



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

Ludmila Márcia Sousa do Nascimento

**DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO
PELO HPV EM MULHERES DO MUNICÍPIO DE BARCARENA,
PARÁ, NORTE DO BRASIL**

BELÉM-PA

2010

Ludmila Márcia Sousa do Nascimento

**DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO
PELO HPV EM MULHERES DO MUNICÍPIO DE BARCARENA,
PARÁ, NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, *área de concentração Biologia Celular*, da Universidade Federal do Pará, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre .

Orientador: **Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.**

Co-Orientador: **Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior.**

BELÉM-PA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UFPA, Belém-PA

Nascimento, Ludmila Márcia Sousa do, 1984-

Diagnóstico citológico e molecular da infecção pelo HPV em mulheres do município de Barcarena, Pará, Norte do Brasil / Ludmila Márcia Sousa do Nascimento. — 2012

Orientador: Claudio Guedes Salgado

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Patologia celular. 2. Papilomavírus – Citodiagnóstico. 3. Papilomavírus – Epidemiologia. I. Título.

CDD - 23. ed. 611.01815

**DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO
HPV EM MULHERES DO MUNICÍPIO DE BARCARENA, PARÁ, NORTE
DO BRASIL**

Ludmila Márcia Sousa do Nascimento

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR, *ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR*, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, COMO PRÉ-REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE .

Aprovada por:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.
Orientador

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior.
Co-Orientador

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Prof. Dr. Andre Salim Khayat

BELÉM-PA

2010

“Entrementes, a consistência e o odor do carvalho começavam a falar, já perceptivelmente, da lentidão e da constância com que a árvore cresce. O carvalho mesmo assegurava que só semelhante crescer pode fundar o que dura e frutifica; que crescer significa: abrir-se à amplidão dos céus, mas também deitar raízes na obscuridade da terra; que tudo o que é verdadeiro e autêntico somente chega à maturidade se o homem for simultaneamente ambas as coisas: disponível ao apelo do mais alto céu e abrigado pela proteção da terra que oculta e produz.”

Martin Heidegger – O Caminho do Campo, 1949.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
PALAVRAS-CHAVE	viii
ABSTRACT	ix
KEYWORDS	x
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. HISTÓRICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	04
2.2. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV.....	04
2.3. TRANSFORMAÇÃO CELULAR.....	08
2.4. CICLO VIRAL DO HPV.....	09
2.5. INTEGRAÇÃO E CARCINOGENESE.....	10
2.6. PATOGÊNESE.....	11
2.7. QUADRO CLÍNICO.....	13
2.8. EPIIDEMIOLOGIA.....	15
2.9. DIAGNÓSTICO.....	17
2.9.1. ACHADOS CITOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO.....	18
3. OBJETIVOS	21
- GERAL.....	21
- ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. AMOSTRA POPULACIONAL.....	22
4.2. COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA CITOLOGIA CONVENCIONAL, CITOLOGIA LÍQUIDA E PCR.....	22
4.3. COLORAÇÃO E EMISSÃO DE LAUDO.....	23
4.4. EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL E IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS 16 E 18.....	24

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A CITOLOGIA CONVENCIONAL (EXAME DE PAPANICOLAU) E A CITOLOGIA DE BASE LÍQUIDA.....	26
6.2. RESULTADOS CITOLÓGICOS.....	27
6.3. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E MOLECULAR	29
7. DISCUSSÃO	31
8. CONCLUSÕES.....	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

O HPV (Papilomavírus humano) foi apontado pela OMS (Organização Mundial de Saúde - WHO) como principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, tornando-se assim um importante e gravíssimo problema de saúde pública, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. A precocidade das atividades sexuais, múltiplos parceiros e sexo casual, o tabagismo, a imunossupressão (por exemplo, na população de pacientes aids), gravidez, doenças sexualmente transmissíveis prévias como herpes e clamídia, além do não cumprimento das medidas já adotadas como prevenção de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), como por exemplo, o simples uso de preservativos, está reconhecidamente associado à incidência da infecção por HPV. Essa pesquisa teve como objetivo avaliar o desempenho diagnóstico das metodologias de citologia convencional (Exame de Papanicolau) em relação à citologia em base líquida, além de determinar a prevalência dos genótipos 16 e 18 do HPV em mulheres sem efeito citopático compatível com HPV e relacionar a presença de quadros inflamatórios, associados ou não ao HPV, com dados epidemiológicos como idade, escolaridade, condição sócio-cultural de mulheres provenientes do município de Barcarena – Pará – Brasil. Para tanto, participaram deste estudo, voluntariamente, 50 mulheres atendidas na Unidade de Saúde de Barcarena – Pará, através de campanha para coleta de Exame de Papanicolau como método de prevenção de câncer do colo do útero. Estas mulheres receberam informações referentes a todos os procedimentos realizados pelo corpo de saúde deste estudo e aos resultados desta pesquisa e somente após as voluntárias terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as mesmas foram incluídas para as coletas de amostras. As análises e os resultados dos testes de citologia de base líquida e convencional foram realizados segundo a Classificação de Bethesda e revisados cegamente por dois citopatologistas. Para a análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher e o "Screening Test" visando determinar a especificidade/ sensibilidade dos métodos, considerando significativo o valor de $p \leq 0,05$. Como resultado, observamos que o uso da citologia de base líquida tem demonstrado uma série de vantagens em relação à citologia convencional. No diagnóstico molecular (PCR) foram observadas ocorrências de HPV dos tipos 16 e 18 em 10% das mulheres atendidas. Dentre os casos que apresentaram PCR positivo para os tipos 16 ou 16/18 a maioria das mulheres tinham 27,4 anos de idade em média; com maior escolaridade; que exercem atividades domésticas e rurais; e com ocorrências de co-infecção por agentes infecciosos causadores de outras doenças sexualmente transmissíveis. Os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância da manutenção de campanhas gratuitas de prevenção do câncer de colo do útero como uma medida preventiva no combate desta doença, principalmente no Estado do Pará onde, provavelmente, o perfil epidemiológico da doença está associado às grandes distâncias que as mulheres de comunidades ribeirinhas têm que percorrer para realizar este exame de forma gratuita; ao tipo de atividade econômica da região; ao preconceito local ainda existente com o exame; e ao grau de dificuldade de implementação de ações efetivas de retorno das pacientes às consultas médicas após a obtenção do resultado do exame e mesmo o encaminhamento para diagnóstico molecular dos casos positivos para lesões do tipo ASC-H e NIC I, II e III.

PALAVRAS-CHAVE

HPV; diagnóstico citológico; epidemiologia.

ABSTRACT

HPV (human papillomavirus) was appointed by the WHO (World Health Organization - WHO) as the main risk factor for developing cervical cancer, thus becoming an important and very serious public health problem, especially in underdeveloped countries or under development. The early sexual activity, multiple partners and casual sex, smoking, immunosuppression (eg, the population of AIDS patients), pregnancy, sexually transmitted diseases like herpes and chlamydia prior, in addition to non-compliance with the measures already taken to prevent Sexually Transmitted Diseases (STDs), such as the simple use of condoms is admittedly associated with the incidence of HPV infection. This research aimed to evaluate the diagnostic performance of the methodologies of conventional cytology (Pap test) compared to liquid based cytology, and to determine the prevalence of genotypes 16 and 18 of HPV in women without HPV cytopathic effect compatible with and relate to presence of inflammatory conditions, or not associated with HPV, with epidemiological data such as age, education, socio-cultural condition of women from the municipality of Barcarena - Pará - Brazil. To do so, in this study voluntarily, 50 women attended at the Health Unit Barcarena - Brazil, through the campaign to collect Pap test as a method of preventing cancer of the cervix. These women were informed about all procedures performed by the body of this health study and the results of this search and only after the volunteers have signed the Deed of Consent, they were included for sampling. The analysis and test results of liquid based cytology and conventional were performed according to the Bethesda Classification and reviewed blindly by two pathologists. For the analysis statistic was used Fisher's exact test and the "Screening Test" to determine the specificity / sensitivity of the methods, considering the significant value of $p \leq 0.05$. Our results indicate that the use of liquid based cytology has demonstrated a number of advantages over conventional cytology. In molecular diagnostics (PCR) were observed occurrences of HPV types 16 and 18 in 10% of women attended. Among the cases that were PCR positive for types 16 and 16/18 most of the women were 27.4 years old on average, with more schooling, performing household chores and rural areas, and with instances of co-infection by infectious agents cause other sexually transmitted diseases. The results of this study reinforce the importance of maintaining free campaigns to prevent cervical cancer as a preventive measure in combating this disease, especially in Pará State, where, probably, the epidemiological profile of disease is associated with the large distances that women in river communities have to travel to perform this test free of charge, the type of economic activity in the region, the local bias still exists with the test, and the degree of difficulty of implementing effective return of patients to medical appointments after obtaining the test result and the same routing for molecular diagnosis of positive cases for type lesions ASC-H and CIN I, II and III.

KEYWORDS

HPV, cytological diagnosis, epidemiology.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Imagem do Papilomavírus Humano (HPV).....	05
Figura 2 – Estrutura genética do Papiloma Vírus Humano.....	07
Figura 3 – Células infectadas pelo Papiloma Vírus Humano.....	12
Tabela 1 – Lesões que os tipos de papilomavírus humanos podem provocar.....	06
Tabela 2 – Métodos de Diagnósticos por Infecção de HPV.....	18
Tabela 3 – Seqüências nucleotídicas de iniciadores e sondas utilizadas para identificar os genótipos 16 e 18 do HPV.....	24
Tabela 4 – Resultados de PCCU associados à Faixa Etária das mulheres atendidas neste projeto.....	27
Tabela 5 – Resultados de PCCU associados ao Tipo de Ocupação das mulheres atendidas neste projeto.....	28
Tabela 6 – Resultados de PCCU associada ao Grau de Escolaridade das mulheres atendidas neste projeto.....	28
Tabela 7 – Diagnóstico molecular e genotipagem do HPV associado à presença de citologia característica de lesões celulares limítrofes e pré-malignas com ou sem associação a efeito citopático compatível com HPV.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

HPV	Papiloma Vírus Humano
PCR	Reação em Cadeira de Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
vDNA	Ácido Desoxirribonucléico Viral
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Celular
MS	Ministério da Saúde
INCA	Intituto Nacional de Câncer
WHO	World Health Organization
nm	Nanômetro
LCR	Reação não-codificante (L ong C ontrol R egion)
ORF	O pen R eaging F rames
NIC	N eoplasias I ntraepiteliais C ervicais
ASC	Atipias de Células Escamosas
ASC-US	Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado
ASC-H	Atipias de Células Escamosas de Lesão de Alto Grau
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

O exame de Papanicolau é o método usado para o rastreamento, diagnóstico e detecção primária do câncer do colo do útero bem como de lesões pré-cancerígenas deste tipo de câncer (SCHNEIDER *et al.*, 1987; VAN DER GRAAF *et al.*, 2002). É também utilizado para o diagnóstico de diversas outras condições patológicas que acometem o trato genital feminino, como infecções por HPV, Herpes sp., *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.*, bactérias, entre outros agentes infecciosos. Especificamente em relação à detecção do HPV o exame de papanicolau não tem nem sensibilidade nem especificidade para a sua detecção, porém, quando bem realizado por profissionais experientes, permite o diagnóstico precoce destas lesões sugestivas de HPV através da utilização de critérios citológicos associados à presença de estruturas teciduais conhecidas como coilocitose e paraceratose. Apesar disso, estes critérios necessitam de confirmação de diagnóstico através de exames moleculares por meio de testes de captura híbrida e Reação em Cadeia de Polimerase - PCR (GOMPEL & KOSS, 1997; NORONHA *et al.*, 2005; VERSALOVIC & LUPSKI, 2007).

