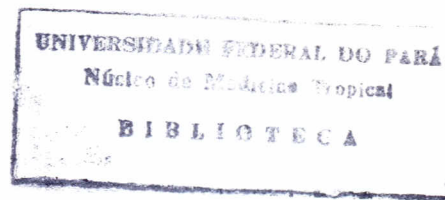


Vânia Lúcia Noronha Cavalcante

**Papilomavírus Humano  
Associado a Lesões de  
Cérvix Uterina**

Belém  
1997

Vânia Lúcia Noronha Cavalcante



PAPILOMAVÍRUS HUMANO ASSOCIADO A LESÕES DE CÉRVIX UTERINA

Belém

1997

579.2445  
e 376p  
DIS

VÂNIA LÚCIA NORONHA CAVALCANTE

PAPILOMAVÍRUS HUMANO ASSOCIADO A LESÕES DE CÉRVIX UTERINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, com a colaboração do Instituto Evandro Chagas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador:

Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito

Co-orientadores:

Dr. Alexandre da Costa Linhares

Dr.<sup>a</sup> Luísa Lina Villa

Dr. Wyller Alencar Mello

Belém

1997

579.2445  
e376p  
DIS

Ficha catalográfica preparada por Nazária Higashi, bibliotecária do Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde.

Cavalcante, V.L.N.

Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. Belém, 1997.

99p.

Dissertação (Mestrado)

1.Papilomavírus humano-prevalência 2.Cérvix uterina-lesões I. Título

CDD 576.648. 4  
614.599. 9  
616.994. 66

CLASS. 616.99466  
CUTTER C376p  
TOMBO 06 23/3/99

PAPILIMAVÍRUS HUMANO ASSOCIADO A LESÕES DE CÉRVIX UTERINA.

VÂNIA LÚCIA NORONHA CAVALCANTE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, com a colaboração do Instituto Evandro Chagas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical.

Banca Examinadora:

- Dr.<sup>a</sup> Amélia Paes de Andrade Travassos da Rosa  
Virologista. Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.
- Prof. Dr. Edison Reis Lopes  
Patologista. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais.
- Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ermelinda do Rosário Moutinho da Cruz  
Patologista. Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

Data: 09/12/1997

Conceito: EXCELENTE

Belém  
1997

*Se eu enxerguei mais longe, foi  
porque subi em ombros de  
gigantes.*

Isaac Newton.

Ao meu inesquecível pai, Dilermando, que com inteligência e afeto incentivou-me, desde tenra idade, a trilhar pelos “caminhos da Medicina”, acreditando sempre em minha capacidade para exercer essa nobre profissão.

À minha dedicada mãe, Emília, que como professora transmitiu-me desde cedo a importância do saber, por todo seu apoio e carinho.

Aos meus filhos: Rafael, Rodolfo e Renan, que com amor, alegria e extremas demonstrações de maturidade, constituem-se na razão maior de tudo que faço na vida.

Ao Mamed, meu marido e companheiro, que conheci quase menina, por toda nossa história.

Sem eles não seria o que sou.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Arival Brito, pelas suas valiosas considerações, assim como pela maneira amigável e extremamente simpática com que sempre me recebeu.

Aos Drs. Alexandre Linhares, Luísa Villa e Wyller Mello, não só pela imensurável contribuição nas diversas etapas deste trabalho, como também pela amizade, atenção e boa vontade que demonstraram ao longo desta caminhada.

Deixo aqui registrado o meu profundo respeito a esses profissionais.



Durante a realização deste estudo, envolvendo distintas áreas de atuação, contamos com o auxílio, estímulo e carinho de várias pessoas (e instituições), às quais externamos nossos mais sinceros agradecimentos:

Às pacientes, mulheres humildes, que contribuíram de forma anônima, para o desenvolvimento do conhecimento científico.

Ao Núcleo e ao Curso de Mestrado em Medicina Tropical, na figura da Dra. Ermelinda Moutinho da Cruz, pelo objetivo corajosamente alcançado.

Ao Instituto Evandro Chagas, representado por seu diretor, Dr. Jorge Travassos da Rosa.

Ao Dr. Alexandre Linhares, chefe do Serviço de Virologia Geral do Instituto Evandro Chagas e aos demais funcionários, colegas de trabalho, que de várias maneiras expressaram apoio e incentivo à realização desta pesquisa.

Ao Dr. Wyller Mello, responsável pelo laboratório de papilomavírus do Serviço de Virologia Geral do Instituto Evandro Chagas e a todos que, em algum momento, cooperaram com o "Projeto Papilomavírus".

Ao Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, representado pela Dra. Luísa Villa e demais funcionários do laboratório de papilomavírus.

