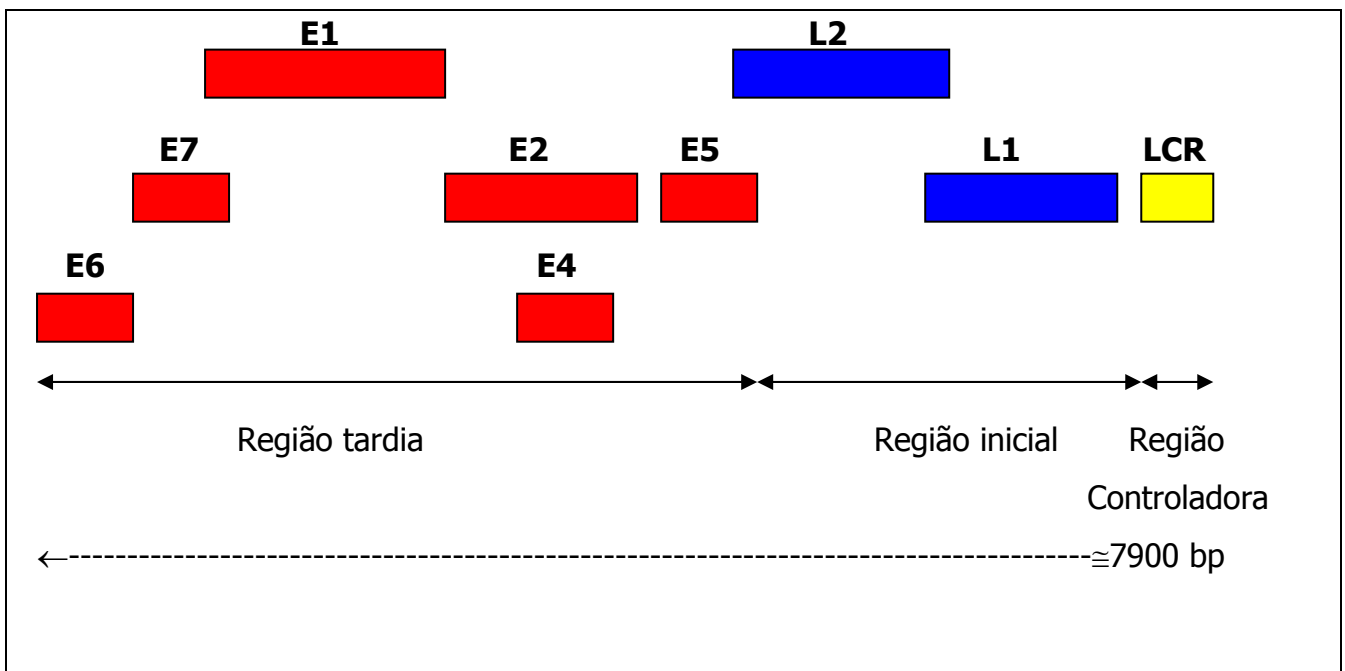


FIGURA 2: Esquema demonstrativo do genoma do HPV

(Adaptado de Butel, 2002)

(disponível em <<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch066.htm>>)

As regiões iniciais e tardias conhecidas como **E** e **L** do inglês **Early** e **Late** respectivamente, podem ser vistas acima na seqüência de cores vermelha e azul enquanto a região controladora ou **LCR**, do inglês **Long Control Region** pode ser vista na cor amarela. A região denominada inicial (ou early), é formada por 7 proteínas (**E1 – E7**) envolvidas na replicação do ácido nucléico, no controle da transcrição e em transformação celular. A região tardia (ou late), é formada pelas proteínas **L1** e **L2**, envolvidas na formação do capsídeo viral. Os elementos essenciais para estimulação

da expressão inicial dos genes virais, logo após a infecção, estão presentes na **LCR**, que se localiza entre as regiões **E** e **L** (Tyring, 2000).

Genes iniciais

E1 - codifica proteína reguladora que participa da replicação e permissividade viral; possui atividade de helicase e ATPase; facilita a ligação da proteína E2 à região promotora.

E2 - codifica proteína reguladora da replicação viral; participa também tanto da permissividade celular quanto da replicação do ADN viral pela ligação à região controladora e regula a transcrição das oncoproteínas E6 e E7.

E3 - até o momento não foi observada nos papilomavírus humanos e sua função não está estabelecida.

E4 - parece funcionar como proteína tardia estando envolvida na maturação e liberação da partícula viral pela camada de queratina da célula. Segundo Doorbar et al (1986), essa proteína parece interferir no processo de queratinização celular.

E5 - tem o seu papel atribuído ao processo de transformação celular que ocorre em alguns tipos de HPV. Porém sua expressão não é observada em todos genótipos virais.

E6 e E7 – proteínas que possuem importante função na transformação celular. São consideradas oncoproteínas devido à afinidade que possuem por proteínas supressoras de tumores, em especial pelas codificadas pelo gene p53 e pelo gene do retinoblastoma (pRb), respectivamente. O potencial oncogênico dos HPV ocorre de acordo com esse grau de afinidade. Inmam et al em 1993 observaram que as proteínas dos genes E6 e E7 dos HPV de alto risco ligam-se às proteínas p53 e pRb com alta afinidade, em contraste com o que ocorre com os vírus de baixo risco. Desaintes & Demeret (1997) relatam que a proteína E6 dos papilomavírus humanos associados às infecções do trato genital ligam-se preferencialmente à p53, que é responsável pela integridade do genoma celular. Em sua função normal, a proteína p53 atua retardando a divisão celular, em resposta a danos no ADN, e então, genes envolvidos no reparo do ADN são ativados. Se o reparo não for feito por algum motivo, a p53 induz a morte

celular por apoptose. Em 1994 Farthing & Vousden et al, descrevem que a ligação do gene E6 a p53, torna a p53 inativa e conseqüentemente, aumenta a instabilidade do genoma elevando o potencial da célula em adquirir mutações.

Em infecções genitais, quando ocorre a interação da proteína viral E6 à p53, rapidamente a p53 é proteoliticamente degradada (via ubiquitina), ou seja, células que expressam E6 desestabilizam a defesa a danos no ADN e fracassam no bloqueio do ciclo celular.

O gene E7 também está envolvido em processo de carcinogênese. A proteína E7 liga-se à proteína do retinoblastoma (pRB), prevenindo a interação entre o pRb e o fator celular de transcrição E2F, o qual em sua forma livre é capaz de trans-ativar a transcrição na fase S (de Síntese) do ciclo celular. Em última análise, E7 leva a um aumento da mitose

Genes tardios

L1 - codifica a proteína estrutural major de 54kd. Apresenta reação cruzada entre os papilomavírus humanos e animais, ou seja, é gênero-específica dando origem a antígenos de grupo.

L2 - codifica a proteína estrutural minor de 76kd, é tipo-específica e bastante variável entre os HPV.

Genes reguladores da transcrição

São os genes que se encontram localizados entre a região que possui os genes iniciais e a região que possui os genes tardios. Reconhecida como longa região controladora ou LCR. Essa região é considerada não codificante, mas contém os promotores para os elementos envolvidos tanto na replicação quanto na transcrição do ADN viral.

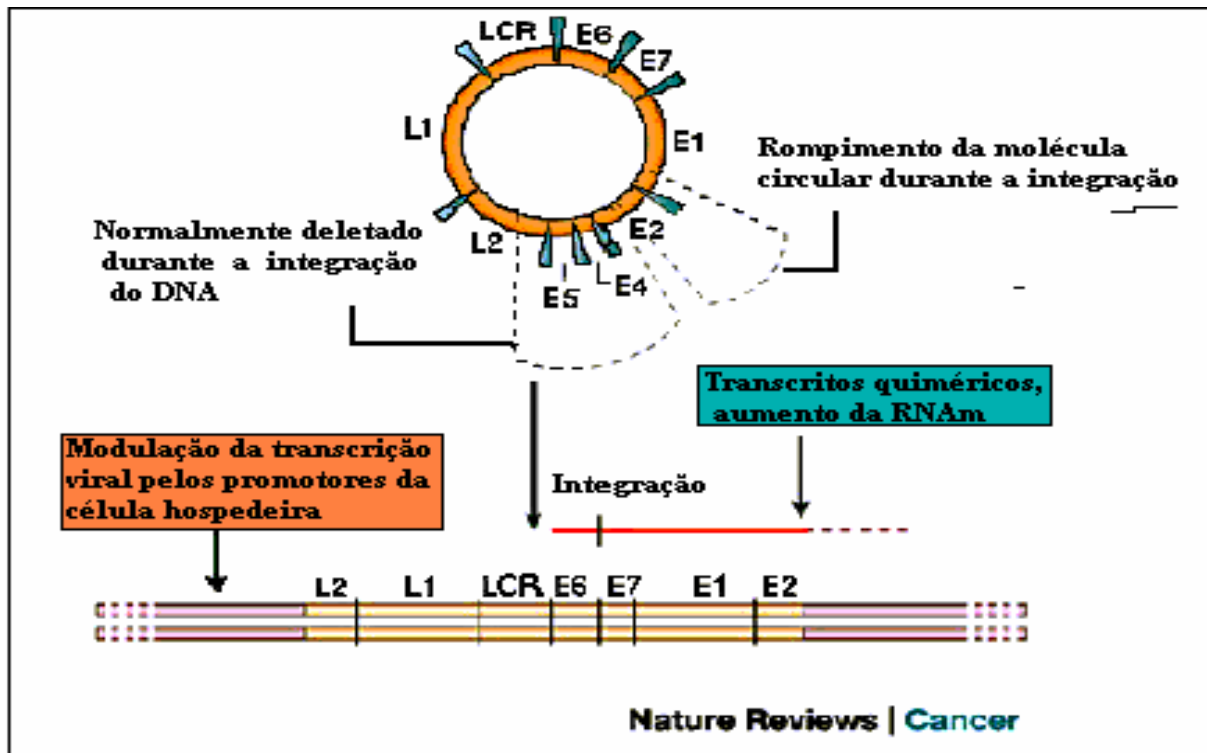


FIGURA 3: Esquema demonstrativo do genoma do HPV, apontando genes e suas funções no ciclo viral.

(Adaptado de Nature Reviews, 2003)

(disponível em <http://www.nature.com/nrw/journal/v2/n5/images/nrc798-f2.jpg>)

Ciclo de replicação

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de elucidar o processo de replicação dos HPV no epitélio humano e, em especial, no curso natural de lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina. No epitélio escamoso as células basais são as únicas capazes de divisão, sendo necessária a infecção dessas células para a indução e persistência de lesões por HPV.

O evento primordial para o estabelecimento das infecções virais, é a adesão do vírion à célula permissiva, determinada por receptores específicos presentes na própria célula. No caso dos papilomavírus, as integrinas são apontadas como as mais prováveis candidatas à adesão celular. A etapa seguinte, denominada penetração é marcada pela

entrada da partícula viral na célula hospedeira, o que parece ocorrer por um processo de endocitose (Evander et al, 1997).

Em fase posterior à penetração, o vírion é desnudado liberando suas proteínas e em seguida com o auxílio de enzimas celulares ocorrerá a replicação do ADN viral. A descapsidação do HPV ocorre no citoplasma da célula hospedeira e as proteínas de capsídeo (L1 e L2) vão migrar em direção ao núcleo por mecanismos de sinalização nuclear (Fields, 2001).

A expressão diferencial de diferentes tipos de ARN mensageiros, em células de diferentes extratos do epitélio torna evidente a estreita dependência com o processo de diferenciação das células epiteliais Tying (2000). A regulação da transcrição e replicação do vírus ocorrerá com a ligação dos produtos dos genes E1 e E2 aos seus respectivos sítios da região LCR, quando E2 passa a exercer a sua função de modular a atividade do promotor viral. Seus produtos E2 são importantes reguladores da transcrição e replicação viral.

A transcrição dos genes transformantes E6 e E7 também ocorre à partir do promotor inicial presente na região LCR. Entretanto, observa-se neste momento, uma importante diferença na estrutura e na forma de expressão dos respectivos ARNs mensageiros. Os genes E6 e E7, de HPV de baixo risco (ex.: tipos 6 e 11) são expressos por dois promotores distintos. Em HPV considerados de alto risco, esses genes serão expressos a partir de um único promotor (Fields, 2001).

Outro fator que deve ser considerado na evolução das lesões em direção à malignidade é o estado físico do ADN viral. De uma forma geral, o ADN viral em lesões de neoplasia intraepitelial cervical benigna é encontrado na forma episomal, não integrado ao ADN da célula hospedeira. Inversamente, Cullen et al (1991) observam que em lesões de cânceres invasivos geralmente o ADN é encontrado na forma integrada ao ADN da célula hospedeira. No mesmo trabalho, estes autores relatam que essa integração ocorre em um ou mais sítios do genoma celular, freqüentemente próximo a um proto-oncogene. Esse processo de integração do genoma viral ocorre com o rompimento do gene E2 (ORF), resultando em perda de sua expressão e conseqüente superexpressão dos genes E6 e E7, podendo ativar alguns oncogenes ou inativar produtos de genes supressores do crescimento celular (p53 e pRb).

A transcrição dos genes tardios, L1 e L2, ocorre apenas de ARN mensageiros transcritos de promotores específicos, que ocorrem de forma exclusiva em queratinócitos diferenciados (Fields, 2001).

As fases de montagem e liberação da partícula viral ainda estão por ser esclarecidas. Entretanto, observa-se a presença de partículas virais apenas na camada superior do epitélio. Tem sido proposto haver uma participação do produto do gene E4 nos eventos de replicação e/ou maturação do vírus (Doorbar et al, 1986). Roberts et al (1997), associam o produto de E4 aos filamentos intermediários da rede de queratina. Acredita-se que o vírus não seja citolítico.

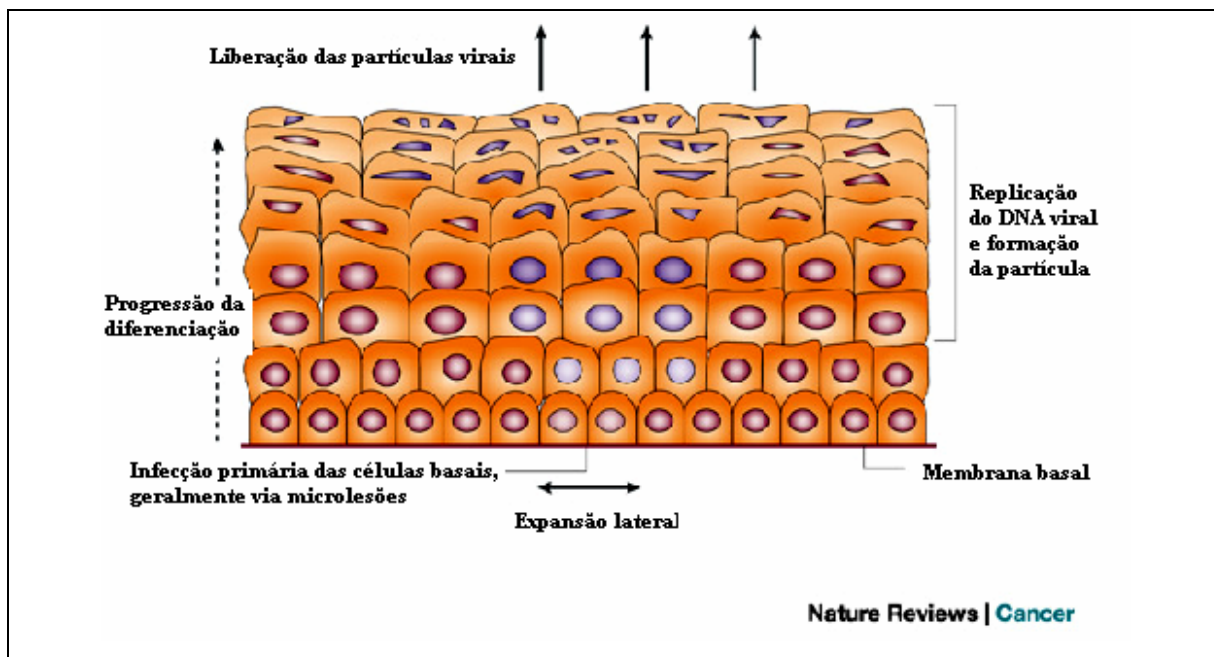


FIGURA 4: Esquema demonstrativo dos estratos do epitélio estratificado humano indicando processo de infecção e replicação viral.