O HPV é, por sua vez, considerado o agente viral mais freqüentemente transmitido por via sexual e é considerado necessário, mas não suficiente para causar o câncer cervical (ROMBALDI *et al.*, 2008; COLLINS *et al.*, 2010). Seu controle é de grande importância para a prevenção do câncer de colo de útero, de modo que, segundo estimativas do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de 1996, cerca de 500 mil a 1 milhão de novos casos de infecção por HPV ocorrem anualmente em todo o mundo (OKADA *et al.*, 2003), com 11.150 casos registrados de HPV nos Estados Unidos e aproximadamente 3.670 mortes estimadas em 2007, em virtude do câncer cervical associado ao HPV. (WAKABAYASHI *et al.*, 2008). Além disso, mais de 80% da incidência e mortalidade relacionadas aos casos de câncer cervical ocorrem em regiões que oferecem recursos limitados, onde mulheres são carentes de cuidados médicos e tem pouco ou nenhum acesso a serviços de saúde preventiva (PARKIN, 2006; SINGH *et al.*, 2009).

Segundo estimativas do INCA (2003), no contexto mundial, o câncer de colo de útero é o segundo mais comum entre mulheres (cerca de 468 mil casos novos). As maiores taxas de incidência encontram-se na América do Sul, Caribe, África sub-Saária e no Sul e Sudeste da Ásia. Nos países desenvolvidos as taxas médias de incidência anuais ajustadas por idade são baixas (menores que 14/100.000). Quase 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres. Todavia, “com base em evidências, têm-se sugerido que cerca de 50% dos adultos sexualmente infectados por um ou mais tipos de HPV tenham tido infecção transitória”, levando a uma estimativa de que em 30 a 50% dos casos as lesões clínicas regridem espontaneamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000), ao passo que para a infecção progredir a um câncer invasivo, é necessária uma infecção persistente, bem como a contínua expressão de alguns genes virais encontrados nos subtipos de HIV de alto risco (WU *et al.*, 2008)

Existem aproximadamente 40 subtipos de HPV capazes de infectar por meio da exposição do trato genital durante o ato sexual (RAMA *et al.*, 2008). Nesta perspectiva, os vários tipos de HPV já identificados, capazes de infectar o trato genital, foram agrupados em tipos de baixo risco (6, 11, 26, 42, 44, 54, 70, 73), e de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66, 68) para o desenvolvimento de câncer cervical uterino (VILLA LL, 1977).

A transmissão não-sexual do HPV pode ocorrer diretamente pelo contato com pele ou mucosas infectadas, ou indiretamente por meio de objetos contaminados, ou ainda durante o período perinatal (ROMBALDI *et al.*, 2008).

Atualmente pesquisadores têm focado seus estudos na identificação de cofatores que modulam a infecção por HPV até sua transformação em neoplasia cervical de alto grau e doença invasiva (COLLINS *et al.*, 2010). Vários, entretanto, são os fatores de risco já identificados para o câncer do colo do útero e infecção por HPV, sendo que alguns dos principais tipos de HPV associados ao câncer de colo de útero estão ligados ao início precoce da atividade sexual, à multiplicidade de parceiros sexuais, ao tabagismo (diretamente relacionados à quantidade de cigarros fumados), à higiene íntima inadequada e ao uso prolongado de contraceptivos orais

(SCHIFFMAN & CASTLE, 2003; RAMA *et al.*, 2008). Segundo Nowak e Karowicz-Bilińska (2007) todas as mulheres em idade reprodutiva deveriam se submeter a testes de DNA para a detecção do HPV.

Estudos revelaram que o risco relativo estimado para a associação entre a infecção por HPV e a neoplasia uterina é de amplitude muito superior à da associação entre o tabagismo e o câncer do pulmão, comparando-se apenas com a associação entre a Hepatite B crônica e o câncer do fígado (PARKIN, 2006; CHENG *et al.*, 2007. Evidências obtidas usando testes de PCR de uma vasta coleção internacional de tipos de cânceres uterinos, mostraram que o DNA do HPV estava presente em 92,9 a 99,7 % dos casos de câncer cervical invasivo (RAMA *et al.*, 2008). Dentre os tipos de HPV, destacam-se o HPV 16 e HPV 18 – de elevado risco oncogênico, que são responsáveis por causar aproximadamente 70% dos cânceres uterinos e 50% a 60% das lesões cervicais pré-cancerosas (GOLDIE *et al.*, 2003; STRICKLER *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2009).

A detecção viral por métodos moleculares tem incluído vários avanços importantes no diagnóstico da infecção por patógenos virais de RNA ou DNA. Este método de detecção direta de patógenos virais por meio da amplificação de ácidos nucléicos tem eliminado a absoluta necessidade de cultivos virais que consomem muito tempo e tornaram possível o diagnóstico rápido de infecções virais (VERSALOVIC & LUPSKI, 2007).

O reconhecimento das papilomavíroses como um importante agente etiológico de cânceres humanos tem aumentado sua importância médica e estimulado pesquisas no desenvolvimento de estratégias para rastreamento, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças associadas ao HPV (WU *et al.*, 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTÓRICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Na antiguidade as verrugas já eram conhecidas como infecciosas por gregos e romanos, que agruparam as verrugas genitais com doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis e a gonorréia (WU *et al.*, 2008). Elas eram registradas pelos poetas eróticos e foram descritas pelos médicos da época como “condiloma” ou “figos”.

Apesar desta longa e intrigante história, o conhecimento a respeito da verdadeira etiologia das verrugas genitais foi sendo decifrado lentamente. Semelhanças clínicas entre as verrugas cutâneas e as verrugas genitais foram notadas por Celsus no primeiro século depois de Cristo. Porém, somente em 1933 Shope e Hurst publicaram a descoberta do HPV a partir de lesões em coelhos selvagens que poderiam ser transmitidas por um extrato filtrado e sem nenhuma célula. Os autores deduziram que a doença era de origem viral, e alguns anos mais tarde, Rous e Kidd (1940) mostraram que este vírus, transmitido ao coelho doméstico, provoca cânceres cutâneos quando a pele era pincelada previamente com alcatrão.

A transmissão sexual da verruga genital somente foi sugerida em 1954 por Barret e colaboradores, após seus estudos com soldados que voltaram da guerra da Coréia e que haviam adquirido as verrugas penianas após intercursos com mulheres coreanas. Em 1974, Hausen e colaboradores, após a descoberta da tecnologia do DNA recombinante, iniciaram estudos que levaram à descoberta da presença de HPV em lesões de carcinoma de colo uterino (GAYA *et al.*, 1996).

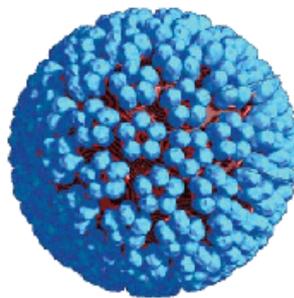
2.2. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV

Os Poliomavírus foram originalmente classificados junto aos Papilomavírus em uma família chamada Papovaviridae, por que são vírus que partilham muitas características morfológicas (WU *et al.*, 2008). Posteriores estudos,

entretanto, mostraram que uma importante diferença é que o genoma e o capsídeo do papilomavírus são maiores do que nos Poliomavírus, entre outras diferenças detectadas após o seqüenciamento genômico dos dois vírus. Desta forma, os Papilomavírus foram mais tarde designados pelo Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus, como uma família separada, os Papilomaviridae (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

A incidência por câncer de colo de útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (MS/INCA, 2005). Os primeiros contatos com o papilomavírus humano costumam ocorrer em pessoas jovens no início de sua vida sexual e é capaz de induzir lesões de pele ou mucosa, as quais mostram um crescimento limitado e que em aproximadamente 80 % dos casos regredem espontaneamente (RAMA *et al.*, 2008). O material genético das espécies de HPV é representado por DNA envolvido por um capsídeo protéico de formato icosaédrico (20 facetas) com 50 – 55nm de diâmetro, composto por 72 capsômeros formados por 2 proteínas estruturais - L1 e L2 - sendo que a primeira corresponde a 90% do conteúdo protéico do vírus, lembrando uma bola de golfe à microscopia eletrônica (Figura 1). Os Papilomavírus humanos são vírus epiteliotrópicos capazes de infectar uma grande variedade de animais (HOU *et al.*, 2002).

Figura 1 – Imagem do Papilomavírus Humano (HPV)



Fonte: Imagem capturada da internet no sítio: www.ipoporto.min-saude.pt/.../3412/virusHPV.bmp.

Os Papilomavírus são uma família de vírus de DNA com aproximadamente 200 subtipos e que mostram um marcante tropismo pelo epitélio escamoso. Apesar de uma semelhante estrutura genômica, diferentes tipos de HPV

infectam epitélios em distintas localizações anatômicas (McLaughlin-Drubin & Münger, 2009).

Os tipos de HPV genitais podem subdividir-se em dois grupos (tabela 1): os HPV de baixo risco e os HPV de alto risco. Os HPV de baixo risco causam vários tipos de lesões benignas, como verrugas, papilomas laríngicos e tumores ano-genitais, gerando por vezes comichão e até sensações dolorosas. Os tipos de HPV de alto risco, por sua vez, também podem provocar tumores benignos em mucosas; sendo, porém estes tipos bem mais carcinogênicos que os anteriores, principalmente os associados ao câncer do colo do útero (OZBUN, 2002; MUNOZ *et al.*, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2005).

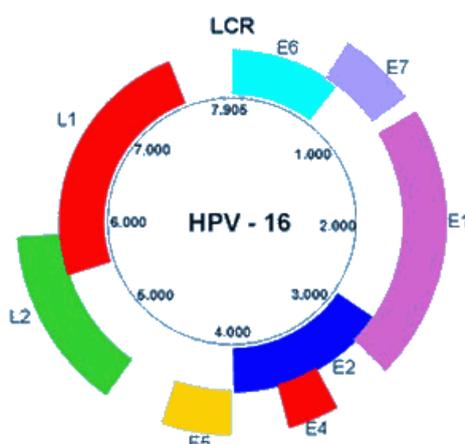
Tabela 1 – Lesões que os papilomavírus humanos podem provocar

Tipo de HPV	Lesão que provoca
1	Verrugas
2, 57	Tumores cutâneos
6, 11, 13, 52	Tumores mucosos de baixo risco
16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 58	Tumores mucosos de alto risco

Fonte: Alchorne *et al.*, 2002.