Ao Serviço de Ginecologia do Instituto Ofir Loiola, especialmente às Dras. Fátima Bisi e Rozilda Mota, e ao Serviço de Patologia do Instituto Ofir Loiola, na figura do Dr. Roberto Macedo.

Aos Serviço de Patologia do Instituto Evandro Chagas, em especial ao Dr. Mário Moraes, à Dra. Vera Barros e ao Sr. Wálter Campos.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto Evandro Chagas, representados pela sra. Nazária Higashi, bem como à Sra. Vânia Araújo, bibliotecária do Instituto Ofir Loiola.

Ao prezado Dr. Manoel Ayres, sempre pronto para ajudar nas análises estatísticas, bem como ao sr. Alan Ayan e às Dras. Iracina Maura de Jesus e Rita Uchôa da Silva, pelas valiosas contribuições na área de informática, que se fizeram presentes em ocasiões decisivas.

À sra. Ivete Noronha Tavares, pelo auxílio com as dificuldades de nossa língua, e ao adolescente Rafael Noronha Cavalcante, um digno representante da "geração virtual", com quem sempre contei em momentos difíceis.

Aos colegas do Curso de Mestrado em Medicina Tropical, Ana Maria Ventura, Ana Yecê Pinto, Eliete Araújo, Érika Figueiredo, Judith Weirich, Nagib Abdon e Paulo Cartágenes, pelas sinceras demonstrações de amizade e companheirismo.

## SUMÁRIO

### LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### LISTA DE ABREVIACÕES

### RESUMO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 HISTÓRICO DO HPV.....	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	18
1.2.1. Da infecção pelo HPV .....	18
1.2.2. Do câncer de cérvix uterina .....	20
1.3 AGENTE VIRAL (HPV) .....	24
1.4 FISIOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR HPV .....	26
1.5 IMUNIDADE RELACIONADA AO HPV .....	28
1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR HPV.....	30
1.6.1 Clínico.....	30
1.6.2 Subclínico.....	30
1.6.3 Latente.....	31
1.6.4 Associado à neoplasia.....	31
1.7 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV.....	31
1.7.1 Citologia.....	32
1.7.2 Colposcopia.....	33
1.7.3 Histopatologia.....	34
1.7.4 Microscopia eletrônica.....	39

<b>1.7.5 Testes imunoquímicos</b> .....	39
<b>1.7.6 HIS</b> .....	40
<b>1.7.7 PCR</b> .....	41
<b>1.7.8 Hibridização por <i>dot-blot</i></b> .....	43
<b>1.8 TRATAMENTO DAS LESÕES ASSOCIADAS AO HPV</b> .....	43
<b>1.9 PROFILAXIA DO HPV E DO CÂNCER DE CÉRVIX UTERINA</b> .....	44
<b>1.10 JUSTIFICATIVA</b> .....	45
<b>1.11 OBJETIVOS</b> .....	46
<b>2 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	47
<b>2.1 POPULAÇÃO</b> .....	47
<b>2.2 COLETA DO MATERIAL</b> .....	47
<b>2.3 MÉTODOS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO</b> .....	48
<b>2.3.1 HIS</b> .....	48
2.3.1.1 Pré-tratamento.....	49
2.3.1.2 Hibridização.....	49
2.3.1.3 Detecção.....	50
<b>2.3.2 Isolamento do DNA tissular</b> .....	51
2.3.2.1 Extração.....	51
2.3.2.2 Precipitação.....	52
<b>2.3.3 PCR</b> .....	52
<b>2.3.4 Hibridização por <i>dot-blot</i></b> .....	54
<b>2.4 MÉTODOS ESTATÍSTICOS</b> .....	56
<b>3 RESULTADOS</b> .....	57

<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	79
<b>ABSTRACT</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81
<b>ANEXO 1</b> .....	98
<b>ANEXO 2</b> .....	99

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

p.