(Adaptado de Nature Reviews, 2003)

(disponível em <<http://www.nature.com/nrw/journal/v2/n5/images/nrc798-f2.jpg>>)

Patogenia

Os papilomavírus são vírus espécie específicos. Em humanos, eles têm os queratinócitos como célula-alvo, sendo considerados epiteliotrópicos exclusivos. São vírus que possuem a capacidade de causar lesões no epitélio da pele e das mucosas, associadas a diversas formas de manifestações clínicas, que podem variar de verrugas comuns, planas ou plantares, a verrugas da região anogenital denominadas condilomas, ou ainda, à epidermodisplasia verruciforme e os papilomas de laringe. Segundo Rowson e Mahy (1967), a infecção dos papilomavírus em humanos possui um período de incubação muito variado, podendo levar entre 3 e 18 meses para o aparecimento das lesões. Essas lesões, de uma forma geral, ocorrem inicialmente de maneira benigna, com crescimento limitado e muitas vezes regridem espontaneamente. Porém, existem alguns genótipos virais responsáveis por processos infecciosos que podem evoluir à malignidade, especialmente em casos de persistência da infecção. Assim, estes são considerados os agentes causadores de neoplasias intra-epiteliais pré-malignas e malignas, especialmente na região genital e, mais raramente, na região da laringe (zur Hausen, 2000).

Na pele, as infecções pelos papilomavírus são bastante comuns, predominando as verrugas comuns, palmares e plantares, causadas pelos HPV 1, 2 e 4. Já a epidermodisplasia verruciforme (EV) é uma doença de origem genética, que ocorre em baixa frequência e que pode levar à expressão de lesões cutâneas crônicas disseminadas. De uma forma geral, os HPV tipos 5 e 8 são os mais encontrados em pacientes portadores desta patologia mas outros tipos também têm sido identificados (Syrjanen, 1989).

Mas, a grande importância dos papilomavírus ocorre nas infecções do trato genital, onde causam doenças sexualmente transmissíveis. Cerca de quarenta tipos de HPV causam infecções genitais, sendo reconhecidos dois grupos virais: os de baixo risco, associados a lesões benignas e os de alto risco, associados a lesões pré-malignas e malignas (Tabela 1) (de Villiers, 1994). Tais infecções acometem, em geral, jovens na idade entre 20 e 26 anos com idade média de 24 anos, tratando-se desta forma de uma doença da maturidade sexual. Evidências demonstram que o HPV é, atualmente, o vírus

de maior prevalência no trato genital, somando mais de 50% de todas as infecções aí localizadas. Neste sítio, podem causar tanto infecções transitórias como infecções persistentes. Nas infecções transitórias, o vírus produz lesão seguindo o ciclo clássico de produção viral em todas as suas etapas e, conseqüentemente levam à síntese de partículas virais completas que se formam no interior da célula infectada e que em seguida são liberadas por meio de esfoliação da camada superficial da pele, para renovação do tecido por um processo de lise. Entretanto, em conseqüência deste processo lítico, vai ocorrer a liberação dos vírions que subseqüentemente podem determinar a contaminação de outros indivíduos. Em geral, essas infecções ocorrem de forma benigna e regredem espontaneamente ou após tratamento. Não há integração do genoma viral ao genoma hospedeiro. Então, o vírus pode ser eliminado do organismo pelo hospedeiro imunologicamente competente.

Em contrapartida, as infecções persistentes são reconhecidas como aquelas em que não há eliminação viral, mesmo após tratamento das lesões. São estas as que apresentam estreita ligação com a evolução ao câncer cervical (Ferenczy & Franco, 2002). Infecções deste tipo podem ser detectadas em processos multiestágios, que se iniciam com a neoplasia intra-epitelial cervical do tipo I (ou NIC I), que são displasias leves com o padrão de infecção semelhante ao da infecção benigna, em que o ADN do vírus permanece ainda na forma episomal, não integrada, mas que já apresentam aumento na proliferação das células da camada basal do tecido infectado. Também conhecidas como lesões intra-epiteliais de baixo grau (LSIL ou low squamous intraepithelial lesions), displasias deste tipo podem regredir espontaneamente. Porém, de acordo com o tipo de HPV infectante, pode ocorrer progressão para quadros mais severos como as lesões intra-epiteliais de alto grau NIC II e NIC III, em que o ADN viral apresenta-se em geral integrado ao da célula infectada. Em conseqüência dessa integração ocorrerá um processo de rompimento do gene E2, superexpressão de E6 e E7 e ligação destas proteínas às proteínas supressoras de tumores. Deste modo, haverá a possibilidade de acumularem-se mutações. As células alteradas multiplicam-se até que toda a camada epitelial seja atingida. Haverá formação de um número menor de cópias virais e as células infectadas apesar de não atingirem um estágio de grande produção de

vírus e não contaminarem as células vizinhas representam alto risco de tornarem-se malignas: são as lesões de alto grau (HSIL) (Linhares, 1994).

TABELA 1: Tipos de HPV e suas manifestações clínicas

(Transcrito e adaptado de Syrjänen, 1989; Tyring, 2000).

PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	MANIFESTAÇÃO CLÍNICA
HPV 1 (a, b, c)	Verrugas plantares
HPV 2 (a – e)	Verrugas vulgares, verrugas filiformes, verrugas palatais
HPV 3 (a, b)	Verrugas planas, verrugas juvenis, formas leves de EV
HPV 4	Verrugas palmares e plantares tipo hiperkeratótico
HPV 5 (a, b) , HPV 8	Lesões maculares da EV, carcinoma de células escamosas
HPV 6 (a - f)	Condiloma acuminado, NIC I – III, papilomas de laringe
HPV 7	Verrugas vulgares da mão de manipuladores de carnes e açougueiros
HPV 9, HPV 12, HPV 15, HPV 19, HPV 23, HPV 24, HPV 25, HPV 47, HPV 50	Lesões verrucosas maculares e planas da EV
HPV 10 (a, b)	Verrugas planas
HPV 11 (a, b)	Condiloma acuminado, NIC I-III, papilomas de laringe, conjuntivais
HPV 13 (a, b)	Hiperplasia focal epitelial na mucosa oral
HPV 14 (a, b), HPV 17 (a, b), HPV 20	Lesões verrucosas maculares e planas da EV, carcinoma de células escamosas
HPV 16	Condiloma acuminado, NIC I-III, Carcinoma da cérvix, de pênis
HPV 18	Condiloma acuminado, NIC I-III, Carcinoma da cérvix, de pênis
HPV 21	Lesões verrucosas planas da EV
HPV 22	Lesões maculares da EV
HPV 26, HPV 27	Verrugas cutâneas (pacientes imunodeprimidos)
HPV 28, HPV 49	Lesões verrucosas planas cutâneas
HPV 29, HPV 60	Verrugas cutâneas
HPV 30	Carcinoma escamoso de laringe, NIC I, II

HPV 31, HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56 HPV 32	NIC I-III, carcinoma da cérvix Hiperplasia epitelial focal em mucosa oral, papiloma oral
HPV 33	NIC I-III, carcinoma da cérvix
HPV 34	Doença de Bowen, NIC
HPV 36	Ceratose actínica, lesões benignas da EV
HPV 37	Cerato-acantoma (tumor benigno de pele)
HPV 38	Melanoma maligno
HPV 39	Carcinoma da cérvix, NIC I, II, Papulose bowenóide
HPV 40	Neoplasia intraepitelial peniana e NIC
HPV 41	Lesões múltiplas verrucosas planas da pele, câncer de células escamosas
HPV 42	Papilomas genitais, condilomas planos, NIC
HPV 43, HPV 44, HPV 53, HPV 58, HPV 59	NIC
HPV 46	Lesões benignas da EV
HPV 48	Carcinoma de células escamosas da pele
HPV 54	Condiloma acuminado
HPV 55	Papulose bowenóide
HPV 57	NIC, verrugas da pele, papilomas invertidos nasais
HPV 58	NIC
HPV 59	NIC
HPV 60	Verrugas cutâneas
HPV 61, HPV 62, HPV 64, HPV 66, HPV 67, HPV 68, HPV 69, HPV 71, HPV 74	Displasias anogenitais e neoplasmas
HPV 63	Verrugas Myrmecia
HPV 65	Verrugas pigmentadas
HPV 70	Papiloma vulvar
HPV 72, HPV 73	Papilomas orais (em pacientes HIV positivos)
HPV 75, HPV 76, HPV 77	Verrugas genitais de pacientes com transplante renal
HPV 78	Verrugas cutâneas

NIC (neoplasia intraepitelial cervical) e EV (epidermodisplasia verruciforme).

NOTA: O HPV 46 tem sido designado como HPV 20b

Diagnóstico

O diagnóstico das infecções causadas pelos papilomavírus sempre foi dificultado pela impossibilidade de promover sua multiplicação *in vitro*. De uma forma geral, as infecções causadas pelos HPV podem ser sugeridas por meio de testes citopatológicos, colposcópicos e histopatológicos. Entretanto, esses métodos não comprovam a infecção pelo vírus, porque não fazem a detecção das partículas, antígenos ou genoma viral no interior de células infectadas.

A primeira técnica de observação de lesões associadas à infecção por HPV foi a citopatologia. Esta metodologia utiliza esfregaços celulares fixados em lâmina de microscopia comum e corados pelo método de Papanicolau, e busca identificar a presença de alterações celulares específicas, compatíveis com infecção viral. No exame podem ser visualizadas alterações celulares em graus variados. Podem ser observadas alterações como a presença de coilócitos, disceratose e anomalias nucleares. Os coilócitos apresentam-se como uma célula epitelial com núcleo irregular e hipercromático cercado por um halo citoplasmático e são característicos de infecção por HPV.

A técnica é vista como método de triagem até os dias atuais e foi primeiramente descrita por Papanicolau em 1933. Porém estudos indicam a existência de resultados falso-negativos e falso-positivos resultando em baixos índices de sensibilidade e especificidade (Reid & Lorincz;1991).

Na colposcopia, procedimento simples utilizado de forma rotineira, o diagnóstico é feito com o auxílio do colposcópio, e permite amplificação de até 400X do tecido cervical. Para identificar as lesões, utiliza-se o ácido acético (5% e 2%) e o azul de toluidina. O ácido acético tem a finalidade de coagular e precipitar proteínas celulares, revelando lesões aceto-brancas que ajudam a delinear a lesão, especialmente em casos de infecção subclínica. O método foi descrito por Meisels et al (1977), é simples, dotado de grande sensibilidade, e permite a identificação de áreas suspeitas de infecção indicando o posterior direcionamento para biópsia e/ou tratamento específico. Porém, está associado a resultados falso-positivos, devido a existência de doenças inflamatórias que quando expostas ao ácido acético podem causar branqueamento do epitélio.

A pesquisa das lesões em biópsias de tecido suspeito é feita na histopatologia, sendo esta considerada o padrão-ouro no diagnóstico de lesões cervicais. O método não identifica o HPV, mas gradua a severidade das lesões de acordo com o Sistema Bethesda em: condiloma; lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) incluindo NIC I, que possui potencial cancerígeno incerto; lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) compreendendo NIC II e NIC III/carcinoma in situ e; carcinoma de célula escamosa (SCC). Diversos autores definem a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) como uma lesão associada com o desenvolvimento do carcinoma cervical, podendo ser separada em três níveis de acordo com grau de atipia celular e desarranjo da arquitetura epitelial (Solomon et al, 1989; Richart, 1990; Burger et al, 1996).

Técnicas de detecção e tipagem do HPV

O diagnóstico específico das infecções causadas pelo HPV prescinde de técnicas sorológicas de identificação de vírus e antígenos virais bem como de anticorpos específicos. Esforços vêm sendo feitos a fim de desenvolver a pesquisa sorológica comprobatória da infecção pelo HPV. Baird (1983) realizando estudos imunológicos pioneiros detectou que, dentre as mulheres com câncer cervical, 93% tinham anticorpos contra HPV, enquanto no grupo controle, 0% das mulheres apresentava anticorpos contra estes vírus. No entanto, somente em nossa década, o desenvolvimento desta metodologia tornou-se viável. Isto porque, com a evolução da engenharia genética, foi possível produzir peptídeos sintéticos derivados de proteínas virais, para detecção de anticorpos em testes de ELISA e Western blotting. A expressão das proteínas estruturais L1 e L2 em vetor baculovírus expresso em células de insetos, permitiu obter capsídeos virais montados espontaneamente que aumentaram a eficiência nos testes de detecção de tipos de alto risco (Kirnbauer et al, 1993). Entretanto, no momento, tais reagentes ainda não estão disponíveis para o diagnóstico de rotina, pelo alto custo dispendido na sua obtenção. Além disso, a qualidade dos testes ainda não é satisfatória, com inúmeros resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos (Suchanková et al, 1991; Muller et al, 1992; Kirnbauer et al, 1994).

Assim, hoje em dia, o diagnóstico específico das infecções causadas pelos HPV depende da detecção de seqüências do genoma viral, na lesão investigada, por técnicas de hibridização molecular e amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Tais seqüências podem ser encontradas no núcleo celular, tanto na forma extracromossômica como na forma integrada ao genoma hospedeiro.

A hibridização é um dos métodos mais sensíveis de detecção do HPV. É capaz não só de identificar o vírus, mas também de determinar seu tipo e se está integrado ou não ao ADN da célula hospedeira. O desenvolvimento dessas técnicas de hibridização permitiu o rápido reconhecimento de um grande número de tipos e subtipos de HPV (zur Hausen & de Villiers, 1994). Os testes de hibridização molecular baseiam-se no fenômeno de desnaturação e renaturação das fitas de ácido nucléico, isto é, elas têm a capacidade de separarem-se e parearem-se com complementaridade específica. Moléculas de ácidos nucléicos conhecidos e marcados radiativamente (^{32}P , ^{35}S , ^3H : sondas quentes) ou com biotina ou digoxigenina (sondas frias), detectam especificamente sua fita complementar desconhecida (alvo), determinando a formação de moléculas híbridas. O resultado do teste de hibridização irá depender da quantidade e da estabilidade dos híbridos formados. São várias as técnicas hoje disponíveis para detecção de seqüências de ácidos nucléicos virais. As mais utilizadas são: Hibridização *in situ*, Dot Blot, Southern Blot, Northern Blot e a Captura dos Híbridos.