O genoma do HPV é composto de três regiões: a região não codificante – LCR (**L**ong **C**ontrol **R**egion) – que contém a origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição; a região precoce, composta por genes precoces (**E**arly) onde destacam-se os genes E1, E2, E6 e E7; e a região tardia, que contém dois genes tardios (**L**ate) – L1 e L2 (Figura 2). O genoma é constituído por cerca de 8000 pares de bases distribuídos em um duplo filamento circular, onde apenas o filamento positivo contém os genes principais. (TERHUNE *et al.*, 2002).

Figura 2 – Estrutura genética do Papiloma Vírus Humano.



Fonte: Imagem capturada da internet no sítio: www.ipoportorito.min-saude.pt/.../esquemanetHPV.bmp

A maioria dos casos de carcinomas cervicais estão associados à infecção por HPV de alto risco e à presença de duas proteínas virais, E6 e E7, as quais são fortemente expressadas em tumores e parecem ser necessárias no processo de indução e transformação maligna (CHENG, 2007; McLAUGHLIN-DRUBIN & MÜNGER, 2009).

Durante a progressão carcinogênica o genoma do HPV frequentemente se integra ao material genético da célula hospedeira e, como resultado, o ciclo de vida do HPV está intimamente associado ao processo de diferenciação da célula epitelial infectada. Uma vez que os papilomavírus não contam com todas as enzimas essenciais para a replicação genômica viral, eles utilizam as estruturas de síntese de DNA da célula hospedeira para esse propósito (STUBENRAUCH *et al.*, 1999; McLAUGHLIN-DRUBIN & MÜNGER, 2009).

A integração do genoma do HPV no DNA da célula ocasiona a ruptura do gene E2. A atividade normal desse gene inibe a expressão dos genes E6 e E7. A proteína E6 atua degradando a proteína celular supressora de tumor, p53, já E7 se liga à proteína pRb (proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma), que deixa de regular negativamente o ciclo celular, em seu processo de divisão da fase G1 para S (CAMARA *et al.*, 2003; HOWIE *et al.*, 2009).

A proteína E6 do HPV-16 degrada e inativa a proteína celular p53 pela via de proteólise, mediada pela ubiquitina. Um polipeptídeo celular do hospedeiro chamado de polipeptídeo associado à E6 (E6-AP) inicialmente liga-se à E6 e o complexo E6/E6-AP atua como uma ubiquitina-ligase, conjugando ubiquitina à p53. A degradação da p53 resulta em aumento da instabilidade genética e em acúmulo de mutações oncogênicas (CAMARA *et al.*, 2003; HOWIE *et al.*, 2009).

A proteína E7 do HPV-16, quando fosforilada, liga-se às formas hipofosforiladas da pRb e esta interação libera o fator de transcrição E2F, antes ligado à pRb. Após essa liberação, E2F ativa a transcrição dos genes necessários para a síntese de DNA. Desta forma, a proteína E7 perturba o crescimento celular normal, estimulando, de maneira ininterrupta, a expressão de genes responsáveis pela divisão celular (SCHIFFMAN & BURK, 1997; MANSUR, 2001; McLAUGHLIN-DRUBIN & MÜNGER, 2009).

2.3. TRANSFORMAÇÃO CELULAR

O processo conhecido como transformação celular do papilomavírus humano de alto risco consiste em uma alteração do ciclo normal de divisão celular, com inativação dos inibidores da progressão do ciclo celular, principalmente as proteínas p53 (responsáveis por induzir a apoptose) e pRb, pela ação das proteínas E6 e E7. A inativação da proteína p53 pela proteína E6 do HPV16 e HPV18 desempenha um papel fundamental na gênese de tumores cervicais. Ao formar complexos com as proteínas celulares p53 e pRb (respectivamente), as proteínas E6 e E7 promovem a degradação daquelas pela via proteolítica dependente da ubiquitina e inativa suas funções como controladoras do ciclo celular. (PARK & ANDROPHY, 2002; FEHRMANN *et al.*, 2003; HEBNER *et al.*, 2007).

Neste processo de transformação, as proteínas E6 degradam a proteína celular p53, ao passo que a E7 inibe a p105Rb, estimulando e facilitando, assim, ao surgimento dos papilomas (PARK & ANDROPHY, 2002; FEHRMANN *et al.*, 2003). Além disso, no caso do HPV 18, a proteína E4 também parece ter função importante neste processo ao desempenhar o papel de travar o crescimento celular

na transição da fase G₂ para a M, durante a mitose. Sua expressão é detectada primeiramente nas camadas de células parabasais, onde a replicação do DNA do HPV é iniciada. Todavia, a sua função moduladora ainda se encontra pouco caracterizada (NAKAHARA *et al.*, 2002).

Outro passo essencial neste processo de transformação é a ação da telomerase celular, que parece estar relacionada com a imortalização dos queratinócitos. Esta imortalização é necessária para a eficiência do ciclo viral, pois os altos níveis de divisão celular induzidos pelo vírus conduzem ao desgaste dos telômeros dos cromossomos celulares e, ao alcançarem os genes celulares, tornam a célula moribunda (LEE *et al.*, 2002; PARK & ANDROPHY, 2002). Entretanto, apesar de todos os HPV causarem alterações proliferativas, são os tipos portadores de proteínas E6 e E7 (oncoproteínas de alto risco), os que tornam estes vírus capazes de, eventualmente, desempenharem um papel central na geração e progressão de tumores malignos (LEE *et al.*, 2002).

2.4. CICLO VIRAL DO HPV

O mecanismo pelo qual o HPV de alto risco influencia no ciclo celular, levando à sua desregulação e progressão da lesão, inclui fatores inerentes ao vírus e à sua inter-relação com a célula hospedeira (ELEUTÉRIO JR *et al.*, 2007).

Os vírus de HPV, após infectarem as células das camadas mais profundas do estrato basal (composto por células indiferenciadas e com grande atividade mitótica) do epitélio cutâneo e das zonas de transformação de mucosa (epitélio pluriestratificado), liberam o genoma viral no interior da célula, que inicia a síntese das proteínas precoces E1 e E2. Em seguida à ação destas proteínas, ocorre a replicação do genoma, por ação das proteínas E1 e E2, até obter 20 a 100 cópias. Esta fase denomina-se por fase de estabelecimento (HUBERT & LAIMINS, 2002; OZBUN, 2002).

A fase de manutenção inicia quando o vírus aumenta o número de cópias dentro da célula, ainda no estrato celular basal. A partir deste momento, o vDNA é replicado somente quando o cDNA o faz, na proporção de 1:1, garantindo ao vírus que o número de cópias permaneça aproximadamente igual nas células-

filhas. Adicionalmente, a expressão dos genes precoces E6 e E7 conduz à transformação celular: a célula passa a apresentar um ciclo de vida mais rápido e a se dividir com mais frequência. As células transformadas aumentarão em número e acabarão por substituir as normais, levando à formação de tumores benignos. Assim, o vírus promove a sua proliferação no tecido, sem ter que destruir a célula que o aloja (PARK & ANDROPHY, 2002; WAGNER & HEWLETT, 2003).

A terceira fase, denominada de fase produtiva, acontece nas células dos estratos parabasais. Nestas, o vírus toma o controle total da célula e as proteínas E1 e E2, em grande quantidade, promovem a amplificação das cópias de vDNA, até gerar milhares de cópias por célula. Além disso, inicia-se a síntese das proteínas tardias L1 e L2, ao passo que nas células mais diferenciadas, intermediárias, ocorre a montagem de viriões. A liberação dos vírus acontece nos queratinócitos – as células mais diferenciadas do epitélio e localizadas mais superficialmente no mesmo (células superficiais) –, local em que as cópias virais ficam imediatamente disponíveis para infectar um novo tecido por meio do contato físico (HUBERT & LAIMINS, 2002; WAGNER & HEWLETT, 2003; OZBUN, 2002).

2.5. INTEGRAÇÃO E CARCINOGENESE

Nas infecções por HPV de alto risco as proteínas virais E6 e E7 são bastante ativas e interferem no ciclo celular das células do hospedeiro, conforme descrito anteriormente. Como resultado, o processo de divisão celular ocorre mais rapidamente do que nas infecções por HPV de baixo risco, aumentando as probabilidades de o HPV de alto risco ocasionar, acidentalmente numa das células, a integração do vDNA com o genoma celular e indução do aparecimento da carcinogênese (HOU *et al.*, 2002; WAGNER & HEWLETT, 2003).

Estudos mostram que esta integração do vDNA com o genoma celular parece ser a causa da carcinogênese associada ao HPV. O mecanismo deste processo de integração costuma se desenvolver a partir da ORF (Open Reading Frames) de E2 que sofre uma ruptura, o que a torna inútil e interrompe sua

produção. Assim, sua quantidade se torna quase nula nas células infectadas, impedindo a regulação eficiente da expressão dos genes E6 e E7.

A hiperativação destes genes na produção das proteínas E6 e E7 acontece de forma contínua, o que diminui sensivelmente a expressão das proteínas celulares p53 e p105Rb. Essa alteração causa interrupção do mecanismo de apoptose, e a célula é induzida a dividir-se continuamente, resultando na formação de um tumor maligno, ou neoplasia (HOU *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002; WAGNER & HEWLETT, 2003).

A rápida multiplicação celular conduz ao acúmulo de mutações genéticas que podem dotar as células de novas características, como a capacidade de invadir tecidos adjacentes, o que possibilitaria sua disseminação pelo organismo através da corrente sanguínea, originando metástases (WAGNER & HEWLETT, 2003).

2.6 PATOGÊNESE

O tempo de incubação do HPV nas células do hospedeiro pode ser muito variável, de acordo com o local de origem das células infectadas. Assim, nas mãos e nos pés pode variar em um período de incubação de 6 a 18 meses, enquanto que nos órgãos genitais este tempo de incubação é mais curto variando de 2 a 6 meses (SILVA, H, *et al.*, 2003).

No colo do útero 90% das patologias associadas ao HPV localizam-se na zona de transição escamo-colunar do epitélio (zona de transformação ou junção escamo-colunar) onde as células proliferativas estão mais expostas. É justamente nas células da camada basal desta junção escamo-colunar que o vírus pode se replicar e expressar suas proteínas precoces, todavia, a replicação vegetativa do DNA viral ocorre somente nas células diferenciadas das camadas superficiais deste epitélio. Portanto, à medida que as células proliferativas se dividem e se deslocam para a superfície, elas disseminam os vírus para todas as células irmãs, de forma displásica (FEHRMANN *et al.*, 2003).

Na camada celular superficial deste epitélio as células passam a apresentar vacuolizações, e o epitélio passa a apresentar aspecto verrugoso, em decorrência da proliferação celular (FEHRMANN *et al.*, 2003).