1-Tabela 1- Distribuição da idade (em anos) das pacientes, segundo os grupos estudados*, Belém, Pará, 1992-1996.....	57
2-Tabela 2- Prevalência de HPV em lesões de cérvix uterina, pelas técnicas de PCR e hibridização por <i>dot-blot</i> , segundo os grupos estudados*, Belém, Pará, 1992-1996.....	59
3-Tabela 3- Presença de HPV em lesões de cérvix uterina, pelas técnicas de PCR e hibridização por <i>dot-blot</i> , segundo os grupos estudados*, Belém, Pará, 1992-1996.....	60
4-Tabela 4- Prevalência de HPV pelas técnicas de PCR e HIS, em amostras de pacientes com lesões de cérvix uterina*, Belém, Pará, 1992-1996.....	63
5-Tabela 5- Idade (em anos) do 1ºcoito, nº de parceiros e nº de gestações, segundo os grupos estudados*, Belém, Pará, 1992-1996 .....	67
6-Tabela 6- Distribuição de fatores epidemiológicos de risco para lesões malignas em cérvix uterina, por grupos estudados*, Belém, Pará, 1992-1996 .....	68
7-Figura 1- Tipos prevalentes de HPV em 106 amostras do grupo A*, pela técnica de hibridização por <i>dot-blot</i> , Belém, Pará, 1992-1996 .....	61
8-Figura 2- Tipos prevalentes de HPV em 33 amostras do grupo B*, pela hibridização por <i>dot-blot</i> , Belém, Pará, 1992-1996.....	62

9-Figura 3- Fotomicrografia de tecido de carcinoma epidermóide invasivo de cérvix uterina, positivo para HPV, hibridizado <i>in situ</i> com sonda biotinilada correspondente aos HPVs tipo 16/18 (Digene Diagnosis Inc., Silver Spring, USA) X 600.....	64
10-Figura 4- Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA de HPV (obtidos de biópsia) amplificados por PCR.....	65
11-Figura 5- Autorradiograma representativo de filtros hibridizados por <i>dot-blot</i> com sondas genéricas marcadas radioativamente (superior) e sondas específicas para HPV 16 e 6+11, também marcadas com isótopo radioativo.....	66

## LISTA DE ABREVIações

- DNA: ácido desoxirribonucleico
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA: ensaio imunoenzimático
- HIS: hibridização *in situ*
- HPV: Papilomavírus humano
- IEC: Instituto Evandro Chagas
- IOL: Instituto Ofir Loiola
- MIX: mistura de reação
- mM: milimolar
- μM: micromolar
- NIC: Neoplasia intraepitelial cervical
- nm: nanômetro
- PCR: Reação em cadeia da polimerase
- PV: Papilomavírus
- PY: Poliomavírus
- rpm: rotação por minuto
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- SSC: solução citrato salina padrão
- TE: Tris EDTA
- ZT: zona de transformação



## RESUMO

Com a finalidade de contribuir para um melhor conhecimento do eventual papel do Papilomavírus humano (HPV) na etiopatogênese do câncer cervical na região norte do Brasil, estudou-se a prevalência do vírus em 228 mulheres portadoras de lesões de cérvix uterina, atendidas no Instituto Ofir Loiola (IOL), em Belém, Pará, no período de março de 1992 a maio de 1996. As pacientes foram submetidas à biópsia de colo uterino, sendo o material coletado encaminhado para histopatologia e pesquisa de HPV por diferentes técnicas laboratoriais. Para fins de análise, as participantes foram distribuídas em 3 grupos, de acordo com o diagnóstico histopatológico. O grupo A foi constituído de 155 mulheres com carcinoma epidermóide invasor ou adenocarcinoma, o grupo B de 54 portadoras de neoplasia intraepitelial cervical grau II ou III (NIC II e NIC III) e o C, de 19 pacientes com cervicite crônica. Pelas técnicas de PCR e hibridização por *dot-blot*, registraram-se prevalência de HPV em 70,3%, 63,0% e 36,8% das mulheres reunidas nos grupamentos A, B e C, respectivamente. O tipo de HPV predominante foi o 16, que representou 60,4% das amostras positivas do grupo A e 54,5% daquelas do grupo B. Os HPV tipo 16, 18 e 33 representaram 71,4% dos detectados no grupo C. Em 155 das 228 amostras testadas por PCR, realizou-se também a técnica de hibridização *in situ* (HIS) com sondas para detectar HPV 6/11, 16/18 e 31/33/35. A prevalência de HPV registrada por essa técnica foi de 17,4%, enquanto que por PCR observou-se, nas mesmas amostras, percentual positivo de 65,2%. No que diz respeito a outros fatores, também tidos como implicados no desenvolvimento de carcinomas e lesões precursoras em cérvix uterina, verificou-se que cerca de 40% das mulheres dos grupos A e B admitiram iniciação sexual precoce (com 15 anos ou menos). Entretanto, a grande maioria referiu de 1 a 3 parceiros, não caracterizando comportamento sexual promíscuo. Os dados aqui apresentados, a exemplo do que se registrou em outros estudos conduzidos em diversas áreas geográficas, sustentam a hipótese de que o HPV desempenha um importante papel na etiologia dos carcinomas de colo uterino e neoplasias intraepiteliais cervicais. Contudo, investigações adicionais e mais amplas devem ser realizadas, com vistas a uma melhor compreensão das características epidemiológicas da infecção por HPV na Região Amazônica.