O teste de hibridização por Southern Blot vem sendo usado em vários experimentos laboratoriais e é, ainda, o padrão-ouro para detecção do ADN do HPV. É um teste que possui alta sensibilidade podendo detectar 0.1 cópia viral / célula. Além disso, o teste é capaz de distinguir os diferentes tipos de HPV e, após digestão por enzimas de restrição, permite identificar o estado do ADN viral, se episomal ou integrado. Contudo, por ser oneroso, consumir muito tempo e necessitar de grande quantidade de amostra a fresco, a técnica é considerada imprópria para uso clínico (Biggio et al, 2002).

Recentemente, foi desenvolvido o teste de Captura do Híbrido que possui 18 tipos de HPV associados em dois grupos: baixo e alto risco. A técnica utiliza a hibridização sanduíche, na qual um híbrido, formado por ADN do HPV presente na infecção com ARN complementar do mesmo é capturado por um anticorpo anti-híbrido.

Em seguida, o complexo é colocado em reação com fosfatase alcalina e substrato quimioluminescente. O teste detecta HPV em dois coquetéis: de baixo e alto risco, é rápido e automatizado. A sensibilidade da Captura do Híbrido é semelhante à da hibridização por Southern Blot, mas trata-se de exame aplicado à clínica, não fornecendo o tipo exato nem permitindo estudo mais detalhado (Ferenczy, 1995).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que amplifica uma região específica do ácido nucléico. São utilizados pares de oligonucleotídeos que flanqueiam a região genômica que se deseja copiar (primers ou iniciadores). Estes primers ligam-se à molécula de ADN alvo e, em presença de uma polimerase termoestável e de nucleotídeos trifosfatados (dNTPs) esse ADN irá ser replicado de forma semi-conservativa. Cada ciclo de replicação envolve três etapas: desnaturação das fitas, anelamento dos primers e extensão pela polimerase. Os ciclos se repetem de maneira que, no final, temos 2^n cópias de ADN, onde n é o número de ciclos. A PCR é a técnica de maior sensibilidade disponível para o diagnóstico das infecções pelo HPV.

Epidemiologia

As infecções genitais causadas por HPV são, atualmente, um grave problema de Saúde Pública, em nosso país, com importantes conseqüências para nossa população feminina. Entretanto, informações acerca da epidemiologia e história natural desta infecção ainda são escassas.

Até o final da década de 60, o carcinoma cervical ainda representava uma das principais causas de morte feminina em todo o Mundo. No entanto, a introdução de programas sistemáticos de rastreamento de mulheres com lesões por HPV, implantados em países desenvolvidos tornou este câncer um problema dos países pobres e em desenvolvimento. O número estimado de novos casos a cada ano é superior a 500.000, com mais de 200.000 mortes (Mougin et al, 2001).

Segundo a OMS, o câncer de colo do útero é a terceira causa de câncer em nosso país, sendo a segunda em termos de mortalidade. Em 1977, Segi já havia descrito

algumas regiões brasileiras, em especial o Nordeste e o Sudeste como de alta incidência de câncer genital. Fairley et al em 1994, comprovam a presença desses vírus em 20 – 46% das mulheres jovens sexualmente ativas, onde a maioria das infecções são episódios de curta duração.

Atualmente, sabe-se que cerca de 40 tipos de HPV podem causar infecção genital, sendo que um terço deles está relacionado ao estabelecimento de câncer (Muñoz et al, 2003). Inúmeras publicações indicam a ocorrência de peculiaridades geográficas relacionadas à distribuição de tipos de HPV entre as diferentes populações. A prevalência dos diferentes tipos de HPV e alguns fatores de risco para a infecção variam consideravelmente. Observa-se que em países da América do Norte, em torno de 70% dos cânceres de colo uterino estão associados ao HPV tipo 16 enquanto no sudeste da Ásia, o HPV tipo 18 está presente em uma frequência superior a 32% (Zehbe & Wilander, 1997), já no Japão, predominam os tipos 51, 52 e 58 (Bauer et al, 1993; Wheeler et al, 1993; Sasagawa et al, 1996,). No Brasil, apesar de também haver maior prevalência do tipo 16, encontramos altas taxas de infecção pelo HPV 18, considerado mais agressivo (Cavalcanti et al, 2000).

Os achados de Evanger et al em 1995, relatam que cerca de 70% das infecções por HPV são eliminadas até 12 meses após a contaminação, chegando a 90% em 24 meses. Sendo que em cerca de 1% da população sexualmente ativa a infecção ocorre por tipos de baixo risco (ex.: tipos 6, 11), que promovem o aparecimento de lesões condilomatosas benignas (Ho Gy et al, 1998).

O risco do desenvolvimento de uma displasia cervical e de um câncer invasivo é estreitamente dependente do tipo de HPV infectante, bem como de co-fatores, como comportamento sexual e estado imunitário da paciente. Porém, se o risco de desenvolver uma displasia cervical e esta progredir a um câncer invasivo é dependente da presença de HPV oncogênico, esse risco torna-se ainda maior quando a infecção viral é persistente. Rozendaal et al (2000) demonstra que mulheres com colo de aparência normal mas cronicamente infectadas por um HPV oncogênico, possuem um risco 15% maior de desenvolver displasia, quando comparadas a mulheres não infectadas. Da mesma forma, publicações revelam que em pacientes sem HPV detectável o risco de

desenvolver displasias severas é quase nulo (Bosch et al, 1995; Ho Gy et al, 1998; Nobbenhuis et al, 1999).

Mas, se realmente uma infecção persistente por HPV oncogênico constitui um fator de risco aumentado no desenvolvimento das lesões pré invasivas, o número de cópias do genoma viral, definido como carga viral também será um marcador de pré-disposição permitindo distinguir as infecções que possuem menor ou maior risco de progredir a um carcinoma (Joseffsson et al, 2000).

Diversos estudos epidemiológicos observaram que, apesar da alta prevalência de infecções por HPV genital em mulheres sexualmente ativas, apenas uma pequena proporção destas progride a quadros de lesões intraepiteliais de alto grau e câncer cervical. Como a infecção por HPV oncogênico tem sido vista como causa necessária para o desenvolvimento dessas lesões, pesquisadores buscam a existência de fatores de risco que possam atuar em associação com os vírus e influenciar na transição da infecção cervical para doenças malignas (Villa et al, 1989; Oliveira et al, 2002).

Investigações acerca desses chamados co-fatores que contribuem com o HPV na evolução ao câncer cervical evidenciam que estes podem ser de origem comportamental e apontam a dieta, o fumo, o uso de contraceptivos orais, a promiscuidade, a infecção com outras DST, o número de parceiros sexuais, alta paridade bem como fatores genéticos ou a competência imunológica como sendo fatores relevantes associados à malignização (Dillner et al, 1996, 2000; Mougin et al, 2001). Porém, apesar do grande número de estudos que abrangem a ligação entre o HPV e os diversos co-fatores, Villa et al (1989) observam de modo conclusivo a existência de uma correlação direta entre desenvolvimento de lesões e falta de acompanhamento médico.

Tratamento

Diversas medidas terapêuticas são utilizadas atualmente, porém a escolha depende não apenas do profissional médico como também do paciente e da forma como a lesão se apresenta (Richwald & Reitano, 1999). Dentre os métodos terapêuticos mais

correntemente utilizados podemos citar os agentes químicos, os tratamentos cirúrgicos e a imunoterapia.

Entre os agentes químicos, utilizados para tratar lesões condilomatosas destacam-se a podofilina, o ácido tricloroacético. São drogas cáusticas que visam a destruição do tecido infectado e não tem qualquer ação antiviral seletiva. Apesar disso, Phelps & Alexander (1995) observam que uma resposta imune benéfica pode ser estimulada em decorrência da exposição de antígenos virais ocasionada pela citólise.

A podofilina é um extrato alcoólico ou oleoso da resina das plantas *Podophyllum emodi* ou *Podophyllum peltatum* (Wikström, 1995). Greene (1992) demonstra que a podofilotoxina, seu componente mais ativo, atua parando a divisão celular e provocando necrose das lesões de condiloma. É o método mais correntemente utilizado. Entretanto não apresenta elevados índices de cura, possui efeitos colaterais (ex. neurotoxicidade, mielotoxicidade e etc) e é contra-indicado para uso durante a gestação por determinar efeitos teratogênicos.

O ácido tricloroacético é um agente muito cáustico e pode causar sérios danos a pele sadia. Porém não possui absorção sistêmica e pode ser empregado durante a gestação.

O 5-fluorouracil é um antagonista de pirimidinas, atua inibindo a síntese ARN e ADN produzindo efeito antiproliferativo. Possui efeito imunoestimulador, desencadeado por reação de hipersensibilidade. Devido ao seu mecanismo de ação não deve ser prescrito durante a gravidez.

Dentre os tratamentos cirúrgicos observa-se eletrocoagulação, excisão simples com a tesoura, laser de dióxido de carbono e crioterapia. A eficiência de cura por esses métodos varia de 60% a 90% (Krauss, 1990: Stone, 1990).

Ferenczy (1990) demonstrou que a fumaça produzida na utilização do laser de dióxido de carbono contém ADN do HPV. Halmo em 1991 demonstrou a existência de casos isolados de infecção das vias aéreas de cirurgiões que utilizaram o laser no tratamento de pacientes. Em função disso, como medida de segurança, os profissionais da área são atualmente instruídos para a utilização de máscaras cirúrgicas. Porém, essas máscaras foram projetadas na intenção de manter as bactérias do trato respiratório fora do ambiente cirúrgico sendo, portanto inúteis para proteger contra vírus inalados

(Wisniewski, 1990). A crioterapia é outro procedimento cirúrgico que também possui boa aceitação por parte dos pacientes. Entretanto, sua maior vantagem é a sua aceitação em gestantes.

Na homeopatia observa-se a utilização da Thuya, com resultados ainda pouco divulgados na literatura.

O tratamento com imunomoduladores baseia-se na deficiência imunológica demonstrada por pacientes predispostos a infecções recidivantes ou persistentes (Passos et al, 1995). O tratamento imunológico teve como pioneiros os estudos de Powell et al em 1970, que obtiveram sucesso no tratamento de 24 casos de condiloma resistente utilizando vacina autógena. Posteriormente, a utilização do α -interferon gerou expectativas promissoras quanto ao tratamento das lesões por HPV, mas os resultados foram controversos e nenhum protocolo foi considerado de fato eficiente ou reproduzível (Passos et al, 1995).

O imiquimod é um potente estimulador do sistema imunológico, em especial de citocinas, como os interferons (Moore et al, 2001). Amplamente estudado em nossos dias, tem se demonstrado bastante efetivo em seus resultados. Efeitos adversos, como reação inflamatória são observados, mas são temporários e cessam logo após o tratamento. Os estudos de Moore et al (2001) apontam ainda para a forma prática da utilização deste medicamento que pode ser aplicado pelo próprio paciente sem auxílio de médicos.

A utilização de vacinas, que objetivam o fortalecimento do sistema imunológico permitindo o desenvolvimento de anticorpos para combater o vírus, deve acontecer nos próximos anos. No momento vacinas profiláticas ou com fins terapêuticos para utilização em pacientes já infectados estão em fase de teste nos Estados Unidos e na Inglaterra. No Brasil, mulheres livres de HPV pertencentes a faixa etária de 18 a 25 anos já foram recrutadas pelo Hospital do Câncer e pelo Instituto Brasileiro de Controle de Câncer, receberam a vacina contendo antígenos virais do HPV 16 sintetizados em sistema de clonagem com vetor baculovírus e hoje, estas mulheres fazem o acompanhamento regular a fim de verificar se há de fato proteção contra infecção (Hospital do Câncer, 2003).

Prevenção

A prevenção do câncer cervical é baseada no exame de Papanicolau e, para a maioria da população, esse exame é realizado em Programas de Saúde Pública. O câncer cervical é precedido de lesões neoplásicas intraepiteliais. Oliveira et al (2002) destacam que o HPV é uma doença prevenível e refere que estratégias de triagem da população feminina são necessárias. Assim, a detecção destas lesões é de fundamental importância para a prevenção do câncer, visto que podem ser tratadas. Assim, a visita freqüente ao ginecologista aumenta as chances de um diagnóstico precoce, e torna raro o acometimento da paciente pelo carcinoma cervical. De modo contrário, a falta de acompanhamento médico e a não realização do preventivo anual constituem fatores de risco para o câncer (Mougin et al, 2001).

Sendo o HPV, uma doença de transmissão sexual, as medidas tomadas para reduzir os riscos de DST previnem também a transmissão do HPV e conseqüentemente o câncer cervical: higiene adequada, uso de preservativos, redução do número de parceiros sexuais, entre outros.

As dificuldades terapêuticas, a inexistência de uma vacina eficaz contra a infecção e a doença pelo HPV, a persistência da doença, as recidivas constantes e a inexistência de uma terapia antiviral segura, apontam a necessidade de campanhas constantes de Saúde Pública visando o bloqueio da disseminação do vírus na nossa população.

No Brasil, o programa Viva Mulher instalado no ano 2000, visando ampliar o alcance do Papanicolau, já surtiu os primeiros resultados e a incidência do carcinoma cervical caiu à metade a partir de 2001, de 40.000 novos casos para 20.000 em 2002 e 18.000 em 2003 (Hospital do Câncer, 2003).

OBJETIVOS

- Determinar a prevalência das infecções causadas pelos papilomavírus humanos, em mulheres atendidas no Laboratório Sérgio Franco, no Estado do Rio de Janeiro utilizando a Técnica de Captura do Híbrido II.
- Identificar a distribuição dos tipos virais considerados de baixo e alto risco para evolução maligna, na faixa etária de 15 a 70 anos em pacientes do sexo feminino.
- Iniciar uma análise comparativa entre as técnicas de Captura Híbrida II e PCR na detecção das infecções causadas pelos HPV.
- Avaliar o potencial de utilização das medidas de RLU (unidade relativa de luz) obtidas pela Captura Híbrida como medida de carga viral, relacionada ao grau das lesões estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Consentimento pelo Comitê de Ética - Nosso projeto de tese foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa nos termos da resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e devidamente registrado no Comitê de Ética em pesquisa sob a resolução CEP CMM/HUAP nº21/01.

Pacientes - Nossa pesquisa foi realizada retrospectivamente com 1055 amostras de pacientes com idade entre 15 e 70 anos atendidas no Laboratório Dr. Sérgio Franco, no período de janeiro a dezembro de 2000. As pacientes foram submetidas a coleta de esfregaços cervicais para realização do teste de Captura do híbrido Hybrid Capture Assay II™ (HCA II). As amostras foram coletadas em tubos apropriados (Digene Diagnostics - Silver Spring, Md.) e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular em líquido conservante adicionado ao meio de transporte do kit, sem a necessidade de refrigeração.