Uma verruga, ou tumoração benigno é a manifestação patológica macroscópica da infecção por HPV. Essas manifestações freqüentemente levam ao aparecimento de uma alteração morfológica microscópica conhecida, desde os anos 50, como atipia coilocítica. Os coilócitos, como são conhecidas estas atipias, são caracterizados por um amplo halo perinuclear com as bordas bem delimitadas e, normalmente, binucleação; os núcleos são hipercromáticos e apresentam contornos irregulares (Figura 3). Essas alterações celulares começam a aparecer primeiramente nas camadas intermediárias do epitélio, estendendo-se até as camadas superficiais, onde geralmente ocorrem de forma mais exuberante e com a apresentação citológica do efeito citopático do vírus (PAPILOMAVÍRUS..., 2002).

Figura 3 – Células infectadas pelo Papiloma Vírus Humano



Fonte: Bonfiglio T A, Erozan Y S, 1997, pg 86, figura D. *Gynecologic Citopathology*.

Algumas alterações celulares associadas ao HPV podem progredir para atipias celulares pré-neoplásicas de diferentes graus. Neste caso, as células infectadas exibem alterações no seu crescimento e diferenciação (alterações displásicas), com perda no padrão de estratificação em ambas as camadas de células diferenciadas, que passam a expressar queratinas em quantidade e qualidade diferentes. Desta forma, displasias cervicais associadas a certos tipos de

HPV podem evoluir a carcinomas, entretanto o curso da doença pode demorar de 10 a 20 anos (SCHIFFMAN & CASTLE, 2003).

A progressão maligna, nestes casos, é restrita a determinados tipos de HPV. Os HPVs do tipo 6 e 11, encontrados na maioria dos condilomas genitais e papilomas laríngeos, parecem não oferecer nenhum risco de progressão neoplásica apesar de serem encontrados numa pequena proporção em tumores malignos. Por outro lado, mais de 80% dos cânceres de colo de útero, e também de vulva, ânus e pênis em menores freqüências, contém HPV tipos 16, 18, 31 e 45, classificando-os no grupo dos HPV de alto risco (VILLA, LL, 1977).

2.7. QUADRO CLÍNICO

O espectro das lesões associadas ao HPV genital varia desde papilomas típicos até infecções clinicamente não aparentes. Os fatores clínicos que estão associados à persistência da infecção e sua progressão para neoplasias intra-epiteliais de alto grau (displasia moderada, displasia acentuada ou carcinoma *in situ*) são: os tipos virais presentes, o estado imunológico, tabagismo e outros como o início precoce da vida sexual, quantidade de parceiros sexuais ou higiene íntima precária. Assim, a infecção clínica pelo HPV tem sido descrita de três formas:

Forma Latente:

Nesse tipo a infecção pelo HPV é diagnosticada no trato genital feminino através do achado do DNA viral por técnicas de biologia molecular, não existindo evidências clínicas, citológicas, colposcópicas ou histológicas desta infecção.

Acredita-se que, nesta forma da infecção, o DNA viral encontra-se na forma epissomal, aparentemente não funcional, e replica-se apenas uma vez a cada ciclo celular, o que seria menos do que o número de cópias virais necessárias para o diagnóstico molecular pelos métodos mais antigos, como a hibridização *in situ* (FERENCZY *et al*, 1992).

Forma subclínica:

Nesta forma de infecção, ao invés do HPV produzir um condiloma clássico e evidente, a doença caracteriza-se por áreas difusas de hiperplasia epitelial planas não papilífera. Apesar das diferenças macroscópicas entre o condiloma e este tipo de infecção, elas são caracterizadas por proliferação da camada germinativa basal, perda de maturação do epitélio e alterações citológicas características. A maior diferença histológica é que o condiloma é francamente papilar, enquanto a forma subclínica é plana ou micropapilar; colposcopicamente traduzida por uma área que se torna esbranquiçada após aplicação do ácido acético 2 a 5% (FERENCZY *et al*, 1992).

No homem esta forma de infecção pode apresentar-se como epitélio aceto-branco ou máculas aceto-brancas vistas durante a peniscopia (FERENCZY *et al*, 1992).

Forma clínica:

Os condilomas, dependendo do tamanho e localização anatômica, podem ser dolorosos, friáveis e/ou pruriginosos. Quando presentes no colo uterino, na vagina, na uretra e no ânus, também podem ser sintomáticos. As verrugas intra-anais estão presentes em pacientes que tenham tido coito anal receptivo, já os perianais podem ocorrer tanto em homens como em mulheres que não tenham história de penetração anal. Menos freqüentemente estas lesões podem estar presentes em áreas extragenitais, como conjuntivas, mucosa nasal, oral e laringe (FERENCZY *et al*, 1992).

Os genótipos 16, 18, 30, 31, 33, 34 e 45 são constantemente associados com a neoplasia intraepitelial, por tanto considerados de alto risco e prevalecem em cânceres anogenitais. Além destes, mais de 20 genótipos de HPV estão associados ao câncer cervical, porém o mais freqüentemente encontrado em

carcinomas cervicais e em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) em todo o mundo é o genótipo 16 11. O genótipo 18 parece predominar em adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos, os quais são responsáveis por aproximadamente 5% dos cânceres cervicais. (KANESHIMA *et al*, 2003).

2.8. EPIDEMIOLOGIA

Dados epidemiológicos têm mostrado que o HPV é o fator de risco mais importante para a progressão de alterações celulares no câncer do cervix uterino (COUPLÉE *et al.*, 2005). Os tipos de HPV que causam verrugas genitais visíveis não são normalmente os mesmos que levam às alterações das células pré-cancerígenas do colo uterino (STRICKLER *et al.*, 2003). Porém, cerca de 50 % dos indivíduos infectados nunca desenvolvem verrugas genitais, mas são, no entanto, capazes de transmitir o vírus a outras pessoas (SCHIFFMAN & CASTLE, 2003; STRICKLER *et al.*, 2003).

Inúmeros estudos sugerem que a infecção pelo HPV é um fenômeno transitório ou intermitente, com uma duração média de 12 meses. O risco desta infecção evoluir para uma alteração celular do tipo neoplasia intraepitelial cervical (CIN – **C**ervical **I**ntraepithelial **N**eoplasia) subsequente é proporcional ao número de tipos de HPV oncogênicos, o que sugere que o desenvolvimento carcinogênico resulta de infecções persistentes, e muitas vezes por vários subtipos de HPV, ou por tipos de alto risco. No entanto, os determinantes da persistência do HPV dependem em grande parte da capacidade do indivíduo infectado desencadear uma resposta imunológica eficaz contra o vírus (FRANCO *et al.*, 2001). A função imunológica diminuída está associada a um maior risco de infecção persistente e aparecimento de câncer (WU *et al.*, 2008).

Atualmente se sabe que o tipo 16 é o mais prevalente em todo o mundo (SCHIFFMAN & CASTLE, 2003), independentemente da gravidade da lesão escamosa, e, de maneira geral, os HPV identificados como de alto risco estão presentes em mulheres imunocompetentes em cerca de 20% dos quadros histológicos negativos, em 70% dos casos de lesões intra-epiteliais escamosas de

baixo grau (LSIL), em mais de 90% das lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e em mais de 95% dos casos de carcinoma escamoso (ANDERSSON *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006; ELEUTÉRIO JR *et al.*, 2007).

Dentre os casos de lesões associadas à infecção pelo papilomavírus, a persistência do HPV nas células epiteliais parece ser crítica para o desenvolvimento de alterações celulares do tipo neoplasias intraepiteliais cervicais, que são classificadas em três tipos: a NIC I, considerada uma atipia celular de baixo grau e as NIC's 2 e 3 denominadas de precursoras do câncer uterino por apresentarem lesões de elevado risco para o desenvolvimento carcinogênico juntamente com os carcinomas *in situ* (STRICKLER *et al.*, 2003).

O Ministério da Saúde do Brasil registra a cada ano cerca de 137 mil novos casos de lesões provocadas pela infecção por Papilomavírus humano no país, sendo que este vírus foi encontrado em 90% dos casos de câncer de colo de útero. Um levantamento realizado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2008) mostrou que existem aproximadamente 18 mil novos casos de câncer de útero a cada ano no país. No ano de 2007 o câncer cervical foi o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres no mundo todo (WU *et al.*, 2008).

A estimativa do INCA para 2002 era de 17 mil novos casos de câncer uterino, com cerca de 4 mil óbitos. Em 2001, foram registrados 3.860 óbitos de mulheres em decorrência do câncer uterino. O número de casos novos de câncer do colo uterino esperados para o Brasil em 2005 foi de 20.690, com um risco estimado de 22 casos a cada 100 mil mulheres.

O número de casos novos de câncer do colo uterino esperados para o Brasil em 2010 poderá atingir uma margem de 40,97 novos casos a cada 100 mil mulheres. O Pará tem uma estimativa de 20,82 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2010), fato que merece atenção e interesse pelos órgãos governamentais e de controle de endemias.

2.9. DIAGNÓSTICO

Além da anamnese e do quadro clínico, o diagnóstico da infecção por HPV deve ser confirmado por técnicas histológicas, citológicas e moleculares, sempre que possível. O primeiro diagnóstico de alterações celulares associadas ao HPV é feito com ajuda a aplicação de ácido acético 4%, onde as lesões associadas ao HPV tornam-se esbranquiçadas e são visualizadas a olho desarmado (nu) ou com ajuda de um colposcópio (ALCHORNE *et al*, 2002).

O teste de Papanicolau, exame subsequente à visualização macroscópica das lesões, é recomendável em todos os casos de verrugas genitais em mulheres para a verificação da presença das alterações morfológicas sugestivas do efeito citopático do HPV, tais como presença de coilócitos, células disqueratóticas e binucleação; além de outros critérios citológicos recomendados para determinação do efeito citopático do HPV (MIZIARA, 2004).

Outros métodos, porém, são necessários para a identificação precisa destas alterações celulares ou mesmo da presença do vírus ou do seu material genético (DNA) em amostras biológicas. Com o avanço das técnicas de biologia molecular baseadas na amplificação do DNA do HPV em amostras biológicas, muitas dificuldades de padronização e comerciais foram corrigidas e hoje, através destas técnicas, é possível a detecção dos diversos tipos de HPV de alto risco, mesmo em casos de baixas cargas virais durante as infecções (COUPLÉE *et al.*, 2005). A Tabela 2 mostra um breve resumo dos principais métodos, sua sensibilidade para a identificação precisa dos vários tipos de HPV, vantagens e desvantagens.

Tabela 2 – Métodos de Diagnósticos por Infecção de HPV

Método	Vantagem	Desvantagem
Inspeção / Lupa Citologia	Baixo custo e rápido Baixo custo e rápido	Não detecta a doença subclínica. Pouco sensível; possibilidade de erros na amostra e de interpretação.
Histologia	Sensível para diagnóstico neoplásico e morfológico.	Método Invasivo.
Colposcopia, uretroscopia, anoscopia	Visualização ampliada a possíveis lesões	A diferenciação das lesões associadas ao HPV é de difícil acessibilidade em relação a alguns tipos de neoplasias.
Southern Blot	Sensível. Permite a identificação do tipo de HPV, usa tecido vivo ou células.	Uso de sondas radioativas, em técnica trabalhosa, demorada tem custos elevados.
Hibridação por Blot	Sensível. Permite a identificação do tipo de HPV usa tecido vivo ou células.	Permite falso-positivo devido a Hibridações cruzadas e tem custos elevados.
Hibridação in situ	Permite a localização do HPV. Usa tecido vivo ou células.	Baixa sensibilidade e tem custos elevados.
Imuno-histoquímica	Permite a localização do HPV no contexto morfológico.	Pouco sensível e pouco específico, tem custos elevados.
PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)	Sensível, permite a detecção do DNA viral no tecido vivo, fixado ou em células, e ainda a identificação do tipo de HPV em pouca quantidade de material biológico.	Grande potencial para contaminação ou amplificação inespecífica.
Sorologia	Identificação de anticorpos e de infecção possivelmente passada	Não há teste disponível para tipos específicos de HPV.

Fonte: Alchorne *et al*, 2002.

2.9.1 – Achados citológicos e classificação

O exame citológico de Papanicolau não é apenas o mais utilizado para identificar células malignas e pré-malignas presentes em amostras cervico-vaginais, ele tem também um papel de suma importância na detecção das lesões pré-cancerígenas, associadas ou não ao HPV. Esta classificação baseia-se na identificação de características citológicas associadas a alterações no núcleo, citoplasma ou perda de suas relações íntimas, afinidade tintorial e espessura da carioteca nuclear quando comparada com a carioteca das células do epitélio normal. De tal modo que, as alterações nucleares e citoplasmáticas são tão discrepantes do normal que a simples observação microscópica, destas atipias permite definir e presumir o grau de desordens morfológicas peculiares que tornam possível a classificação citológica destas atipias epiteliais em leves, moderadas e acentuadas;

além dos casos do carcinoma *in situ*, ou invasor, tanto de origem escamosa como glandular (GOMPEL & KOSS, 1997).

Os Critérios Citoplasmáticos de Malignidade, assim, são associados à presença de células alteradas em relação ao:

- 1 Formato das células: células em fibra, em girino, em raquete, ovais ou elípticas.
- 2 Tamanho e formas variáveis (pleomorfismo).
- 3 Vacuolizações atípicas. A coilocitose observada na infecção por HPV, indicativa de infecção ativa, apresenta-se com grandes halos perinucleares que ocupam quase que totalmente o citoplasma da célula afetada, atipias nucleares, espessamento das bordas citoplasmáticas (halo perinuclear grande).
- 4 Presença de ceratinização.
- 5 Cariomegalia –núcleo de tamanho acima do usual. Deve-se a uma maior quantidade de DNA, e à presença de cromatina gigante e anômala.
- 6 Hiperchromasia – maior afinidade tintorial do núcleo (núcleos se corados mais intensamente).
- 7 Membrana nuclear grosseira e irregular; e cromatina grosseira e irregular, gerando espaços vazios no núcleo – são os principais critérios citomorfológicos de malignidade, os quais surgem em função do arranjo irregular da cromatina e da carioteca.
- 8 Presença de nucléolos múltiplos, proeminentes e irregulares – é outro indicativo de neoplasia pouco diferenciada ou de adenocarcinoma.

Essas atipias celulares podem ser observadas individualmente em uma grande variedade de alterações que vão desde os processos reacionais benignos como metaplasias relacionados à inflamação; até neoplasias intraepiteliais escamosas e glandulares observadas em lesões pré-malignas e neoplasias fracamente invasivas de colo de útero, associadas ou não ao HPV (GOMPEL & KOSS, 1997).

Em 1988, porém, na cidade de Bethesda, após várias tentativas de se chegar a uma classificação citomorfológica compatível com as observações feitas na citologia e na histologia de lesões de colo do útero, vários especialistas se reuniram e iniciaram uma ampla discussão com o objetivo de debater e buscar soluções para as altas taxas de falsos negativos detectados nos exames de prevenção ao câncer cervical (exame de Papanicolau). Assim, em 1991, novas propostas de mudanças foram feitas na classificação citológica de Bethesda que culminaram com a revisão desta classificação em 2001 e com o estabelecimento de uma nova estrutura para as classificações citológicas, aceitas até hoje que receberam o nome de Sistema de Bethesda (MIZIARA, 2004).

A versão atual baseia-se em uma análise do tipo da amostra com descrição do método utilizado (coleta e leitura, caso seja automatizada, descrição do aparelho), adequação da amostra – satisfatória para avaliação ou insatisfatória para avaliação, ressaltando as características do esfregaço e dos achados. Classificação geral - Negativo para atipias intra-epiteliais ou malignidade; Anormalidades de células epiteliais; Atipias de células escamosas (ASC) de significado indeterminado (ASC-US), não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H), lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) (MIZIARA, 2004).

Esse sistema de classificação de Bethesda permite a classificação da morfologia das células com base nas alterações associadas ao efeito citopático compatível com o HPV a partir de critérios citológicos clássicos como a identificação dos coilocitos associados ou não a células disqueratóticas ou a partir de critérios não-clássicos em que se encontra coilocitose discreta, disqueratose discreta, células “fantasmas”, células em “girino”, condensação de filamentos em células escamosas, células em fibra, núcleo em borrão, halo perinuclear e bi ou multinucleado. Onde a presença de cinco ou mais destes critérios não clássicos é o suficiente para sugerir a presença de efeito citopático compatível com o HPV (MIZIARA, 2004).

3. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o desempenho diagnóstico das metodologias de citologia convencional (Exame de Papanicolau) em relação à citologia em base líquida, além de determinar a prevalência dos genótipos 16 e 18 do HPV em mulheres sem lesões de cérvix uterina aparentes e relacionar a presença de quadros inflamatórios, associados ou não ao HPV, com dados epidemiológicos como idade, escolaridade, condição sócio-cultural de mulheres provenientes do município de Barcarena – Pará-Brasil.

ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar o desempenho diagnóstico das metodologias de citologia convencional (Exame de Papanicolau) em relação à citologia em base líquida;
- 2 Determinar a prevalência dos genótipos 16 e 18 do HPV em mulheres sem lesões de cérvix uterina aparentes;
- 3 Relacionar a presença de quadros inflamatórios, associados ou não HPV, com dados epidemiológicos como idade, escolaridade e condição sócio-cultural de mulheres.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA POPULACIONAL.

Participaram deste estudo, voluntariamente, 50 mulheres atendidas na Unidade Mista de Saúde de Barcarena – Pará, provenientes das zonas urbanas e rurais da cidade de Barcarena e região, através de campanha para coleta de Exame de Papanicolau como métodos de prevenção de câncer do colo do útero. A identificação das formas clínicas e sub-clínicas de HPV foi feita por meio da utilização de técnicas de ácido acético a 10%, além das análises macroscópicas das possíveis lesões, coleta de material cérvico-vaginal para realização de PCR para HPV 16 e 18 e citologia esfoliativa convencional e de citologia líquida.

Todas as pacientes atendidas nesta campanha receberam informações referentes a todos os procedimentos realizados pelo corpo de saúde deste estudo e aos resultados desta pesquisa, através de esclarecimentos verbais e por escrito. Somente após as voluntárias terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, promulgado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará, as mesmas foram incluídas para as coletas de amostras.

4.2. COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA CITOLOGIA CONVENCIONAL, CITOLOGIA LÍQUIDA E PCR.

Foram utilizadas duas técnicas para colheita do material cérvico-vaginal. A primeira baseada na coleta do material com escova cervical e espátula ginecológica para confecção de esfregaço em lâmina pelo método convencional, e a segunda baseada na coleta do material com o quite de coleta do sistema DNA-CITOLIQ®, composto de um tubete com 1ml de solução Universal Collection Medium (UCM) e escova endocervical do quite, para o procedimento da citologia de base líquida pelo Sistema DNA-CITOLIQ (DIGENE). Após a confecção das lâminas, o material obtido para análise por citologia líquida foi conservado a 4° C para posterior extração do DNA viral.

A padronização das técnicas de confecção e coloração das lâminas de citologia de base líquida e convencional, assim como, as análises e os resultados destas foram realizados segundo a Classificação de Bethesda e revisados cegamente por dois citopatologistas do Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Sendo considerados como exames citológicos positivos para alterações sugestivas de efeito citopático compatível com HPV aqueles observados pelos dois observadores em ambas as técnicas.

4.3. COLORAÇÃO E EMISSÃO DE LAUDO

A técnica de coloração adotada foi a técnica de Papanicolau com os tempos de imersão sendo ajustados de forma a se conseguir os melhores resultados, conforme descrito abaixo:

1. Álcool (3 a 5 minutos)
2. Água destilada (5 segundos)
3. Hematoxilina (5 minutos)
4. Lavar com água corrente (aproximadamente 5 segundos)
5. Álcool 95% (5 segundos)
6. Ácido acéticoal glacial (5 segundos);
7. Ácido fosfotungsticico (5 segundos);
8. Orange G (2,5 minutos)
9. Álcool 95% (5 segundos)
10. Eosina (3,5 minutos)
11. Álcool 95% (5 segundos)
12. Álcool Absoluto (5 segundos)
13. Xilol (5 minutos)

Os tempos de imersão de lâmina expressos em segundos podem ser substituídos por mergulhos consecutivos, com agitação, nas respectivas soluções. Em seguida, estas lâminas foram montadas com lamínulas Entelan (Merk), para melhor conservação do material. A leitura foi triada cegamente e seus resultados expressados segundo a Classificação Internacional de Bethesda. Neste método são

considerados positivos os exames alterados na primeira ou na segunda revisão citológica, sendo classificados com alterações de pré-malignidade os casos em que as células não apresentaram nenhuma alteração e os inflamatórios.

4.4. EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL E IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS 16 E 18

A partir de células contidas no material de coleta para análise de citologia de base líquida, o DNA viral foi extraído utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A identificação dos genótipos 16 e 18 do HPV foi feita por PCR em tempo real empregando o sistema TaqMan[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA) tendo como alvo o gene E1 do HPV. As reações de genotipagem foram preparadas utilizando iniciadores (PF16, PR16, PF18 e PR18) e sondas específicas (PB16 e PB18) para os genótipos 16 e 18 do HPV (Tabela 3) e o conjunto de reagentes do kit comercial TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), contendo nucleotídeos, tampão, UNG, AmpliTaq[®], referência passiva (ROX), de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação foi composta por 15 µL de Master Mix, 10,5 µL de água, 1,5 µL de conjunto de iniciadores e sonda para cada genótipo (assay-by-design) e 3µL de DNA. A reação foi realizada na plataforma ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA), com o seguinte protocolo de ciclagem: um ciclo de 50°C por 2 minutos; um ciclo de 95°C durante 10 minutos; 50 ciclos de 90°C durante 50 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Tabela 3 – Seqüências nucleotídicas de iniciadores e sondas utilizadas para identificar os genótipos 16 e 18 do HPV.