Análise das amostras pela Citopatologia - Em nossa pesquisa, 454 participantes tiveram esfregaços cervicais colhidos para o exame de Papanicolau. A análise citopatológica dessas amostras foi realizada pela equipe de técnicos em citopatologia do Laboratório Dr. Sérgio Franco. Inicialmente, o material coletado das pacientes foi preparado em lâminas de microscopia e essas lâminas foram coradas pela técnica de Papanicolaou. Os resultados foram classificados de acordo com as características observadas no esfregaço, no formato proposto por Papanicolaou e classificados segundo proposto pelo Sistema Bethesda, da seguinte forma:

TABELA 2: Correlação entre os resultados da Citopatologia por Papanicolaou e segundo Bethesda

PAPANICOLAOU	SISTEMA BETHESDA	CARACTERÍSTICAS	
PAP I	normal	Células normais, sem qualquer padrão de alteração citopatológica;	
PAP II	Sem HPV	ASCUS	Esfregaço contendo células apresentando alterações de natureza inflamatória;
	Com HPV	HPV	Esfregaço contendo células que apresentam alterações características de infecção por papilomavírus;
PAP III	NIC I	LSIL	Esfregaço contendo células apresentando características de neoplasia leve
	NIC II/ III	HSIL	Esfregaço contendo células apresentando características de neoplasia moderada à severa/Ca in situ.
PAP IV	Ca	Carcinoma invasor de células escamosas	

Estocagem do material - Após chegarem ao laboratório, as amostras foram conservadas a uma temperatura de 2-8°C até o momento de sua utilização no teste, em prazo máximo de uma semana.

Detecção da presença de HPV pela técnica de Captura Híbrida - Todas as amostras foram testadas para detecção do ADN do HPV pelo ensaio de Captura Híbrida, de acordo com a solicitação do médico clínico. A técnica consiste de um processo de hibridização, no qual os híbridos formados são em seguida capturados com a utilização de anticorpos monoclonais e, detectados por quimioluminescência quanto à presença de 18 tipos de HPV divididos em dois grupos, o grupo A contendo os tipos de baixo risco (6, 11, 42, 43, e 44) e o grupo B contendo os tipos de risco alto/intermediário (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68).

Execução da Técnica de Captura do Híbrido

A realização do Ensaio de Captura dos Híbridos ocorreu de acordo com as normas do kit HCA II. A primeira etapa do teste foi a desnaturação do material. Nesta etapa, foi feita a adição de 500µl do reagente de desnaturação em todas as amostras. Foi feita uma agitação vigorosa em vortex, para que a homogeneização ocorresse uniformemente em todo o tubo. As amostras passaram a apresentar coloração púrpura, devido à presença do corante indicador no tubo, indicando que estavam adequadas para uso. Colorações alteradas indicaram presença de inibidores inespecíficos e foram descartadas, sendo necessária a requisição de nova amostra para teste. Em seguida, o material foi incubado em banho-maria a uma temperatura de 65°C por 45 minutos, para a ocorrência do processo de desnaturação. O material desnaturado foi retirado do banho-maria e submetido a agitação em vortex durante 5 segundos.

A segunda etapa do teste, a hibridização, ocorreu em tubos eppendorf. Para cada amostra, utilizou-se um tubo onde foi adicionado 75µl da amostra e 25µl da sonda para os tipos considerados de baixo risco (grupo A) e, outro tubo onde foi adicionado 75µl da amostra e 25µl da sonda para os tipos de risco alto/intermediário. O material foi submetido a agitação a 1100 rpm por 3 minutos. O processo de hibridização ocorreu em banho-maria 65°C por 60 minutos.

O terceiro passo foi a captura dos híbridos. Essa etapa foi realizada em microplaca contendo uma fase sólida formada por anticorpos específicos para os híbridos

formados, aonde foram inoculados 100µl da amostra em teste. O material foi agitado em placa a 1100 rpm em uma temperatura de 20°C por 60 minutos.

Ao término da etapa de captura dos híbridos, o material foi decantado por inversão completa da placa. A próxima fase foi a de detecção dos híbridos capturados. Adicionou-se em 75µl do Reagente de Detecção 1, formado por anticorpo anti-híbrido conjugado à enzima fosfatase alcalina. A placa foi incubada à 20°C durante 30 minutos. Após o período de incubação, a microplaca foi cuidadosamente invertida em papel absorvente limpo para que todo o conjugado fosse removido. Em seguida, cada orifício foi lavado individualmente por lavagens sucessivas com o tampão de lavagem do kit. Depois da lavagem as placas foram novamente invertidas por 5 minutos em papel absorvente.

A última etapa na execução do teste foi a amplificação do sinal. Foram adicionados 75µl do Reagente de Detecção 2, Emerald II (substrato quimioluminescente da reação). As placas foram então incubadas por 15 minutos à 20°C, no escuro. O resultado do teste foi obtido por leitura de densidade ótica em luminômetro, imediatamente após os 15 minutos de incubação, com os valores apresentados em Unidades Relativas de Luz (RLU). Em cada teste, foi dado um valor de corte (*Cut off*) para as RLU obtidas pelos controles positivos da sonda A (CPA) e outro pelos controles positivos da sonda B (CPB). O *Cut off* foi fornecido pela média dos resultados da RLU de cada controle, obtendo-se desta forma um *Cut off* positivo da sonda A e um *Cut off* positivo da sonda B. A amostra foi considerada positiva quando a relação entre a sua RLU e o *Cut off* apropriado (positivo A e/ou positivo B) obteve um valor maior do que 1.

Detecção da presença de HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase - A técnica consiste de um ensaio de amplificação do material genético da amostra, pela utilização de uma enzima resistente a mudanças de temperatura e de moldes iniciadores. Em nosso trabalho, o ensaio foi realizado para comprovar a existência do ácido nucléico viral na amostra das pacientes.

➤ **Neutralização das amostras**

As amostras estocadas em meio de transporte do kit Digene para HCA II foram separadas em alíquotas de 500µl, neutralizadas volume/volume em ácido clorídrico 1N (HCl) e estocadas a -20°C.

➤ **Precipitação das proteínas**

Em cada tubo contendo 500µl de amostra foram adicionados 50µl de uma solução saturada de NaCl 6M. Foi feita a homogeneização do material em vortex durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000rpm por 15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para novo tubo eppendorf.

➤ **Precipitação do ADN**

Foi adicionado em cada amostra, acetato de sódio 3M pH 6,0 na proporção de 1/10 do volume, seguido de 2,5 vezes do mesmo volume de etanol absoluto. Foi feita homogeneização suave por inversão do tubo. Em seguida, as amostras foram mantidas a -20°C por uma noite. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido pela inversão do tubo em um lenço de papel. Em seguida, o pellet foi ressuspensão em etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 14000 rpm durante 10 minutos, procurando manter os tubos na mesma orientação em que o pellet se encontrava anteriormente. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos para que houvesse a evaporação total do etanol. O sedimento de ADN foi ressuspensão em 50µl de água destilada estéril e a amostra foi então estocada a -20°C.

Execução da técnica de PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase foi realizada com a utilização de primers nucleotídicos genéricos MY 09/MY 11 que amplifica uma seqüência de ADN de 450 pares de bases (bp) dentro do gene L1 do HPV. Como controle de qualidade da amostra, foram utilizados um par de primers do gene da actina humana, Ac1 e Ac2, que amplificam uma seqüência de 310 bp do ADN humano. Como controle positivo da reação foi utilizado

Fago λ como molde de ADN e um par de primers $\lambda 1$ e $\lambda 2$) que amplificam um segmento de 500bp.

A reação de amplificação foi executada em 50 μ l da seguinte mistura de reação:

5 μ l do tampão de PCR 10X

8 μ l (200 μ mol) de nucleotídeos – dNTPs

1 μ l (50pmoles) do oligonucleotídeo MY09

1 μ l (50pmoles) do oligonucleotídeo MY11

0,1 μ l (5pmoles) do oligonucleotídeo Ac 1

0,1 μ l (5pmoles) do oligonucleotídeo Ac 2

4 μ l MgCl₂ 50mM

0,25 μ l (0,25 unidades) de Taq polimerase,

5 μ l da amostra

água em qsp 50 μ l

O ensaio foi realizado em termociclador (Perkin Elmer, CETUS), no qual as amostras foram submetidas a um programa de 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto de: 1 minuto a 94°C – para desnaturação do ADN, 2 minutos a 55°C – para anelamento e 2 minutos a 72°C – para alongamento da cadeia. Sendo que, a cada programa de 35 ciclos, foi feita uma pré-desnaturação do ADN colocando as amostras a 94°C durante 5 minutos. Ao final do programa, as amostras foram colocadas a 72°C durante 10 minutos, para estabilização.

Teste da presença do ADN HPV nas amostras

O resultado da reação foi analisado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador. O padrão de peso molecular Fago λ 123bp (GIBCO, BRL) foi utilizado como controle padrão de peso molecular.

TABELA 3: Seqüência dos nucleotídeos genéricos MY 09/ MY 11 e da β -actina

OLIGONUCLEOTÍDEO	5' OLIGONUCLEOTÍDEOS 3'	PARES DE BASES AMPLIFICADOS NA PCR
MY 09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	450
MY 11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	
Ac 1	TTG CGT TAC ACC CTT TCT TG	310
Ac 2	GTG TGG ACT TGG GAG AGG AC	

Onde: M= A + C
R= A + G
W= A + T
Y= C + T

Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico SSPS-8 (USA, 2002) para obtenção de todos os dados de significância, bem como dos parâmetros de avaliação das técnicas de PCR e HCA II.

RESULTADOS

Amostras

Em nosso estudo avaliamos amostras de 1055 pacientes do sexo feminino, com idade variando entre 15 e 70 anos. A idade média dessas participantes foi de 31,5 anos.

Detecção do ADN do HPV pela técnica de Captura Híbrida

O ensaio detectou 510 amostras (48,3%) de pacientes que apresentavam infecção pelo HPV. Um total de 11,8% (60) das pacientes apresentou infecção pelo grupo A, contendo tipos considerados de baixo risco de evolução para o câncer cervical, enquanto 52,7% (269) pacientes apresentaram infecção pelos tipos oncogênicos presentes no grupo B, considerados assim de alto risco. As infecções múltiplas (grupo A e B) foram observadas em 35,5% (181) das pacientes (Tabela 4).

TABELA 4: Prevalência de HPV de alto e baixo risco detectada pela Captura do Híbrido

PACIENTES	Grupo A	Grupo B	Grupo A/B	PREVALÊNCIA TOTAL
n = 1055	60	269	181	510
PERCENTUAL	11,8%	52,7%	35,5%	48,3%

Distribuição do HPV de acordo com a idade das pacientes

Na tabela 5 pode ser vista a prevalência de HPV detectada de acordo com a idade das pacientes que participaram do nosso estudo. Vale ressaltar que cerca de 45,8% (233) destas participantes possuíam entre 21 e 30 anos de idade.

TABELA 5: Prevalência do HPV de acordo com a idade das pacientes

INTERVALOS DE IDADE	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70
PACIENTES N=510	98	233	112	46	17	4
PERCENTUAL	19,2	45,8	21,9	9,0	3,3	0,8

Diagnóstico Citopatológico das pacientes de acordo com a idade

Das 1055 pacientes estudadas, 454 realizaram exame de Papanicolaou nos Laboratórios Dr. Sérgio Franco. A tabela 6 apresenta a média de idade destas pacientes de acordo com o diagnóstico citopatológico (Papanicolaou). Podemos notar que entre as participantes que obtiveram o diagnóstico considerado NORMAL encontramos as pacientes mais jovens do nosso grupo de estudo, 22,1 anos. As pacientes que possuem diagnóstico de lesões de alto grau (HSIL) foram encontradas entre as que possuem idade mais avançada (média de 49,3 anos).

TABELA 6: Média de idade das pacientes de acordo com o diagnóstico citopatológico

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	NORMAL	ASCUS	HPV	LSIL	HSIL
MÉDIA DE IDADE DAS PACIENTES	22,1	28,1	27,9	34,8	49,3

Acordo entre diagnóstico citopatológico e presença de ADN viral

A tabela 7 apresenta a prevalência do ADN do HPV de acordo com o resultado do exame de Papanicolaou. A prevalência do ADN viral no grupo estudado foi de 58,4% (265/454), variando de 29,6% (8/27) em pacientes com resultado citopatológico NORMAL, até 84,8% (28/33) em pacientes demonstrando lesões de alto grau, ou HSIL (lesões intraepiteliais escamosas de alto grau). Diferenças estatisticamente significantes foram detectadas entre os esfregaços considerados normais, e as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau ($p < 0,0001$) para a infecção cervical do HPV. Observamos também a prevalência dos dois grupos de HPV em relação aos resultados observados pela Citopatologia. Nas pacientes com ASCUS, HPV de baixo risco (grupo A) foi detectado em 3,5% (6/169); em pacientes que obtiveram resultado suspeito de HPV, o grupo A foi observado em 7,3% (8/110); nos casos de resultados com lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) o ADN do grupo A foi detectado em 8,7% (10/115) enquanto em HSIL, o grupo A só foi detectado em associação com o grupo B. O grupo B foi detectado sozinho e/ou em conjunto com o grupo A na maioria dos casos, havendo aumento progressivo da prevalência de acordo com a severidade do diagnóstico citopatológico, variando de 16% (27/169) em ASCUS até 84,8% (28/33) em HSIL.

TABELA 7: Prevalência de HPV de baixo (Grupo A) e alto risco (Grupo B) de acordo com o diagnóstico citopatológico

CITOPATOLOGIA	NÚMERO DE PACIENTES	CAPTURA HÍBRIDA			PREVALÊNCIA(%)
		Grupo A	Grupo B	Grupos A/B	
NORMAL	27	1	4	3	8 (29,6%)
ASCUS	169	6	14	13	33 (19,5%)
HPV	110	8	55	29	92 (83,6%)
LSIL	115	10	66	28	104 (90,4%)
HSIL	33	-	17	11	28 (84,8%)
TOTAL	454	25	156	84	265 (58,4%)

Observação da carga viral obtida pela Captura Híbrida

O valor médio da carga viral obtida pela Captura Híbrida pode ser observado na tabela 8. Quando comparamos o resultado obtido pelos esfregaços normais e os esfregaços com diagnóstico LSIL detectamos diferenças significativas. Tal observação foi mais relevante para infecções por HPV de baixo risco (grupo A) e para as infecções de alto risco (grupo B) ($P < 0,00001$) mas apresentou resultados controversos para as infecções múltiplas (grupo A/B).

TABELA 8: Correlação das medidas de carga viral com o diagnóstico citopatológico

HCA II	DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO				
	NORMAL	ASCUS	HPV	LSIL	HSIL
Grupo A	10,9	51,9	206,3	185,0	-
Grupo B	22,1	85,5	263,4	367,4	723,1
Grupo A/B	64,2/223,4	694,4/891,8	510,3/824,0	110,7/613,75	345,1/850,7

Deteccção do HPV pela técnica de Reacção em Cadeia da polimerase (PCR)

Quarenta amostras obtidas das pacientes previamente estudadas, que possuíam resultado de Citopatologia no mesmo momento da Captura Híbrida, foram seleccionadas ao acaso, sem que fossem considerados os resultados da técnica ou da Citopatologia, para a realização do ensaio de PCR a partir do mesmo material retirado para o exame.