Iniciadores/Sondas*	Seqüências nucleotídicas (5'→3')
PF16	GCCTACGATAATGACATAGTAGACGATAG
PR16	ACAATCCTTTACAATTTTTGCCTGTGAA
PF18	TGTCAGAAATGGTACAATGGGCATT
PR18	TGTTGCTGTCTGCTAATAAGGCATA
PB16*	FAM-CAATTGGCAGACACTAATAG-TAMRA
PB18*	FAM- GATATGGCATTGGAATATG –TAMRA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados citológicos e moleculares da infecção pelo HPV foram agrupados e analisados no programa BioEstat versão 5.0 (Ayres *et al* 2005), utilizando o teste exato de Fisher e o "Screening Test" visando determinar a especificidade/sensibilidade dos métodos. Por fim, neste estudo foi considerado significativo valor de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A CITOLOGIA CONVENCIONAL (EXAME DE PAPANICOLAU) E A CITOLOGIA DE BASE LÍQUIDA.

Neste estudo, como já mencionado, foram realizadas duas coletas de material cérvico-vaginais, consecutivas e imediatas de cada paciente permitindo a utilização das duas metodologias para análise dos esfregaços.

Como resultado prático destas coletas observou-se como vantagem da utilização do método de citologia de base líquida que todo o material coletado foi conservado e fixado imediatamente após este procedimento, a partir da introdução da escova ginecológica no líquido fixador do quite, e não distribuído, “em parte”, diretamente em lâmina como na citologia convencional.

O método de citologia de base líquida, além de simplificar a coleta, diminuiu a presença de interferentes citológicos em lâmina, como o excesso de bactérias, hemácias, leucócitos, muco, ou de aglomerados celulares; além de permitir a visualização individual das células escamosas (normais, com alterações pré-malignas e malignas), e a conservação de todo o material celular coletado para futuras análises, como PCR para o HPV e/ou repetições.

Como intercorrentes da metodologia de citologia líquida, em nossa opinião, estão: (1) as dimensões da escova endocervical que acompanha o quite Universal Collection Medium (UCM), fornecida pelo fabricante, que apresenta uma base muito larga, em comparação com a escova ginecológica tradicional, impedindo a sua introdução, em mais de 2 cm, no canal do colo do útero. Desta forma, há risco de não obtenção de células de lesões pré-malignas e malignas mais profundas no canal do colo útero; e (2) o fato de que esta metodologia exige que o observador esteja bem treinado e familiarizado com as alterações celulares observadas em lâmina, como as células endocervicais e metaplásicas que tendem a ser vistas isoladas, de tamanho menor e de aspecto mais redondo em comparação com estes tipos celulares observados na citologia convencional: a flora coco bacilar que é

observada quase exclusivamente sobre o citoplasma das células escamosas (sendo menos evidente o habitual fundo "arenoso" dos esfregaços de vaginose bacterianas); e os *Trichomonas vaginalis* que são menores e menos visíveis em comparação com o observado na citologia convencional.

6.2. RESULTADOS CITOLÓGICOS

Os resultados de análise citológica, pelos métodos de citologia convencional e citologia de base líquida, mostraram grau de similaridade de 97%, dos quais se observou, conforme já amplamente descrito na literatura, maior incidência de processos inflamatórios (40/50) em detrimento aos casos de citologia normal (08/50), alterações escamosas de significado indeterminado (ASC) ou pré-malignas associadas a processos inflamatórios (05/40) ou ao HPV (02/50).

Dentre os agentes biológicos mais freqüentes (24/50) associados a processos inflamatórios foram encontrados a *Gardnerella vaginalis* (10/40) e os Bacilos curtos (14/40), principalmente em mulheres com idade entre 20 e 37 anos (14/24) (Tabela 4), de atividades domésticas e rurais (lavradoras) (12/24) (Tabela 5), com escolaridade até o 1º grau completo (11/24) (Tabela 6).

TABELA 4 – Resultados de PCCU associados à Faixa Etária das mulheres atendidas neste projeto.

	Norm	GV	Cand	TV	Bacilos Curtos	Inflam. Inesp	Cocos	TV+GV	Cand+GV	HPV	Total
<20	01	02	00	00	01	00	00	00	00	00	04
20-25	01	03	01	01	02	00	01	01	00	02	12
26-31	01	03	01	01	03	00	01	00	00	00	10
32-37	03	01	00	01	02	01	00	01	01	00	10
38-43	01	00	00	00	03	01	00	00	00	00	05
44-49	01	00	00	00	01	01	00	00	01	00	04
>50	00	01	00	00	02	00	02	00	00	00	05
Total	08	10	02	03	14	03	04	02	02	02	50

Legenda: Norm – Citologia normal; GV – *Gardnerella vaginalis*; Cand – *Candida* sp.; TV – *Trichomonas vaginalis*; Inflam. Inesp. - Citologia Inflamatória Inespecífica; TV+GV – T. vaginalis associada a G. vaginalis; Cand+GV – *Candida* sp. associada a G. vaginalis; HPV – efeito citopático compatível com HPV.

TABELA 5 – Resultados de PCCU associados ao Tipo de Ocupação das mulheres atendidas neste projeto.

	Norm	GV	Cand	TV	Bacilos Curtos	Inflam Inesp	Cocos	TV+GV	Cand+ GV	HPV	TOTAL
Domestica	03	02	00	02	05	00	03	01	02	00	18
Lavradora	00	04	00	01	01	00	00	00	00	00	06
Comerciaría	00	00	00	00	00	00	00	01	00	00	01
Professora	01	00	01	00	02	01	00	00	00	00	05
Agente Administrativo	02	01	01	00	02	02	00	00	00	00	08
Secretária	00	00	00	00	01	00	00	00	00	00	01
Artista Plástico	00	00	00	00	01	00	01	00	00	00	02
Estudante	02	03	00	00	02	00	00	00	00	02	09
TOTAL	08	10	02	03	14	03	04	02	02	02	50

Legenda: Norm – Citologia normal; GV – Gardnerella vaginalis; Cand – Candida sp.; TV – Trichomonas vaginalis; Inflam. Inesp. - Citologia Inflamatória Inespecífica; TV+GV – T. vaginalis associado a G. vaginalis; Cand+GV – Candida sp. associado a G. vaginalis; HPV – efeito citopático compatível com HPV.

TABELA 6 – Resultados de PCCU associada ao Grau de Escolaridade das mulheres atendidas neste projeto.

	Norm	GV	Cand	TV	Bacilos curtos	Inflam. Inesp	Cocos	TV+GV	Cand+ GV	HPV	TOTAL
1º grau incompleto	02	03	01	03	04	00	03	02	02	00	20
1º grau completo	01	03	00	00	01	01	00	00	00	00	06
2º grau incompleto	00	00	00	00	00	00	01	00	00	00	01
2º grau completo	03	04	01	00	08	01	00	00	00	02	19
3º Grau	02	00	00	00	01	01	00	00	00	00	04
TOTAL	08	10	02	03	14	03	04	02	02	02	50

Legenda: Norm – Citologia normal; GV – Gardnerella vaginalis; Cand – Candida sp.; TV – Trichomonas vaginalis; Inflam. Inesp. - Citologia Inflamatória Inespecífica; TV+GV – T. vaginalis associado a G. vaginalis; Cand+GV – Candida sp. associado a G. vaginalis; HPV – efeito citopático compatível com HPV.

6.3. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E MOLECULAR

Em relação à identificação e ao diagnóstico citológico e molecular (PCR) da presença dos tipos 16 e 18 do HPV, de alto risco, nas voluntárias deste estudo, observou-se que citologicamente o efeito citopático compatível com HPV (02/50) não foi o principal achado nos métodos de citologia de base líquida e citologia convencional. Por outro lado, o diagnóstico molecular por PCR para HPV dos tipos 16 e 18 foi um achado importante (05/50) em relação ao total de mulheres atendidas.

A presença de PCR positivo para HPV dos genótipos 16 (04/05) e 16/18 (01/05) esteve, em alguns casos, associado a mulheres que apresentavam lesões celulares escamosas de significado indeterminado (ASC-US) (02/05) e pré-malignas do tipo neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I) (02/05), porém, sem diagnóstico citológico sugestivo de efeito citopático compatível com HPV. Em apenas um caso o achado citológico foi compatível com o diagnóstico de PCR positivo para HPV do tipo 16 (Tabela 7).

Em relação aos aspectos epidemiológicos associados às mulheres que apresentaram PCR positivo para os tipos 16 ou 16/18 de HPV, estas tinham em média 27,4 anos de idade, início da vida sexual em torno dos 17 anos, escolaridade compatível com 2º grau completo e tipo de ocupação principal - estudante. Frequentemente associada a outras infecções ginecológicas (DST), como a associação do HPV do tipo 16 com a *G. vaginalis* (01/05) ou da *G. vaginalis* e o *T. vaginalis* mais a co-infecção dos tipos 16 e 18 do HPV ao mesmo tempo (01/05).

Os casos citológicos falso-negativos para a evidência de efeito citopático compatível com HPV aqui observados, segundo o "Screening Test" e o Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$) com PCR positivo (HPV detectado), nos permitem dizer que a evidência de efeito citopático compatível com HPV (Teste Exato de Fisher - $p = 0,1075$) não é um dado que representa especificidade e/ou mesmo sensibilidade para os métodos de Citologia Convencional (Exame de Papanicolau) ou de Citologia de Base Líquida em relação ao PCR para os tipos 16 e 18 do HPV.

A observação, entretanto, de alterações citológicas celulares escamosas de significado indeterminado (ASC-US) ou pré-malignas, do tipo neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I) (Teste Exato de Fisher - $p=0,0166$), nos permite dizer que a observação destes achados representam um alerta para a possível infecção da paciente pelos tipos 16 e 18 do HPV, mesmo sem a evidência de efeito citopático compatível com HPV na Citologia Convencional (Exame de Papanicolau) ou Citologia de Base Líquida.

TABELA 7 – Diagnóstico molecular e genotipagem do HPV associado à presença de citologia característica de lesões celulares limítrofes e pré-malignas com ou sem associação ao efeito citopático compatível com HPV.