Diagnóstico citopatológico apresentado pelas pacientes seleccionadas para realização do ensaio de PCR

Conforme está representado na tabela 9, das 40 pacientes avaliadas, três (7,5%) obtiveram diagnóstico citopatológico normal, oito (20%) apresentaram atipia celular de significância indeterminada, oito (20%) demonstraram alterações suspeitas de infecção pelo papilomavírus enquanto em 21 (52,5%) das amostras já havia referência a presença de lesões características de infecção pelo HPV, sendo que em 95,2% (20/21) dessas, as lesões eram de baixo grau e em apenas 4,8% (1/21) as lesões eram de alto grau.

TABELA 9: Resultados do teste citopatológico nas pacientes estudadas

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO					
n = 40					
	NORMAL	ASCUS	HPV	LSIL	HSIL
PREVALÊNCIA	3	8	8	20	1
(%)	7,5%	20%	20%	50%	2,5%

Apresentação dos resultados da Captura Híbrida das pacientes selecionadas para PCR de acordo com o resultado da Citopatologia

De acordo com o que está representado na tabela 10, no ensaio de Captura Híbrida, o ADN do HPV foi detectado em 75% (30/40) das amostras. Essa positividade do ácido nucléico viral foi apontada em 25% (2/8) das amostras com resultado citopatológico de ASCUS, em 87,5% (7/8) dos casos suspeitos de infecção viral (HPV), e em 100% (21/21) das pacientes que apresentavam lesões de baixo e alto grau, LSIL e HSIL, respectivamente. Quanto à prevalência dos grupos de HPV observados no ensaio de Captura do Híbrido, o grupo A, de baixo risco, foi detectado em 7,5% (3/40) dos casos, sendo 2 em amostras suspeitas de HPV e 1 apontada em um caso de LSIL. Os tipos de alto risco, foram confirmados em 32,5% (13/40) pacientes, sendo 2 em ASCUS, 3 em esfregaços suspeitos de HPV, 7 em LSIL e 1 nas amostras com HSIL correspondendo a 87,5% e 100% respectivamente. As infecções múltiplas foram determinadas em 35% (14/40) das amostras.

TABELA 10: Ocorrência da infecção por HPV pela técnica de Captura Híbrida de acordo com a Citopatologia

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	CAPTURA HÍBRIDA			PREVALÊNCIA(%)
	Grupo A	Grupo B	Grupo A/B	
NORMAL (n=3)	-	-	-	-
ASCUS (n=8)	-	2	-	2 (25%)
HPV (n=8)	2	3	2	7 (87.5%)
LSIL (n=20)	1	7	12	20 (100%)
HSIL (n=1)	-	1	-	1 (100%)
TOTAL (n=40)	3	13	14	30 (75%)

Apresentação do diagnóstico obtido pela PCR em associação com o resultado da Citopatologia

De acordo com o representado na tabela 11, a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) detectou positividade para o ADN do vírus em 70% (28/40) das amostras, sendo 3 em pacientes com ASCUS, 7 em casos suspeitos de HPV, 17 em LSIL e 1 em HSIL.

TABELA 11: Ocorrência da infecção por HPV pela técnica de PCR de acordo com o diagnóstico citopatológico

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	PCR		PREVALÊNCIA
	POSITIVO	NEGATIVO	
NORMAL (n=3)	-	3	-
ASCUS (n=8)	3	5	3 (37.5%)
HPV (n=8)	7	1	7 (87.5%)
LSIL (n=20)	17	3	17 (85%)
HSIL (n=1)	1	-	1 (100%)
TOTAL (n=40)	28	12	28 (70%)

Associação dos resultados obtidos entre as três técnicas

A tabela 12 está demonstrando os resultados dos três testes. Observamos que houve concordância de 100% entre os testes nos casos de confirmação do ADN viral, tanto em pacientes com suspeita de HPV quanto em pacientes com HSIL. As discordâncias ocorreram nos diagnósticos de ASCUS e LSIL. A técnica de PCR diagnosticou positividade em uma amostra com resultado de ASCUS a mais do que a HCA II. Com relação aos casos LSIL, a citopatologia e a HCA II foram 100% concordantes. Entretanto para a PCR, a concordância foi de apenas 85% (17/20) dos casos.

TABELA 12: Resultados das técnicas de PCR e HCA II em relação à Citopatologia

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	NÚMERO DE PACIENTES	CAPTURA DO HÍBRIDO			PCR	CONCORDÂNCIA
		A	B	A/B		
NORMAL	3	-	-	-	-	100%
ASCUS	8	-	2	-	3	66%
HPV	8	2	3	2	7	100%
LSIL	20	1	7	12	17	85%
HSIL	1	-	1	-	1	100%
TOTAL	40	3	13	14	28	85.7%

Análise estatística

Analisando estatisticamente os três métodos, sendo a Citopatologia utilizada como referência no diagnóstico, observamos os seguintes resultados: pelo Teste Exato de Fischer podemos observar que tanto a HCA II ($p=0$) quanto a PCR ($p=0,002$) demonstram associação positiva com a Citopatologia, onde por associação positiva entende-se que as técnicas detectam alterações (= diagnóstico positivo) nas mesmas amostras. Mas em termos de concordância total com a Citopatologia, a Reação de Polimerase em Cadeia foi apenas regular ($\kappa=0,60$) enquanto a Captura do Híbrido foi excelente ($\kappa=0,81$). Observamos também que para ausência de HPV, os testes entre si têm boa concordância ($\kappa=0,76$) mas para a presença do HPV a concordância é regular ($\kappa=0,56$).

Na tabela 13 estão demonstrados os valores de especificidade e sensibilidade de ambos os testes de detecção do ADN viral. Nessa avaliação observamos que a HCA II demonstrou maior sensibilidade (96,5%) do que a PCR (86,2%). Já na avaliação da especificidade, obtida segundo o programa estatístico SSPS-8 os dois testes demonstraram concordância absoluta com o método citopatológico.

TABELA 13: Avaliação de parâmetros estatísticos da eficiência da PCR e da Captura do Híbrido

	CAPTURA DO HÍBRIDO	PCR
SENSIBILIDADE	96.5%	86,2%
ESPECIFICIDADE	100%	100%

Carga viral média obtida pela HCA II nas pacientes seleccionadas para PCR

As tabelas 14 e 15 apresentam os valores da carga viral média obtida no ensaio de Captura Híbrida comparando-os com as técnicas de PCR e Citopatologia. Na tabela 14 em que estão relacionados os valores de carga viral obtidos em relação ao diagnóstico citopatológico pode ser comprovado que, dentre as 40 pacientes avaliadas, nas infecções por HPV de baixo risco (grupo A) os valores de carga viral apresentaram aumento acompanhando a severidade das lesões, onde a RLU média alcançada para diagnósticos do tipo HPV foi 15,28 enquanto para LSIL a RLU média foi de 370,78. Na mesma tabela, pode também ser visto que HPV do grupo B (alto risco) foi detectado a partir dos esfregaços que apresentam células atípicas (ASCUS), onde a carga viral apresenta-se pouco elevada, aumentando nos casos suspeitos de HPV e nas LSIL, mas diminuindo novamente nas HSIL. As infecções múltiplas também apontaram valores de RLU mais altos.

TABELA 14: Relação entre o diagnóstico citopatológico e os valores médios da carga viral obtida pela Captura do Híbrido

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	CARGA VIRAL (RLU/PC)		
	A	B	A/B
NORMAL	-	-	-
ASCUS	-	43,32	-
HPV	15,28	309,60	870,50/237,48
LSIL	370,78	337,45	911,81/908,05
HSIL	-	63,44	-

Associação dos valores da carga viral da HCA II com a positividade da PCR

A correlação entre os valores da carga viral média obtida pela técnica de Captura Híbrida e a positividade da PCR nas pacientes selecionadas pode ser vista na tabela 15. Observa-se que independente do grupo viral detectado pela Captura Híbrida, A, B ou A/B, o ensaio de PCR e HCA tem maior concordância quando a carga viral média está mais elevada.

TABELA 15: Relação entre a PCR e a média da carga viral obtida pela Captura Híbrida

PCR	CARGA VIRAL (RLU/PC)		
	A	B	A/B
POSITIVO	199,68	291,77	915,87/1095,62
NEGATIVO	1,98	115,79	891,48/470,19

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, inúmeras metodologias diagnósticas vêm sendo aperfeiçoadas a fim de aprimorar a detecção precoce da infecção e das lesões por HPV. Classicamente, o rastreamento destas lesões é feito pelo teste de Papanicolaou, implantado em nosso país a partir de 1967 (Segi, 1977). Morrison (1993) comprova que resultados falso-positivos, que indicam baixa especificidade, e falso-negativos (baixa sensibilidade) vêm sendo descritos e diversos grupos de pesquisa questionam a eficiência do rastreamento das lesões neoplásicas precursoras do câncer utilizando apenas o teste citopatológico de Papanicolaou e sugerem a adição de outros métodos para fornecer maior exatidão no diagnóstico de rotina das lesões cervicais (Ferenczy, 1995). A utilização de testes de detecção viral tem sido vista especialmente nos casos de lesões intraepiteliais cervicais (SIL) perdidas pela Citopatologia, que acabam sendo falsamente diagnosticadas como negativas. Em consequência disso, Ferenczy em 1995 sugere que métodos objetivando a comprovação do ADN viral sejam empregados de forma simultânea com a rotina citopatológica, apontando um aumento na eficiência dos resultados de 68%, quando apenas o Papanicolaou é utilizado, para 89% quando os dois testes são combinados. Desta forma, nos pareceu oportuno avaliar a utilização do teste de Captura Híbrida e comparar seus resultados com o diagnóstico obtido pela Citopatologia, bem como com a PCR, visto que a Captura do Híbrido, um kit importado de detecção do ADN do HPV, vem sendo implantada em diversos laboratórios de Patologia e Análises Clínicas mas ainda tem sido pouco estudada em nosso país (Carestiato et al, 2002).

A nossa pesquisa foi realizada com 1055 pacientes do sexo feminino atendidas nos Laboratórios Sérgio Franco, no ano 2000. Destas, 48,3% (510) apresentavam infecção por HPV (tabela 4). Resultados similares foram descritos por Schiffman et al (1995b) e Castle et al (2002) que comprovaram de forma elegante a confiabilidade e a reprodutibilidade da técnica de Captura do Híbrido para ensaios de rotina clínica.

Conforme está representado na tabela 4, o grupo B que representa tipos de HPV de alto potencial oncogênico estava presente, sozinho em 52,7% das amostras ou em infecções múltiplas (35,5%) totalizando 88,2% dos casos de infecção por HPV. Essa alta prevalência de tipos com maior potencial oncogênico indica a existência de pacientes com maior possibilidade de progressão ao câncer. Nobbehenius et al (1999), descrevem que a infecção com HPV de alto risco é necessária para o desenvolvimento e manutenção de lesão de alto grau, além de favorecer o estabelecimento do câncer cervical.

Diversos autores já demonstraram que as infecções genitais por HPV são uma doença de adultos jovens (Chuang et al, 1984; Becker et al, 1987). A nossa pesquisa também comprovou que pacientes pertencentes ao intervalo de idade de 20–30 anos são as que apresentam o maior índice de infecção pelo vírus, corroborando com os achados de Muñoz (2000) na população estudada na Costa Rica, em que faz a associação da infecção com o início da vida sexual (tabela 5).

Em nosso trabalho, nós observamos que a distribuição das lesões pelo HPV é idade dependente, com uma tendência progressiva dos casos de ASCUS para HSIL, mostrando claramente que a infecção pelo HPV ocorre em estágios múltiplos, culminando com o estabelecimento do câncer, em idade de aproximadamente 50 anos (tabela 6).

Avaliando a correlação entre Citopatologia e Captura do Híbrido, observamos na tabela 7, um percentual de 29,6% dos casos diagnosticados como NORMAL pelo teste de Papanicolau, com resultado positivo para o ADN do HPV, sugerindo processos de infecção latente ou ainda, resultados falso-negativos pela Citopatologia. Outros estudos já haviam apontado resultados semelhantes (Callaghan et al, 2001). Vale ressaltar que 25,9% (7/27) dessas pacientes apresentavam infecção associada com tipos virais reconhecidos como de alto potencial oncogênico. Nossa causuística é pequena, e estudos futuros são necessários a fim de corroborar estes percentuais, mesmo assim Mouglin et al (2001) descrevem que a ocorrência de infecções por HPV de alto risco em mulheres sexualmente

ativas é comum, podendo ser vistas em 15% - 40% dos casos. Nós acreditamos que exatamente nesses casos, o emprego de técnicas de Biologia Molecular, demonstrando a presença do ADN viral se mostra importante por permitir apontar possíveis falhas no diagnóstico citopatológico que poderiam ser minimizadas com o auxílio de tais metodologias, que podem indicar a presença de HPV de alto potencial oncogênico indicando assim a possibilidade de um risco aumentado de progressão ao câncer. Rozendaal et al (1996) relatam que mulheres apresentando resultado citopatológico NORMAL, que apresentam positividade para HPV de alto potencial oncogênico possuem risco até 116 vezes maior para o desenvolvimento de lesões de alto grau, do que aquelas infectadas com outros tipos.

Com relação aos casos de ASCUS, observamos na tabela 7 que das 169 amostras com diagnóstico citopatológico desse tipo, o HPV foi detectado em 19,5% (33/169) das amostras. Estudos acerca da biologia dos HPV revelam que diagnósticos do tipo ASCUS podem representar um amplo espectro de entidades clínicas, desde mudanças benignas até o câncer (Smith et al, 2000). Entretanto, vale ressaltar, que a prevalência de 19,5% de esfregaços do tipo ASCUS demonstrando a presença do ADN viral está abaixo daquela já observada na literatura, que aponta uma média de 40% - 50% de positividade para o HPV quando diagnósticos desse tipo são observados pela Citopatologia (Clavel et al, 2001). A utilização de técnicas mais sensíveis de detecção do ADN viral, como a PCR, poderia revelar taxas ainda mais elevadas de infecção. Além disso, Smith et al (2000) descreveram em estudo sobre a reavaliação de esfregaços atípicos e observa que em menos de 30% dos casos ocorre um consenso entre os citopatologistas e que na maioria dos casos de acordo entre esses observadores os esfregaços obtém diagnósticos do tipo NORMAL. Essa variabilidade na interpretação dos diagnósticos citopatológicos também já havia sido descrita por Walboomers et al (1995) e Clavel et al (1999).

Ainda em relação ao grupo com diagnóstico de ASCUS, observamos na tabela 7 que em 81,8% (27/33) das pacientes infectadas, o ADN para o HPV do grupo B, representando tipos de alto risco para a carcinogênese cervical foi demonstrado, sugerindo processos latentes, persistentes ou ainda incipientes. Entretanto, estudos aprimorando o emprego da terminologia de ASCUS vem sendo realizados. No momento,

em consequência das controvérsias existentes em torno desse diagnóstico, a conduta de acompanhamento dessas pacientes ainda apresenta divergências. De qualquer forma, nestes casos, o emprego de metodologias de detecção do ADN viral tem sido recomendado com o objetivo de elucidar estes diagnósticos inconclusivos ou conflitantes, valendo ressaltar a utilização do Ensaio de Captura do Híbrido, que confirmaria o diagnóstico desses casos e ainda apontaria a presença em HPV dos grupos de baixo e alto risco.

Das 110 pacientes que demonstravam diagnóstico citopatológico caracterizando a presença de alterações compatíveis com infecção viral, o HPV foi observado em 83,6% (92/110) dos casos. Este fato aponta uma ótima correlação entre a Citopatologia e a HCA II. Resultados como este demonstram que o clássico método citopatológico ainda pode ser considerado como o mais adequado para o rastreamento e detecção de lesões malignas e pré-malignas do trato genital, em grandes populações. A combinação dos resultados obtidos pela Citopatologia com os da HCA II nos permitiu também observar que em 91,3% (84/92) dos casos positivos para o teste molecular, as amostras apresentavam ADN para HPV de alto risco oncogênico, fossem estes em infecções simples ou múltiplas (com os dois grupos virais), revelando a existência de um grande número de pacientes com maior potencial de evoluir para o câncer.

Entretanto, observamos também a existência de esfregaços que se apresentavam alterados ao exame citopatológico, (18 amostras com diagnóstico de HPV, 11 com diagnóstico de LSIL e 5 com HSIL) que se mostraram negativos no teste de HCA II. A inconsistência desses resultados pode ser devido ao baixo número de cópias do genoma viral, infecção por tipos não representados no teste, problemas de sensibilidade da técnica de Captura do Híbrido ou em consequência de resultados falso positivos apontados pela Citopatologia, conforme estão descritos na literatura (Vernon et al, 2000, Yamazaki et al, 2001).

Ainda na tabela 7, observamos que aproximadamente 90% das LSIL apresentam ADN do HPV. Os resultados obtidos pelo ensaio de Captura Híbrida estão fortemente associados com os diagnósticos de SIL obtidos nos esfregaços cervicais. Estes casos são aqueles onde a concordância é mais satisfatória entre as técnicas de Citopatologia e Captura Híbrida. Da mesma forma, observamos que a HCA II tem o valor

de discriminar se o vírus presente é oncogênico. O conhecimento da presença do vírus de risco poderá auxiliar na investigação, apontando a necessidade de acompanhamento mais cuidadoso e investigação mais profunda do tecido infectado bem como na escolha de tratamento adequado.

Não detectamos a presença de HSIL infectadas com HPV de baixo risco. Entretanto, HPV de alto risco estavam presentes em todos os casos de HSIL, mostrando uma correlação de 100% entre infecção por tipos de alto potencial oncogênico e risco de câncer. Tais resultados estão em total acordo com os resultados apresentados por Khana et al (2001), utilizando a mesma técnica.

Pesquisas também apontam que a quantidade de ADN do HPV 16, o mais frequentemente associado ao carcinoma cervical, é de grande utilidade no prognóstico da infecção, e concluem que o risco de câncer aumenta de maneira correspondente (Josefsson et al, 2000). Assim buscamos analisar quantitativamente os dados obtidos pelo teste de Captura do Híbrido que estão apresentados na tabela 8. Observamos que a carga viral obtida no diagnóstico do ensaio de HCA II aumentou conforme a severidade das lesões. Os trabalhos de Cox et al (1995) já mencionam a carga viral aumentada observada pela HCA II como fator preditivo da probabilidade no diagnóstico histopatológico / citopatológico de SIL, da mesma forma que Cuzick et al (1992) também observaram um risco maior para SIL de alto grau. Pacientes que apresentaram alta carga viral no ensaio de Captura Híbrida no Taiwan foram vistas como de maior risco para SIL e carcinoma (Sun et al, 2002). Uma tendência ascendente dos níveis de ADN do HPV foi correlacionada com o grau histopatológico das lesões ($p = 0,001$); sendo mais evidente para HSIL e menos para LSIL (Sun, 2002). Entretanto, Yamasaki et al (2001) observaram que resultados correlacionando carga viral obtida pela HCA II, e risco de SIL ainda não estão totalmente esclarecidos. Portanto, os aspectos quantitativos da Captura Híbrida ainda merecem avaliação posterior.

Atualmente, considera-se que 50% da população feminina poderá apresentar infecção por HPV em algum momento da vida (Hospital do Câncer, 2003). Estas infecções são em sua maioria transitórias e a cura, representada pela eliminação viral, parece ocorrer em até 90% dos casos, num período de 8 a 14 meses (G Y Ho et al, 1998; Franco et al, 1999). Um estudo feito por Schiffman (1995a) em adolescentes do

sexo feminino de uma escola americana relatou que cerca de 60% das participantes sofreram infecção transitória. Destas, cerca de 10% evoluíram para infecções persistentes, detectáveis somente por PCR e, destas, 10% desenvolveram algum tipo de neoplasia cervical. Conseqüentemente, estas infecções persistentes são exatamente as que necessitam de maior atenção, e as portadoras são consideradas como grupo de risco para o câncer, caso demonstrem a presença de tipos oncogênicos.

Lopes et al (1995) observam que contrariamente ao que ocorre em países desenvolvidos, apesar do câncer de colo de útero ser facilmente diagnosticado e apresentar índices elevados de cura, no Brasil as taxas de mortalidade e morbidade ainda são muito altas em decorrência desses diagnósticos geralmente ocorrer em estágios mais avançados da doença. Entretanto, devido ao alto custo dos testes para detectar o HPV, sua utilização como método de rotina na triagem de lesões cervicais não pode ser aplicada em países pobres ou em desenvolvimento, como o Brasil. Testes desse tipo poderiam ser propostos para utilização subsequente a Citopatologia, com a finalidade de diagnosticar infecções de alto risco associadas a lesões progressivas ou recidivantes, e desta forma auxiliar no processo de redução do risco de câncer e não para todas as pacientes. Assim, a aplicação seletiva do teste poderia melhorar o diagnóstico e colaborar com a prevenção da doença.

A utilização de técnicas moleculares para complementação do diagnóstico das infecções pelo HPV tem sido proposta por diversos autores (Reid & Lorincz, 1991; Ferenczy, 1995). Biggio et al (2002) destacam que a utilização desses testes virais é de grande importância para investigar pacientes que possuem alto risco de desenvolver lesões pré-malignas, pacientes que apresentam esfregaços com alterações de baixo grau associadas a infecção por HPV de alto risco e também, para auxiliar no controle de qualidade dos diagnósticos histopatológicos e citopatológicos. Observa-se que grande parte desses estudos visa a seleção de um método que melhor demonstre o ADN do HPV com sensibilidade e especificidade, mas também com rapidez, reprodutibilidade e baixo custo. Dentre elas, as técnicas de Captura do Híbrido e a Reação de Polimerase em Cadeia têm sido as mais promissoras.

A fim de avaliar estes aspectos relativos tanto a PCR como ao HCA II, em relação a Citopatologia, selecionamos de forma aleatória amostras de 40 participantes do

nosso estudo inicial. Dentre as 40 amostras selecionadas para esse estudo comparativo entre as técnicas citadas, observamos a existência de 72,5% (29/40) com diagnóstico característico de infecção pelo HPV, identificadas pelo Teste de Papanicolaou (tabela 9). Comparando esses resultados com os obtidos pela técnica de Captura do Híbrido, observamos que o ácido nucléico viral foi detectado em 75% (30/40) dessas pacientes (tabela 10). Resultados semelhantes também foram apontados por Cox et al (1995), Wright et al (1995) e Hatch et al (1995) com a HCA I. Em nosso trabalho as amostras foram analisadas pelo Ensaio de Captura Híbrida II, que diferentemente do primeiro possui maior sensibilidade devido a reformulação dos reagentes de hibridização e à adição de quatro sondas (Poljak, 1999). Quando testadas pela PCR, 70% (28/40) dessas amostras demonstraram a presença do ADN do HPV, sugerindo que o HCA II pudesse ter um caso falso-positivo, não confirmado pela PCR. Os trabalhos de Peyton et al (1998), Terry et al (2001) e Castle et al (2002) já haviam indicado esta possibilidade, enquanto Vernon et al (2000), descrevem sobre a possibilidade de existir algum tipo de hibridização cruzada na HCA II com tipos de HPV desconhecidos e/ou não incluídos no ensaio ou não amplificados pelos primers MY. Em artigo recentemente publicado, Castle et al (2003) sugerem que resultados falso-positivos apontados pela HCA II podem decorrer da degradação do material genético da amostra, o que poderia ter ocorrido com nossas amostras, sem ter afetado o gene da actina humana utilizada como controle na técnica de PCR. Entretanto isto nos parece pouco provável. De qualquer maneira, os estudos de Clavel et al (1998) também obtiveram resultados equivalentes aos nossos, apontando um percentual de 66,7% de especificidade para PCR e HCA. A possibilidade da PCR não ter detectado o caso também existe, podendo ser um falso negativo devido a problema na amplificação do MY, conforme já foi exposto por Muñoz et al em 2003.

Vale ressaltar que nas pacientes do grupo selecionado, todas que possuíam diagnóstico citopatológico NORMAL não demonstraram o ADN viral seja pela PCR seja pelo HCA II, apontando para a aparente inexistência de casos falso-positivos para ambas as técnicas, com relação a Citopatologia (tabela 12).

Na avaliação dos resultados de HCA para ASCUS, das 8 pacientes que apresentavam diagnóstico deste tipo, 25% (2/8) apresentavam ácido nucléico de HPV do tipo de alto risco. Brennan et al (2001) observam que na literatura descreve-se que até

50% dos esfregaços do tipo ASCUS apresentam ADN de HPV de alto risco e que uma média de 5 a 10% desses estão associados a lesões do tipo HSIL. De fato, Smith et al (2000) relatam que o Sistema Bethesda criado em 1988 foi desenvolvido com a finalidade de promover uma padronização no diagnóstico citopatológico, especialmente em esfregaços apresentando alterações pouco conclusivas, que se apresentam no limite da anormalidade, e que por isso receberam a terminologia de ASCUS (atipia de células escamosas de significância indeterminada). As pesquisas de Manos et al (1999) e Solomon et al (2001) propõem que essas pacientes com ASCUS sejam testadas quanto a presença do ADN viral, com a finalidade de observar aquelas que podem estar mascarando lesões do tipo HSIL. Entretanto, Schiffman et al (1992) e Melkert et al (1993) já relatam que testes de detecção do genoma viral deveriam ser indicados para utilização em pacientes acima dos 35 anos de idade apresentando lesões persistentes, já que estas representam justamente as infecções com HPV de maior potencial oncogênico são observadas. Deve ser ressaltado que infecções desse tipo em mulheres com menos de 30 anos em geral regridem espontaneamente e que a incidência de câncer cervical nessas pacientes é baixa (Wright et al, 1998). Dentre as duas participantes do nosso estudo que demonstraram positividade para o HPV pela técnica de Captura do Híbrido, uma delas possuía mais de 35 anos idade e poderia se incluir nesse grupo de maior risco. Ferenczy (1995) observa ainda que nestas situações um único teste positivo tem maior significância clínica do que na adolescência e início dos vinte anos, devido a forte sugestão de doença persistente ou infecção latente por HPV persistente. Langosch et al (2000) destacam que grande proporção das participantes de seu estudo que apresentam câncer cervical relatava repetição de diagnósticos do tipo ASCUS.

Devido aos achados no estudo epidemiológico geral bem como no processo de análise comparativa da HCA e PCR, acreditamos que pacientes com diagnóstico desse tipo devam ser de fato criteriosamente acompanhadas para repetição da Citopatologia em intervalos menores com a finalidade de evitar a possível progressão das lesões para casos malignos e quando possível seja também realizada a detecção do genoma viral.

Alguns autores sugerem ainda a correlação entre risco de progressão e nível de carga viral: G Y Ho et al (1995) sugerem que pacientes apresentando carga viral aumentada possuem maior probabilidade de apresentar infecções persistentes do que

pacientes que possuem carga viral mais baixa, em nossa análise inicial a carga viral foi estatisticamente correlacionada com a severidade da lesão estudada (Carvalho et al, 2003). Entretanto, os dois casos observados em nosso segundo trabalho apresentam HPV de alto risco com baixa carga viral mesmo assim procuraremos acompanhar tais pacientes a fim de correlacionar os eventos biológicos da infecção com a carga viral presente no tecido infectado e a possível progressão das lesões (Carvalho et al, em preparação).

Nestes mesmos casos de ASCUS, o ADN do papilomavírus foi detectado em 37,5% (3/8) das pacientes, quando avaliados pela PCR (tabela 11). Resultados desse tipo já foram observados por Brennan et al em 2001 que propõe que amostras negativas para a Captura Híbrida sejam posteriormente testadas por PCR, visto ser esta uma técnica de maior sensibilidade. Da mesma forma, Farthing et al (1994) destacam para a possibilidade destes resultados ocorrer devido à inadequação da amostra para teste de HCA e apontam para a necessidade de um controle interno no Ensaio de Captura do Híbrido indicando que as amostras conteriam ADN suficiente para o teste, e indica ser esta uma desvantagem do HCA ser utilizado na prática clínica.

Já para as pacientes que obtiveram diagnóstico citopatológico apontando anormalidades características de infecção por papilomavírus, os três testes tiveram concordância excelente. A HCA II e a PCR detectaram o ADN viral em 87.5% (7/8) das pacientes, aparentemente demonstrando haver concordância absoluta entre os dois testes de Biologia Molecular (tabela 12). Entretanto, nós observamos que da mesma forma que uma amostra positiva para HCA II foi negativa para a PCR, o caso inverso também ocorreu (tabela 12). Pacientes que apresentam diagnósticos desse tipo necessitam de acompanhamento cauteloso devido a inconsistência dos resultados. De qualquer forma, as duas amostras foram diagnosticadas pela Citopatologia, e os resultados controversos foram vistos entre as duas técnicas de Biologia Molecular. As amostras em que a HCA aponta negatividade e a Citopatologia em associação com a PCR demonstram positividade podem ser justificados no estudo de Clavel et al em 1998, onde a PCR é mencionada como um método de maior sensibilidade. Enquanto, os casos positivos para a HCA, mas que se apresentaram negativos na PCR podem ser vistos conforme descrevemos anteriormente, pela degradação do material genético, falsa

positividade da HCA ou pela baixa sensibilidade dos primers MY utilizados em nossos experimentos. Resultados como estes podem também ser vistos nos estudos de Muñoz (2000) demonstrando que a sensibilidade dos primers MY 09 / MY 11, também utilizados em nosso laboratório, já vem sendo discutida e admitem a necessidade do uso de pelo menos dois grupos de primers para o diagnóstico do HPV, a fim de obter maior maior acurácia na técnica.