AGENTES	ALTERAÇÃO CITOLOGIA	PCR (genótipo)	Escolaridade	Ocupação
Bacilos Curtos	ASC-H	Negativo	1º Grau completo	Comércio
Bacilos Curtos	NIC I	Positivo (16)	2º Grau completo	Estudante
Bacilos Curtos HPV	NIC I	Positivo (16)	2º Grau completo	Estudante
Bacilos Curtos	ASC-US	Positivo (16)	2º Grau completo	Estudante
<i>G. vaginalis</i>	NIC I	Positivo (16)	2º Grau completo	Estudante
<i>T. vaginalis</i> + HPV	NIC I	Negativo	2º Grau completo	Estudante
<i>T. vaginalis</i> + <i>G. vaginalis</i>	ASC-US	Positivo (16/18)	1º Grau completo	Comércio

Legenda: PCR – Reação em cadeia Polimerase; NIC I – Neoplasia Intraepitelial Cervical (Displasia Leve / Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau); ASC-US (Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado); HPV – Efeito Citopático compatível com HPV; HPV 16 – Papiloma Vírus do Sorotipo 16; HPV 16/18 – Papiloma Vírus dos Sorotipos 16 e 18 ao mesmo tempo.

7. DISCUSSÃO

O uso da citologia de base líquida tem demonstrado uma série de vantagens em relação à citologia convencional, tais como a redução da área a ser analisada, do tempo de screening de cada amostra e dos interferentes de interpretação como ressecamento da amostra, excesso de muco, hemácias, leucócitos, restos celulares e agentes infecciosos, o que proporciona conseqüente melhor visualização e segurança na identificação de células atípicas, pré-malignas ou malignas, quando presentes no esfregaço (Michalas, 2001, Stoler, M H, 2000).

De forma semelhante, estas vantagens também foram observadas em nossos estudos, contudo, no nosso entendimento, esta metodologia, embora já conhecida teoricamente por muitos, ainda carece de maior divulgação para profissionais de saúde, visto que a execução do diagnóstico citológico por esta exige a presença de observador bem treinado e familiarizado com as modificações celulares observadas neste tipo de esfregaço, tanto no tocante às células, quanto em relação à visualização dos agentes infecciosos, em comparação com o observado na citologia convencional.

Em relação à identificação e ao diagnóstico citológico e molecular (PCR) para a presença dos tipos 16 e 18 do HPV, nas voluntárias deste estudo, observou-se que citologicamente o efeito citopático compatível com HPV (02/50) não foi o principal achado nos métodos citológicos utilizados (de base líquida e citologia convencional), dados que não diferem da literatura (FRANCO *et al.*, 2001; CASTLE *et al.*, 2002; NORONHA *et al.*, 2005; COUtlÉE *et al.*, 2005).

Do total de casos, foram observadas ocorrências de HPV dos tipos 16 e 18 em 10% das mulheres atendidas, por meio do diagnóstico molecular (PCR). Destes, alguns casos estavam associados a mulheres que apresentavam lesões celulares escamosas de significado indeterminado (ASC-US) (02/05) e pré-malignas do tipo neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I) (02/05), sem diagnóstico citológico sugestivo de efeito citopático compatível com HPV. Isto se mostrou um achado importante e de alerta sobre a necessidade de investigação molecular deste agente em pacientes sem estas alterações citológicas.

Marais *et al.* (2008) estudaram populações de mulheres da África do Sul e constataram que 20,4% das amostras coletadas eram de mulheres que apresentaram diagnóstico citológico normal e resultado positivo para detecção do HPV. Seus resultados mostraram ainda que a prevalência da infecção por HPV era diretamente proporcional à severidade das anormalidades citológicas, de forma que o HPV foi encontrado em 42,7% das amostras com ASC-US, em 70% dos casos de LSIL e em 75,8% das mulheres com HSIL.

Estudos como este justificam a manutenção das campanhas gratuitas de prevenção do câncer de colo do útero como uma medida preventiva importante no combate desta doença, principalmente no Estado do Pará onde, provavelmente, o perfil epidemiológico dessa doença está associado às grandes distâncias que as mulheres de comunidades ribeirinhas têm que percorrer para realizar este exame de forma gratuita; ao tipo de atividade econômica da região; ao preconceito local ainda existente com o exame; e ao grau de dificuldade de implementação de ações efetivas de retorno das pacientes às consultas médicas após a obtenção do resultado do exame e mesmo o encaminhamento para diagnóstico molecular dos casos positivos para lesões do tipo ASC-H e NIC I, II e III.

Estes dados impactam diretamente sobre as estimativas do INCA para 2010 que é de 40,97 a cada 100 mil mulheres novos casos de câncer do colo uterino esperados para o Brasil e de 20,82 novos casos para cada 100 mil mulheres só no Estado do Pará (INCA, 2010).

Como já descrito na literatura, o risco de infecção por HPV e de desenvolvimento de Câncer de Colo do Útero aumenta se associada a diversos fatores epidemiológicos como o número de parceiros sexuais, associação com outras Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), exposições repetidas a vários subtipos do vírus, tabagismo, início precoce da vida sexual, uso crônico de anticoncepcionais orais e o tipo de resposta imunológica à infecção (STRICKLER *et al.*, 2003; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003; COUPLÉE *et al.*, 2005). Assim, neste estudo nós buscamos verificar, dentro da nossa casuística, quais eram estas possíveis associações epidemiológicas com a incidência de HPV.

Nossa observação a cerca da relação entre os aspectos epidemiológicos e as mulheres que apresentaram PCR positivo para os tipos 16 ou 16/18 de HPV mostrou certa concordância com dados da literatura de modo que, em nossos estudos, a maioria das mulheres eram adultas-jovens (27,4 anos de idade em média), com início da vida sexual em torno dos 17 anos, escolaridade compatível com 2º grau completo e exame de Papanicolau freqüentemente associado a lesões celulares precoces tais como alterações celulares escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I), mesmo quando da ausência de efeito citopático compatível com HPV.

Wentzensen et al. (2009) estudaram o grau de severidade da neoplasia cervical baseando-se na combinação de testes histopatológicos, citopatológicos e distribuição do genótipos de HPV em uma amostra de 1700 mulheres. Dentre seus achados, destaca-se a inespecificidade dos testes citológicos para identificação da presença do HPV e do estágio da lesão. Além das ocorrências de HPV identificadas por meio de PCR em amostras que não apresentaram efeito citopático, 45% dos casos de neoplasia intraepitelial cervical de grau II e 21% dos casos de neoplasia intraepitelial cervical de grau III foram caracterizados como HSIL, pela análise citológica. Os pesquisadores concluíram pela importância da associação dos testes histopatológicos, citológicos e de detecção de DNA viral para a correta classificação e diagnóstico da doença e aplicação do tratamento adequado.

Nos resultados deste estudo a observação da presença de outros agentes infecciosos, em especial a *G. vaginalis* e o *T. Vaginalis*, também associados a mulheres que apresentavam PCR positivo para os tipos 16 ou 16/18 de HPV, mas sem efeito citopático compatível com HPV no exame de Papanicolau, foi outro achado importante que corrobora com a literatura em relação ao aumento da incidência de infecções pelo HPV em mulheres co-infectadas com outras DST.

Estudos realizados em mulheres portadoras do vírus HIV mostraram que a ocorrência do HPV é maior em mulheres soropositivas em todos os grupos de idade. Dentre os casos estudados, a prevalência do HPV foi mais expressiva no grupo de mulheres soropositivas com idades entre 25-46 anos. Entre as mulheres infectadas pelo HIV, 69% apresentaram mais de um tipo de HPV, sendo que 46%

para um tipo de HPV carcinogênico e 10% para o HPV 16. Além disso, foi possível observar uma relação proporcional entre a severidade das alterações citológicas e a baixa contagem de células T CD4+ (SINGH *et al.*, 2009).

Murta *et al* (2001) em seus estudos observaram que a presença de co-infecções genitais, transmitidas sexualmente ou não, pode ser um fator importante e facilitador para a proliferação celular associada ao HPV, possivelmente por aumentar a umidade no meio vaginal.

Discacciati *et al* (2004) em seus estudos também observaram que a frequência de anormalidades citológicas cervicais associadas ao HPV após a conização é maior em pacientes com vaginose bacteriana anteriores à conização, em comparação com as mulheres sem vaginose bacteriana.

Nonnenmachera *et al* (2002), por sua vez, observaram que, semelhante aos nossos resultados, e diferente da maioria dos trabalhos já publicados em relação ao nível de escolaridade, a maior positividade associada à infecção pelo HPV estava associada a mulheres com maior tempo de escolaridade, quando comparadas às de menor tempo de escolaridade.

Nossos dados estatísticos, "Screening Test" e o Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$), para avaliar a relação da presença de PCR positivo (HPV detectado) com a evidência de efeito citopático compatível com HPV no exame de Papanicolau, mostraram que a presença de efeito citopático compatível com HPV não é um achado que represente especificidade e/ou mesmo sensibilidade aos métodos de Citologia Convencional (Exame de Papanicolau) ou de Citologia de Base Líquida. Mostraram também que a observação de alterações citológicas celulares escamosas de significado indeterminado (ASC-US) ou pré-malignas do tipo neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I) são achados que representam um alerta vermelho para possível infecção pelos tipos 16 e 18 do HPV, mesmo sem a evidência citológica.

Brenna & Syrjänen (2003) em sua revisão sobre o assunto definem como bem estabelecido que a infecção pelo HPV é o principal fator responsável pelo

desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e de carcinoma invasor do colo uterino. Definindo assim que o DNA do HPV é detectado em praticamente 93% dos casos de carcinomas cervicais e lesões precursoras e conferindo risco relativo em torno de 20% para o desenvolvimento desta doença.

Estudos realizados pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) através de inquérito, envolvendo 22 países, para determinar a prevalência dos tipos de HPV em 1000 casos de carcinomas invasores do colo uterino, demonstraram que o HPV foi detectado em 99,7% destes, com os sorotipos mais prevalentes tendo sido HPV 16 (53%), HPV 18 (15%), HPV 45 (9%), HPV 31 (6%) e HPV 33 (3%) (NIH, 1996).

Eltabbakh et al (2000) em seus estudos demonstraram uma associação entre presença de displasia cervical à histologia, em mulheres portadoras de ASC-US, e a história de infecção pelo HPV.

Daly et al (1998), na Irlanda, também descreveram que as mulheres com alterações menores (ASC-US ou LGSIL) na citologia e que fumavam mais de 20 cigarros por dia, tinham um risco de 5,85 (IC 95% 1,92-17,80) de apresentar NIC II ou NIC III à histologia, em comparação com as não fumantes. Além disso, outros estudos têm mostrado que, comparado a mulheres que nunca fumaram, as fumantes tem um aumento significativo no risco de desenvolver carcinoma *in situ* e câncer cervical. Esse risco aumentou com o número de cigarros fumados diariamente e com a diminuição da idade de iniciação do uso de cigarro (Collins et al., 2010)

Lee et al (2001), na Coreia do Sul, descreveram a relação entre a presença de HPV de alto risco e os achados histológicos cervicais de 59 mulheres com ASC-US na citologia, tendo sido observadas alterações neoplásicas em 88,2% daquelas infectadas por HPV de alto risco e em 50,0% daquelas não infectadas. Diante destes dados, estes autores recomendam a utilização de exames moleculares para detecção do HPV para selecionar as mulheres com maior risco de apresentar lesão intra-epitelial cervical, pois, segundo o resultado dos seus estudos, 26,3% das mulheres com ASC-US tinham HPV de alto risco oncogênico, e eram

estas que possuíam maior probabilidade de ter neoplasia cervical. Dados semelhantes aos observados em nossos estudos.