Lesões do tipo de baixo grau (LSIL), são caracterizadas por proliferação de células epiteliais da camada basal e conseqüente expansão de clones, conduzindo a alterações na morfologia, no processo de diferenciação e à atipia suave. Em lesões desse tipo, a expressão das proteínas oncogênicas virais é pequena ou mesmo não detectável (Turek, 1994). G Y Ho et al (1998) observam que infecções por HPV são consideradas episódios de curta duração, e que até 90% dos casos de LSIL regredem espontaneamente, sem a necessidade de tratamento, mas alguns autores já vêm descrevendo índices superiores de progressão (Cavalcanti et al, 2000; Hospital do Câncer, 2003). A nossa pesquisa aponta a existência de 20 pacientes que possuem diagnóstico de LSIL pela Técnica de Papanicolaou. A HCA II detectou o ADN viral em 100% dessas pacientes sendo que em 95% (19/20) dos casos foram demonstrados HPV de alto potencial oncogênico (tabela 10). Dados como este justificam a utilização de metodologias como a HCA II como método complementar ao método de Citopatologia. Langosch et al (2000), observa que uma média de 60% das pacientes que apresentam algum grau de displasia alberga o vírus de alto risco, sendo raros os casos de infecção puramente com tipos de baixo risco. Em nosso trabalho apenas 5% (1/20) dessas amostras apresentaram infecção com tipo de baixo risco. Cerca de 60% destes casos eram de infecções múltiplas com vírus de alto e baixo risco. Para estas amostras, a PCR apresentou positividade em somente 85% (17/20) dos casos. Conforme foi mencionado anteriormente pode ter ocorrido problema em nossa amostra como degradação do genoma viral ou falha do MY. É interessante observar que tais amostras não só apresentavam uma carga viral mais elevada pelo HCA II, mas também demonstravam infecções múltiplas, com tipos de alto e baixo risco, diminuindo a chance de representarem falso positivos no HCA.

As lesões de alto grau (HSIL) incluem as neoplasias intraepiteliais cervicais de graus II e III/carcinomas in situ. Segundo Schiffman et al (1995a), por serem ocasionadas em mais de 90% dos casos por HPV de alto risco oncogênico, essas lesões devem ser tratadas, porque apesar do processo ser lento, um percentual que pode alcançar 30% eventualmente progredirá para o câncer invasivo. Infecções deste tipo, já apresentam um grau moderado a severo de displasia e, diferentemente do que ocorre com as lesões de baixo grau, as proteínas oncogênicas virais são superexpressas em consequência do processo de integração do genoma viral ao cromossomo hospedeiro, o que torna a infecção irreversível. Em nosso experimento, uma única amostra apresentou diagnóstico de HSIL na Citopatologia. Essa paciente teve o diagnóstico confirmado tanto pela PCR como pela HCA II. Os trabalhos de Walbomers et al (1999) já comprovam de forma eficiente que o HPV é causa necessária para o câncer cervical. Muñoz (2000) também demonstra que o HPV pode ser apontado como o agente etiológico do Ca cervical. Portanto de acordo com os nossos resultados em comparação com o apresentado por estes pesquisadores, a existência das lesões intraepiteliais de alto grau, HSIL, ocorre em função da infecção por tipos de HPV, reconhecidos como de alto potencial para a evolução da carcinogênese cervical. A necessidade de confirmação dessas lesões por métodos de Biologia Molecular torna-se dispensável porque não interfere na conduta clínica, já que lesões desse tipo devem ser tratadas e a paciente acompanhada para observação de recidivas. As pesquisas, nestes casos, são feitas com finalidade epidemiológica, pois foi assim que se chegou ao conhecimento atual da atuação do HPV na oncogênese de infecções genitais. Muñoz (2000) aponta que informações acerca da prevalência de tipos são de grande utilidade no planejamento de vacinas devendo-se considerar a região estudada. O papel principal da HCA ou PCR é para ASCUS e principalmente LSIL. Entretanto, um fato interessante a ser observado em nosso estudo foi a idade de 24 anos da paciente apresentando lesão de alto grau. Clavel et al em 2001 também apontaram que uma média de 45% de suas pacientes apresentando diagnóstico do tipo HSIL possuíam idade inferior a 30 anos. A constatação de resultados como este, indica a utilização de testes de detecção do ADN viral em todas as pacientes que apresentam lesões de baixo grau, sem a necessidade de que essas

estejam na faixa etária acima dos 30 anos, conforme vem sendo sugerido na literatura (Clavel et al, 1999).

Em nosso trabalho observamos também os parâmetros de sensibilidade e especificidade para os dois testes (tabela 13). Índices de 96,5% e 86,2% foram apontados como parâmetros de sensibilidade para a Captura Híbrida e para a PCR, respectivamente. Os estudos de Clavel et al (1998) também demonstraram índices semelhantes aos apontados por nós quando compararam os dois testes com a Captura Híbrida de 1ª geração, com resultados de 92,8% para a sensibilidade da Captura do Híbrido, entretanto nesse mesmo estudo a Reação de Polimerase em Cadeia demonstrou 96,4% um parâmetro de sensibilidade maior do que o apontado em nosso estudo. Esse resultado discordante em relação à técnica de PCR pode ser visto pelo primer utilizado, em nosso laboratório foi o MY09/MY11 enquanto no estudo de Clavel et al (1998) foi o GP5+/GP6+. A sensibilidade aumentada desses primers já foi observada por outros autores, como Muñoz (2000) e Brennan et al (2001). Quanto ao percentual de especificidade, ambos os testes apontaram para 100%. O que pode ser visto como um excelente resultado para os testes utilizados, demonstrando que estas novas metodologias são de grande utilidade na elaboração de diagnósticos cervicais mais precisos, permitindo a identificação não só da presença do HPV como também do seu potencial oncogênico.

Em relação à carga viral, observamos os valores alcançados aumentam conforme a severidade dos casos (tabela 14). Nos estudos de Clavel et al (2001) as conclusões oferecidas quanto a carga viral detectada pela HCA II e a gravidade das lesões não foram significantes. A única discrepância por nós encontrada foi com respeito a amostra com diagnóstico citopatológico de lesão de alto grau, mas nossos resultados apresentaram significância estatística nas duas etapas do nosso estudo (Carvalho et al, 2003 e Carvalho et al, em preparação). Entretanto essa diferença pode ser explicada de acordo com os resultados obtidos em outro estudo de Clavel et al (2001), onde a variabilidade da carga viral representada nas lesões de alto grau pode ser motivada pela baixa quantidade de HPV oncogênico detectável quando o ADN viral está integrado no genoma hospedeiro, enquanto em outras circunstâncias pode estar presente e

abundante em sua forma episomal. Estudos posteriores serão necessários a fim de confirmar o potencial de análise quantitativa da HCA, embora este pareça promissor.

CONCLUSÕES

- Existe uma alta prevalência de infecções por HPV na população estudada de acordo com a HCA II.

- Os tipos de HPV pertencentes ao grupo de alto potencial oncogênico são os mais frequentemente encontrados em nossa população.

- A técnica de Captura do Híbrido demonstrou que pode ser eficientemente utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico das infecções por HPV, sendo de alta sensibilidade e especificidade quando comparada à PCR.

- Avaliar o potencial de utilização das medidas de RLU obtidas pela Captura Híbrida como medida de carga viral, relacionada ao grau das lesões estudadas.

BIBLIOGRAFIA

Baird, P J. Serological evidence for the association of papillomavirus and cervical neoplasia. *Lancet ii*. 17-18 (1983).

Bauer, H M, Hildesheim, A, Schiffman, M H, Glass, A G, Rush, B B, Scott, D R, Cadell, D M, Kurgan, R J, Manos, M M. – Determinants of genital human papillomavirus infection in low risk women in Portland, Oregon. *Sex Trans Dis*. 20: 274-278 (1993).

Becker, T M, Stone, K M & Alexander, E R. – Genital human papillomavirus infection. A growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 14: 389, 1987. Apud Passos, M R L. *Doenças Sexualmente Transmissíveis*. In: Papilomavírose genital (condiloma acuminado). 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, cap. 20. p. 220-262 (1995).

Biggio, C T, Barboza, F A, Cavalcanti, S M B. - Detecção e tipagem viral para papilomavírus humanos: progressos recentes e perspectivas clínicas. *DST – J Bras Sex Transm*. 14 (4): 32-5 (2002).

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

Brennan, M M, Lambkin, H A, Sheehan, C D, Ryan, D D, O'Connor, T C and Kealy, W F. - Detection of high-risk subtypes of human papillomavirus in cervical swabs: routine use of Digene Hybrid Capture assay and polymerase chain reaction analysis. *Br J Biom*. 58: 24-29 (2001).

Broker, J R. - Structure and genetic expression papillomaviruses. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 14: 329 (1987).

Burger, M P M, Holema, H, Pieters, W J L, Schröder, F P, Quint, W G V. – Epidemiological evidence of cervical intraepithelial neoplasia without the presence of human papillomavirus. *Br J Cancer.* 73: 831-836 (1996).

Butel, J S.

Disponível em: <<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch066.htm>>

Acesso em 29/05/2002.

Callaghan, J, Karim S, Mortlock S, Winter, M, Woodward, N. – Hybrid Capture as a means of detecting human papillomavirus DNA from liquid – based cytology specimens: a preliminary evaluation. *Brit J Biomed Sci.* 58: 184-189 (2001).

Campion, M J – Clinical manifestations and natural history of genital human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 14:363 (1987). Apud Passos, M R L et al. *Doenças Sexualmente Transmissíveis*. In: Papilomavírose genital (condiloma acuminado). 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica. cap. 20. p.220-262 (1995).

Carestiato, F N, Carvalho, M O O, Ribeiro, M O, Marinho, M, Barbosa, F M, Silva, L E, Dimetz, T, Oliveira, L H S, Cavalcanti, S M B. - Estudo das infecções por papilomavirus humanos em pacientes do sexo feminino detectados pela técnica de Captura do Híbrido: levantamento de casos. *DST – J Bras doenças Sex Transm.* 14(6): 9-12 (2002).

Carvalho, M O O, Almeida, R W, Leite, F M S, Fellows, I B, Teixeira, M H, Oliveira, L H S, Cavalcanti, S M B. – Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture assay. *BJID.* 7(2); 121-123 (2003).

Carvalho, M O, Carestiato, F, Ribeiro, M, Dimetz, T, Barbosa, F, Oliveira, L H S, Cavalcanti, S M B. – Comparative analysis of polimerase chain reaction and hybrid capture for the detection of human papillomavirus infection. *DST – J Bras doenças Sex Transm.* Em preparação.

Castle P E, Lorinczy A T, Lohnas I M, Scott, D R, Glass, A G, Sherman, M E, Schussler, J E Schiffman, M. – Results of human papillomavirus DNA testing with the Hybrid Capture II assay are reproducible. *J Clin Microbiol.* 40: 1088-1090 (2002).

Castle, P E, Lorincz, A T, Scott, D R, Scherman, M E, Glass, A G, Rush, B B, Walcholder, S, Burk, R D, Manos, M M, Schussler, J E, Macomber, P Schiffman, M. - Comparison between prototype Hybrid Capture 3 and Hybrid Capture 2 human papillomavirus DNA assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *J Clin Microbiol.* 41(9): 4022-4023 (2003).

Cavalcanti, S M B, Zardo, L G, Passos, M R L, Oliveira, L H S. - Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect.* 40(1): 80-97 (2000).

Chan, S, Delius, H, A L, Bernard, H. – Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 69(5): 3074-3083 (1995).

Chuang, T, Perry, H O, Kurland, L T & Ilustrup, D M. - Condyloma acuminatum in Rochester, Minn, 1950-1978. - Epidemiology and clinical features. *Arch Dermatol.* 120: 469 (1984). Apud Passos, M R L. *Doenças Sexualmente Transmissíveis.* In: Papilomavirose genital (condiloma acuminado). 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, cap.20. p.220-262 (1995).

Clavel, C, Masure, M, Putaud, I, Thomas, K, Bory, J-P, Gabriel, R, Quereux, C, Birembaut, P. - Hybrid Capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection.

Comparison with Hybrid Capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol.* 51: 737-740 (1998).

Clavel, C, Masure, M, Bory, J-P, Putaud, I, Mangeonjean, C, Lorenzato, M, Gabriel, R, Quereux, C, Birembaut, P. - Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Bris J Canc.* 80 (9) 1306-1311 (1999).

Clavel, C, Masure, M, Bory, J-P, Putaud, I, Mangeonjean, C, Lorenzato, M, Nazeyrollas, P, Gabriel, R, Quereux, C, Birembaut, P. – Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer.* 84(12): 1616-1623 (2001).

Coggin, J R & zur Hausen, H - Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res.* 39: 545 – 546 (1979).

Cox, J T, Lorinczy A T, Schiffman, M H - Human Papillomavirus testing Hybrid Capture appears to be useful in triaging women with a cytological diagnosis of ASCUS. *Am J Obstet Gynecol.* 172: 946-954 (1995).

Cullen, A P, Reid, R , Campion, M , Lorincz, A T. – Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNA in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 65(2): 606-612 (1991).

Cuzick J, Ferry G, Ho L et al. - Human Papillomavirus type 16 DNA in cervical smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet.* 339: 959-960 (1992).

Desaintes, C, Demeret C. - Expression of the papillomavirus E2 protein in He la cells leads to apoptosis. *EMBO J.* 16: 504 - 514 (1997).

De Villiers, E M. – Human pathogenic papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186: 1-12 (1994).

Dillner, J, Kallings, I, Brihmer, C, Sikstron, B, Koskela, P, Lehtiner, M, Schiler, J T, Sapp, M, Mardh, P A. - Seropositivity to human papillomavirus types 16, 18 or 33 capsids and to Chlamydia Tracomatis are markers of sexual behavior. *J Infect Dis* 173: 1394-1398 (1996).

Dillner, J. – Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human papillomavirus infection. *J Clin Virol.* 19: 7-23 (2000).

Doorbar, J, Campbell, D, Grand, R J A, Gallimore. - Identification of the human papillomavirus-16 and E4 gene products. *EMBO J.* 5:355-362 (1986).

Evander, M, Frazer, I H, Payne, E. - Identification of α -6 integrins as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 71: 2449-2456 (1997).

Evanger, M, Edlund, K, Gustaafsson, A, Karrisson, J R, Rylande, E & Waadel. - Human papillomavirus is transient in young women a population-based cohort study. *J Infect Dis.* 171: 1026-30 (1995).

Fairley, C K, Chen, S, Ugoni, A, Tabrizi, S N, Forbis, A, Garland, S M. - Human papillomavirus and its relationship to recent and distant sexual partners. *Obstet Gynecol.* 84: 755-59 (1994).

Farthing, A, Masterson, P, Mason, W P, Vousden K H. - Human papillomavirus detection by Hybrid Capture I and its possible clinical use. *J Clin Pathol.* 47: 649-652 (1994).

Ferenczy et al. Human papillomavirus DNA in CO₂ laser-generated plume of smoke and its consequences to the surgeon. *Obstet Gynecol.* 75: 114-118 (1990).

Ferenczy A. – Viral Testing for genital human papillomavirus infection: recent progress and clinical potentials. *Int J Gynecol Cancer*. 5: 321-328 (1995).

Ferenczy, A, Franco, E. - Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol*. 3(1): 11-16 (2002).

Fields, B N, Ipe, D M, Howley, P M, Griffin, D E, Lamb, R A, Martin, M A, Roizman, B, Straus, S E. - *Fieds Virology*. Section two. Chapter 65: Papillomaviruses and teir replication. 4th. Lippincott Williams & Wilkins. CD-rom (2001).

Franco, E L, Villa, L L, Sobrinho, J P. – Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 180: 1415-1423 (1999).

Greene, I. – Therapy for genital warts. *Dermatol Clin*. 10:53-267 (1992).

Halmo, P, Naess, O. – Laryngeal papillomatosis with with human papillomavirus DNA contracted by laser surgeon. *European Archives Otorrinolarygology*. 248: 425-427 (1991).

Hatch, K D, Schneider, A, Abdel-Nour, M W. – Na evaluation of human papillomavirus testing for immediate and high risk types as triage befote colposcopy. *Am J Obstet Gynecol*. 172: 1150-1157 (1995).

Ho, G Y F, Burk, R D , Klein, S, Kadish, A S, Chang C J, Palan, P, Basu, J, Tachzy R, Lewis, R and Romney, S. – Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persitent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 187: 1365-1371 (1995).

Ho, G Y, Bierman, R, Beardsley, L, Chang, C J, Burk, R D. - Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 338: 423-428 (1998).

Hospital do cancer. Papilomavirus Humano e Câncer de Colo do Útero.

Disponível em: <<http://www.hcanc.org.br/hpvi.html>>

Acesso em: 27 de fevereiro de 2003.

Inman, G J, Cook, I D & Lau, R K W. - Human papillomaviruses, tumour suppressor genes and cervical cancer. *Int J STD and AIDS*. 4: 128 - 134 (1993).

Josefsson, A M, Magnusson, P K, Ylitalo, N, Sorensen, P, Qwarforth-Tubbin, P, Andersen, P K, Melbye, M, Adami, H-O, Gyllensten, U B. - Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 355: 2189-2193 (2000).

Khanna, N, Brooks, S E, Chen, T T, et al. Human papillomavirus absence predicts normal cervical histopathologic findings with abnormal papanicolaou smears. *J Hum Virol*. 4:283 (2001).

Kirnbauer, R, Taub, J, Greenstone, H, Roden, R, Durst, M, Gissman, L, Lowy, D R, Schiller, J T. - Serologic response in human papillomavirus associated invasive cancer. *J Virol*. 67: 6929-6936 (1993).

Kirnbauer, R, Hubbert, N L, Wheeler, C M, Becker, T M, Lowy, D R, Schiller, J T. - A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Nat Can Inst*. 86(7): 494-499, (1994).

Krauss, S J, Stone, K M.- Management of genital infection caused by human papillomavirus. *Ver Infect Dis* (supplement 6), 12: 620-632 (1990).

Linhares, R L. - Diagnóstico da infecção cervical pelo HPV. Avaliação colposcópica, citológica e histopatológica. *J Bras Doenças Sex Transm*. 6(3). 7: 22 (1994).

Lopes, E R, Rebelo, M S, Abreu, E, Silva, V L C, Eisenberg, A L A, Lavor, M F. - Comportamento da população brasileira feminina em relação ao câncer cérvico-uterino. *J Bras Ginecol.* 105 (11/12); 505-515 (1995).

Manos, M M, Kinney, W K, Hurley, L B. et al - Identifying women with cervical neoplasia using human papillomavirus testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA.* 281: 1605-1610 (1999).

Meisels, A, Fortin, R, Roy, M. – Condylomatous lesions of the cervix II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol.* 21 (3): 379-390 (1977). Apud Passos, M R L et al. *Doenças Sexualmente Transmissíveis*. In: Papilomavirose genital (condiloma acuminado). 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica. cap.20. p.220-262. (1995).

Melkert, P J W, Hopman, E, Van den Brule, A J C, Risse, E K J, Diest, P J van, Bleker O P et al – Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer.* 53: 919-923 (1993).

Milde-Langosch, K, Riethdorf, S, Loning T. - Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch.* 473: 227-233 (2000).

Moore, R A, Edwards, J E, Hopwood, J, Hicks, D. - Imiquimod for the treatment of genital warts: a quantitative systematic review. *BMC Infectious Diseases.* 1:3 (2001).

Morrisson H. - Human papillomavirus absence predicts normal cervical histopathologic findings with abnormal papanicolaou smears. *J Hum Virol.* 4: 283-287 (1993).

Mougin C, Dalstein V, Pretet J L, Gay, C, Schaal, J P, Riethmuller, D. - Epidemiologie des infections cervicales à papillomavirus. *La presse Med.* 30: 1017-23 (2001).

Muller, M, Gissman, L, Shah, K V. – Antibodies to human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins as markers for HPV 16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 187: 508-514 (1992).

Muñoz, N. - Human Papillomavirus infection and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 19: 1-5. (2000).

Muñoz N, Bosch, X, Sanjose, S, Herrero, R, Castellsague, X, Shahk, V, Snijders, P J F, Mujer, C J L M. - Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The new England journal of medicine*. 348(6): 518-527 (2003).

Nature Reviews.

Disponível em: <<http://www.nature.com/nrw/journal/v2/n5/images/nrc798-f2.jpg>>

Acesso em 22 de julho de 2003

Nobbenhuis M A, Walboomers J M, Helmerhorst, T J et al. - Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening a prospective study. *Lancet*. 354: 20-5 (1999).

Oliveira, L H S, Rodrigues, E V M, Pantaleão, J A, Lopes, A P T A S, Cavalcanti, S M B. – Human papillomavirus and co-factors to cervical cancer among women attended at University Hospital of Universidade Federal Fluminense. *DST – J Bras Sex Transm* 14(4): 23-27 (2002).

Oriel, J D & Almeida, J D - Demonstration of vírus particles in human genital warts. *Br J Vener. Dis.* 46:37 (1970). Apud Passos, M R L et al. *Doenças Sexualmente Transmissíveis*. In: Papilomavirose genital (condiloma acuminado). 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, cap. 20 p.220-262 (1995).

Passos, M R L et al. *Doenças Sexualmente Transmissíveis*. In: Papilomavirose genital (condiloma acuminado). 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, cap. 20. p.220-262. (1995).

Peyton, C L, Schiffman, M, Lorincz, A T, Hunt, W C, Mielzynska, I, Bratti, C, Eaton, S, Hildesheim, A, Moreira, L A, Rodriguez, A C, Herrero, R, Sherman, M E and Wheeler, C M. – Comparison of PCR and Hybrid Capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol.* 36(11): 3248-3254 (1998).

Phelps, W C & Alexander, K A. - Antiviral therapy for Human papillomaviruses: relationale and prospects. *Annals of Internal Medicine.* 123: 368-382 (1995).

Poljak, M, Brencic, A, Seme, K, Vince, A, Marin, I J. – Comparative evaluation of first – and second generation Digene Hybrid Capture Assays for detection of Human papillomavirus associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 37(3): 796-797 (1999).

Powell, L C, Pollard M, Jinkins, J L S R. - Treatment of condyloma acuminata by autogenous vaccine. *South. Med. J.* 63: 202 (1970).

Registro Nacional de Patologias Tumorais – Instituto Nacional do Câncer – INCa 1995-2000. *Ed INCa*, Brazil.

Reid, R, Lorincz, A T. - Should family physicians test for human papillomavirus infection? An affirmative view. *J Fam Pract.* 32: 183-8 (1991).

Richart, R M. - A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet & Gynecol.* 75(1): 131-133 (1990).

Richwald, G A, Reitano, M. – New approaches to the management of external genital warts. *Infect Dis Clin Pract.* 8: 67-75 (1999).

Roberts, S, Ashmole, I, Rookes, S M - Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1 E4 proteins shows that the c-terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but it is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* . 71: 3554-3562 (1997).

Rowson, K E K & Mahy, B W J - Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev.* 31:110 (1967). Apud Passos, M R L et al. *Doenças Sexualmente Transmissíveis*. In: Papilomavirose genital (condiloma acuminado) 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica. cap.20. p.220-262. (1995).

Rozendaal, L, Walboomers, J M M, Van Der Linden, J C, Voorhorst, F J, Kenemans, P, Helmerhorst, T J M, Van Ballgooijen, M, Meijer C J L M. – PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assesment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer.* 68:766-768 (1996).

Rozendaal, L, Westerga, J, van der Linden, J C et al. - PCR based high risk HPV testing is superior to neural network based screening for predicting incident CIN III in women with normal cytology and borderline changes. *J Clin Pathol.* 53: 606-11 (2000).

Sasagawa, T, Don, Y, Saijyou, K et al Human papillomavirus infection and risk determinants for squamous intraepithelial lesion and cervical cancer in Japan. *Jap J Canc Res.* 88:376-384 (1996).

Schiffman, M H. - Recent progress in defining the epidemiology of human papilomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 84: 394-398 (1992).

Schiffman, M H, Brinton, L A. - The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer.* 76: 1888-1901. (1995a).

Schiffman, M H, Kiviat, N B, Burk, R D, Keerti, D R, Daniel, R W, Lewis, R, Kuupers, J, Manos, M, Scott, D R, Sherman, M E, Kurman, R J, Stoler, M H Glass, A G, Brush, B B, Mielzynska, I, Lorincz, A. – Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by Hybrid Capture. *J Clin Microbiol.* 33: 545-550 (1995b).

Segi, M. - Graphic presentation of cancer incidence by site and by área and population. Segi Institute for Cancer epidemiology. Nagoya (1977).

Shope, R E - Infections papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *J Exp Med.* 58: 607-624 (1933).

Smith, A E, Sherman, M E, Scott, D R, Tabbara, S O, Dworkin, L, Olson, J, Thompson, J, Faser, C, Snell, J, Schiffman, M. - Review of the Bethesda System Atlas does not improve reproducibility or accuracy in the classification of atypical squamous cells of undetermined significance smears. *Cancer Cytopathol.* 90 (4): 201-206 (2000).

Solomon, D, Hutter, R V P, Henson, D E. - The 1988 Bethesda System for reporting Cervica/ Vaginal Cytologic Diagnoses. *Acta Cytologica.* 33(5):567-574 (1989).

Solomon, D, Schiffman, M, Tarone, R - Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 93: 293-299 (2001).

Stewart, A M, Eriksson, A M, Manos, M M, Muñoz, N, Bosch, F X, Peto, J, Wheler, C M Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *Journal of Virology.* 70(5): 3127-36 (1996).

Stone, K M et al. – Treatment of external genital warts: a randomized clinical trial comparing podophylin, cryotherapy, and eletrodessication. *Genitourinary Medicine.* 66: 16-19 (1990).

Suchanková, A, Ritterová, L, Krcmar, M, Krcmar, V, Vagner, J et al – Comparison of ELISA and Western blotting for human papillomavirus type 16 E7 antibody determination. *J Gen Virol.* 72: 2577-2581 (1991).

Sun, C A, Liu, J F, Wu, D M, et al. – Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet* 76: 41-47 (2002).

Syrjänen, K J – Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their associations with genital squamous cell cancer. *APMIS.* 97: 957-970 (1989).

Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick, J, Mielzynska- Lohnas, I, Lorincz, A. – Detection of high-risk HPV types by the hybrid Capture 2 test. *J Med Virol.* 65: 155-162 (2001).

Turek, L P – The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res.* 44:305-356 (1994).

Tyring, S K. - Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol.* 43: S18-26. (2000).

University of cape town.

Disponível em <<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>>

Acesso em: 26 de Janeiro de 2004.

Vernon, S, Unger, E R, Williams, D. – Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting and Hybrid Capture. *J Clin Microbiol.* 38(2) 651-655 (2000).

Villa, L L, Franco E L,– Epidemiology correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J Nat Canc Inst* 8(5): 332-340 (1989).

Walboomers, J M M, Husman, A-M R, Snijders, P J F, Stel, H V, Risse, E K J, Helmerhorst, T J M, Voorhorst, F J, Meifer, C J L M. - Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. *J Clin Pathol.* 48:728-732 (1995).

Walboomers, J M M, Meijer, C J L M. - Do HPV negative carcinomas exist? *J Pathol.* 181: 253-254 (1997).

Walboomers, J M M, Jacobs, M V, Manos, M, Bosch, F X, Kummer, A, Shah, K V, Snijders, P J F, Peto, J, Meijer, C J L M, Muñoz, N. - Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189: 12-19 (1999).

Wheeler, C M, Parmenter, C A, Hunt, W C, Becker, T M, Greer, C E, Hildesheim, A, Manos, M M. – Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New México student health center. *Sex Trans Dis.* 20: 286-290 (1993).

Wikinström, Arne. - Clinical and Serological Manifestations of genital human papillomavirus infection. *Acta Dermato - Venereologica.* Supplementum 193, p. 1-85 (1995).

Wisniewski, P M et al – Studies on the transmission of viral disease via the CO₂ laser plume and ejecta. *J Reprod Méd.* 35: 1117-1132 (1990).

Wright, T C, Sun, X W, Koulos, J. – Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol.* 85: 202-210 (1995).

Wright, T C, Lorincz, A T, Ferris, D G et al – Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Papanicolaou smears. *Am J Obstet Gynecol.* 178: 962-966 (1998).

Yamasaki, H, Sasagawa, T, Basha, W, Segawa, T, Inoue, M. – Hybrid Capture II and LCR-E7 for HPV typing in cervical cytologic samples. *Int J Cancer*. 94: 222-227 (2001).

Zehbe I, Wilander, E. - Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol*. 181:270-5 (1997).

zur Hausen & De Viliers. - Human Papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol*. 48:427-47 (1994).

zur Hausen, H et al – Papillomavirus causing cancer: evasion from host cell control in early events in carcinogenesis. *Journal Nat Canc Inst*. 92(9): 690-698 (2000).

ANEXOS

Resumos publicados em congressos:

1. Carvalho, M O O, Almeida, R W, Leite, F M S, Fellows, I B, Teixeira, MH, Oliveira, L H S , Xavier, M P T P , Cavalcanti, S M B . - Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. *Reviews & Research. Journal of the brasilian society for virology.* 7(1) PP 2 (2002).
2. Carvalho, M O O, Carestiato, F, Ribeiro, M, Dimetz, T, Barbosa, F, Oliveira, L H S, Cavalcanti. – Comparative analysis of polimerase chain reaction and hybrid capture for human papillomavirus infection. *Vírus: Reviews & Research. Journal of the brasilian society for virology.* 8(1) PA 21 (2003).

Artigos publicados em revistas:

1. Carestiato, F N, Carvalho, M O O, Ribeiro, M O , Marinho, M, Barbosa, F M, Silva, L E, Dimetz, T, Oliveira, L H S, Cavalcanti, S M B. – Estudo de infecções por papilomavirus em pacientes do sexo feminino, detectados pela técnica de captura do híbrido: Levantamento de casos. *DST - J bras doenças sex transm.* 14(6): 9 - 12 (2002).
2. Cavalcanti, S M B, Ramos, L M, Passos, J V M, Carvalho, M O, Zardo, L G, Oliveira, L H S. – Protein p53 alterations associated to human papillomavirus infection and cervical cancer. *Vírus: Reviews & Research.* 1(7): 41-50 (2002).
3. **Carvalho, M O O, Almeida, R W, Leite, F M, Fellows, I B, Teixeira, M H, Oliveira, L H S, Cavalcanti, S M B. – Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. *BJID* 7(2): 121-125 (2003).**
4. **Carvalho, M O O, Carestiato, F, Ribeiro, M, Dimetz, T, Barbosa, F, Oliveira, L H S, Cavalcanti, S M B. – Comparative analysis of polimerase chain reaction and hybrid capture for the detection of human papillomavirus infection.**