8. CONCLUSÕES

Este estudo nos permitiu verificar a citologia de base líquida apresenta vantagens sobre a citologia convencional (Exame de Papanicolau) naquilo que se refere à rapidez e eficiência na execução dos procedimentos.

Quanto à detecção específica (PCR) da presença dos sorotipos 16 e 18 do HPV foi observado que não está diretamente relacionada à presença do efeito citopático compatível com HPV, o que ressaltou a importância da utilização de exames moleculares no diagnóstico para este vírus principalmente em pacientes que apresentam lesões do tipo ASC-H e NIC I, II e III.

A observação a cerca dos dados sócio-epidemiológicos mostrou que a presença dos sorotipos 16 e 18 foi mais freqüente em mulheres com 27,4 anos de idade em média; com maior escolaridade; que exercem atividades domésticas e rurais; e com ocorrência de co-infecção por agentes infecciosos causadores de outras doenças sexualmente transmissíveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, S., *et al.* Type distribution, viral load and integration status of high risk human Papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer.* 91:2195-200, 2005.

ALCHORNE, M.M. A.; ALCHORNE, A.O.A.: *Doenças tegumentares dos genitais.* São Paulo: 2. ed. 1998.

BRENNAN, S.M.F & SYRJANEN, K.J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Sao Paulo Med J* 2003; 121(3):128-132.

CAMARA, G.N.N, *et al.* Os papilomavírus humanos – HPV: Carcinogênese e imunogênese. *Universitas Ciências da Saúde*, 01: 159-168, 2003.

CASTLE, P., *et al.* Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative woman. *Cancer*, 95: 2145-51, 2002.

COLLINS, S., *et al.* Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *Eur J Cancer.*, 46(2): 405–411, 2010.

COUPLÉE, F., *et al.* The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*, 16 (2): 83-91, 2005.

CHENG, Y. W., *et al.* Human Papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res.*, 15; 67(22): 10686-93, 2007.

DALY, S.F.; DOYLE, M.; ENGLISH, J.; TURNER, M.; CLINCH, J. & PRENDIVILLE, W. Can the number of cigarettes smoked predict high-grade cervical intraepithelial

neoplasia among women with mildly abnormal cervical smears? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 179:399-402.

DISCACCIATI, M.G.; RABELO-SANTOS, S.H.; CAMPOS, E.A.; SIMÕES, J.A.; DERCHAIN, S.F.M.; SARIAN, L.O.Z. e ZEFERINO, L.C. Vaginose Bacteriana e DNA de Papilomavírus Humano de Alto Risco Oncogênico em Mulheres Submetidas a Conização com Alça Diatérmica para Tratamento de Neoplasia Intra-epitelial Cervical de Alto Grau. *RBGO* - v. 26, nº 9, 2004.

ELTABBAKH, G.H.; LIPMAN, J.N.; MOUNT, S.L. & MORGAN A. Significance of atypical squamous cells of undetermined significance on ThinPrep Papanicolaou smears. *Gynecologic Oncology*, 79:44-49, 2000.

FEHRMANN, F. *et al.* Human *Papillomavirus* Type 31 *E5* Protein Supports Cell Cycle Progression and Activates Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation. *Journal of Virology*, 77: 2819-2831, 2003.

FERENCZY, A. Viral testing for genital HPV Infections progress, *J. Natl Cancer Institute*. USA, 1992. 81: p.1.688-1.999.

FRANCO, E., *et al.* Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, 164 (7): 1017-1025, 2001

GAYA, B., *et al.* Condiloma acuminado bucal em pacientes soropositivo para o HIV. *Rio de Janeiro*, 71 (1): 19-25, 1996.

GOLDIE, S.; *et al.* A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV-16/18 vaccine. *INT: J: Cancer*, 106: 896–904, 2003

GOMPEL, C. ; KOSS, L, *et al.* *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. São Paulo: Manole, 1997. p. 80 – 105.

HEBNER, C., *et al.* Human Papillomavirus E6 proteins mediate resistance to interferon-induced growth arrest through inhibition of p53 acetylation. *J Virol*, 81(23): 12740-7, 2007.

HOU, S, *et al.* Transcriptional Activity among High and Low Risk Human *Papillomavirus* E2 Proteins Correlates with E2 DNA Binding. *J Biol Chem*, 277: 45619-45629, 2002.

HUBERT, W G; LAIMINS, L A. Human Papillovirus Type 31 Replication Modes during the Early Phases of Viral Life Cycle Depend on Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of E1 and E2 Expression. *Journal of Virology*, 76: 2263-2273, 2002.

INCA – *Câncer do colo do útero*. Disponível em <
<http://www.inca.gov.br/cancer/utero/estimativa/>. Acesso em janeiro, 2008.

INCIDÊNCIA e Mortalidade de HPV e Câncer no Brasil. Disponível em
<http://www.inca.gov.br>. Acesso em janeiro, 2008.

KANESHIMA, E N; *et al.* Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de *Papillomavirus* humano (HPV) previamente detectado por PCR. *RBAC*, vol. 35(1): 29-33, 2003.

LEE, D, *et al.* Human *Papillomavirus* E2 Down-regulates the Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter. *J BIO CHEM*, 277: 27748-27756, 2002.

LEE, S.J.; *et al.* Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *Journal of Immunology*, 167: 497-504, 2001.

MANSUR, C.P. Molecular mechanisms of HPV-associated oncogenesis. *In* STERLING J.C. & TYING, S.K. (org.) *Human papillomaviruses – clinical and scientific advances*, Londres, Arnold, 2001.

MARAIS, D.J., *et al.* Cervical Human Papillomavirus (HPV) Infection and HPV Type 16 Antibodies in South African Women. *Journal of clinical microbiology*, 46: 732-739, 2008.

MIZIARA, E.F. Sistema de Bethesda 2001. Publicado no Portal da SBPTGIC, disponível e tendendo/atual: <http://www.colposcopy.org.br/> acessado em janeiro, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2000. <http://www.inca.gov.br/>. Acessado em janeiro, 2008.

MS/INCA. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acessado em janeiro, 2008.

MS/PORTAL DA SAÚDE. Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acessado em janeiro, 2006.

MURTA, E.F.C.; *et al* E. Infecção pelo Papilomavírus Humano em Adolescentes: Relação com o Método Anticoncepcional, Gravidez, Fumo e Achados Citológicos. *RBGO* - v. 23, nº 4, 2001.

NAKAHARA, T, *et al.* Modulation of the Cell Division Cycle by Human *Papillomavirus* Type 18 *E4*. *Journal of Virology*, 76: 10914-10920, 2002.

NIH (National Institute of Health). Consensus Development. Conference statement on cervical cancer. *Gynecology Oncology*, 66: 351-361, 1996.

NONNENMACHERA, B; *et al.* Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saúde Pública*; 36(1):95-100, 2002.

NORONHA *et al.* Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres com citologia oncológica dentro dos limites da normalidade. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 17(1): 49-55, 2005.

NOWAK, Z.; KAROWICZ-BILIŃSKA, A. Human papilloma virus infection in pregnant women with normal pap-smears, HPV oncogenity and risk factors. *Ginekol Pol.*, 78(9): 678-84, 2007.

OKADA MMK, *et al.* Epidemiologia e patogênese do papilomavirus humano. I Consenso Brasileiro de HPV. On line. Ed.; Versão para Word 7.0. Disponível na World Wide Web:<> 07/07/2005.

OZBUN, M. Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. *Journal of General Virology*, 83: 2753-2763, 2002.

PAPILOMAVÍRUS humano. Disponível em: <<http://www.uronews.com.br>>. Acesso em jun 2005.

PARK, R B; ANDROPHY, E J. Genetic Analysis of Human-Risk E6 in Epissomal Maintenance of Human Papillomavirus Genomes in Primary Human Keratinocytes. *Journal Of Virology*, 76: 11359-11364, 2002.

PARKIN, D M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118:3030–44, 2006.

SCHIFFMAN, M.H. & BURK, R.D. Human papillomaviruses *In* EVANS, A.S.; KASLOW, R.A. *Viral infections of humans. Epidemiology and control*. 4a ed. Nova Iorque: Plenum Medical Book Company, 1997.

SCHIFFMAN, M; CASTLE, F. Human Papillomavirus Epidemiology and Public Health. *Arch Pathol Lab Med*, 127: 930-934, 2003.

SCHNEIDER, A., *et al.* Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV DNA hybridization studies. *Diagn Cytopathol* 1987; 3:250-5

SILVA, H. A.; *et al.* Papilomavírus humano e lesões intra-epiteliais cervicais: estudo colpocitológico retrospectivo. RBAC, vol. 35(3): 117-121, 2003.

SINGH, D K; *et al.* Human Papillomavirus Infection and Cervical Cytology in HIV Infected and HIV-Uninfected Rwandan Women. J Infect Dis., 199(12): 1851, 2009.

STRICKLER, H., *et al.* Human Papillomavirus Type 16 and Immune Status in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women. Journal of the National Cancer Institute, 95: 1062-1071, 2003.

RAMA, C. H. *et al.* Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical câncer. Rev Saúde Pública, 42(1), 2008.

ROMBALDI, R. L. *et al.* Transplacental transmission of Human Papillomavirus. Virology Journal, 5: 106, 2008.

TERHUNE, S., *et al.* Early Polyadenylation Signals of Human Papillomavirus Type 31 Negatively Regulate Capsid Gene Expression. Journal of Virology, 75: 8147-8157, 2001.

VAN DER GRAAF, *et al.* Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. Im J. Epidemiol, 156:158-64, 2002.

VERSALOVIC, J; LUPSKI, JR. Detecção molecular e genotipagem de patógenos: Respostas mais rápidas e precisas. Trends in Microbiology, 10: 10, 2007.

VILLA, LL. Papilomavírus Humano e câncer de colo de útero, 1977. Disponível em <<http://www.hcanc.org.br>>. Acesso em dez, 2005, p.02 – 18.

WAGNER, E.; HEWLETT, M. Basic Virology, 2nd edition. Blackwell Science Inc, Massachusetts, USA, 2003.

WAKABAYASHI, M. T., *et al.* Indications and Efficacy of Human Papillomavirus Vaccine. Current Treatment Options in Oncology, 330:1534-6277, 2008.

WENTZENSEN, N., *et al.* Grading the severity of cervical neoplasia based on combined histopathology, cytopathology, and HPV genotype distribution among 1700 women referred to colposcopy in Oklahoma. *Int J Cancer*. February 15; 124(4): 964–969, 2009.

WU, Y., *et al.* Associations of high risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol.*,35:264-9, 2006.

WU, T. C., *et al.* Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. *J Formos Med Assoc*, 107: 198-217, 2008.