## 1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que a infecção viral mais freqüentemente transmitida por via sexual seja aquela provocada pelo Papilomavírus humano (HPV) (Becker & Stone, 1987; Jacyntho & Almeida Filho, 1994[a]), originando também uma das mais prevalentes entre todas as doenças sexualmente transmissíveis (Kiviat *et al.*, 1992).

A importância que assume hoje a nível mundial o estudo dos HPV advém de sua nítida correlação com os processos neoplásicos da cérvix uterina (Shah & Howley, 1990; White & Fenner, 1994). A associação entre lesão maligna cervical e atividade sexual, proposta desde 1842 por Rigoni-Stern *apud* Cox, (1995), ensejou a que vários patógenos transmitidos por essa via fossem considerados como possíveis agentes etiológicos (Cox, 1995).

Com o advento dos inúmeros progressos que vêm sendo alcançados nas últimas décadas em diversas áreas do conhecimento (clínicos, epidemiológicos e laboratoriais), tornou-se possível atribuir ao HPV papel fundamental na etiologia das lesões malignas do colo de útero (zur Hausen, 1991[b]; Koutsky *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 1993; Schiffman *et al.*, 1995).

### 1.1 HISTÓRICO DO HPV

As verrugas genitais, uma das mais freqüentes formas de expressão clínica dos HPV, são conhecidas desde a Antigüidade (Escudero, 1996); entretanto, somente em fins do século passado foram correlacionadas às verrugas cutâneas. A associação foi possível em virtude da semelhança

histológica encontrada entre os dois tipos, assim como pela detecção de lesões verrucosas em áreas extragenitais, inoculadas com extrato de verrugas de região genital. Com base nesses achados, estabeleceu-se a teoria unitária que atribuía às verrugas genitais e cutâneas origem única (Oriol, 1971).

A natureza virótica das verrugas cutâneas foi primeiramente proposta em 1907, por Ciuffo *apud* Shah & Howley (1990), que inoculou em área escarificada do dorso da própria mão extrato filtrado de material proveniente de tecido verrucoso. Tal proposição foi confirmada em 1949 por Strauss *et al.*, por meio do microscópio eletrônico.

Quanto às verrugas genitais, após importante observação epidemiológica, verificou-se que as mesmas eram de transmissão sexual. Lesões verrucosas foram detectadas em cônjuges de reservistas norte-americanos, os quais haviam retornado do Extremo Oriente cerca de 4 a 6 semanas antes do aparecimento da sintomatologia em suas esposas. Todos os militares admitiram relacionamento sexual com mulheres asiáticas no período em que estiveram afastados de seu domicílio (Barret, Silbar, Mc Ginley, 1954).

Cerca de duas décadas após o estabelecimento da natureza viral para as verrugas cutâneas, foram identificadas ao microscópio eletrônico, partículas virais em material obtido de verrugas genitais (Dunn & Ogilvie, 1968; Oriol & Almeida, 1970). Nesse período foram demonstradas as divergências antigênicas entre os vírus das verrugas cutâneas e genitais por meio da imunomicroscopia eletrônica (Almeida, Pinkus, Stannard, 1969).

Com o aprimoramento e emergência de novas técnicas de detecção virótica, os estudos sobre as verrugas ganharam decisivo impulso.

Para tal, os trabalhos de zur Hausen *et al.* (1974), sobre hibridização molecular, tiveram fundamental importância. A seguir, a pluralidade dos HPV foi reconhecida (Gismann & zur Hausen, 1976).

Um maior interesse no estudo desses vírus deu-se com a descoberta dos pesquisadores Meisels & Fortin (1976) e Purola & Savia (1977). Esses investigadores, ao examinarem esfregaços e biópsias de colo uterino, correlacionaram os achados cito-histológicas (coilocitose) presentes em lesões subclínicas, aos HPV. Tais alterações, embora conhecidas desde a década de 50, só então foram identificadas como o resultado do efeito citopatogênico viral. A partir daí, processos semelhantes passaram a ser investigados na genitália masculina e em outros sítios do trato genital feminino.

Ainda em 1976, zur Hausen cogitou a possibilidade do HPV estar implicado na gênese do câncer de localização cervical.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

### 1.2.1 Da infecção pelo HPV

As pesquisas sobre os HPV, desenvolvidas nas duas últimas décadas, têm demonstrado singular progresso no entendimento das relações entre certos tipos do referido vírus e as neoplasias de colo uterino (Schneider, 1994).

Os HPV encontram-se bastante difundidos na população em geral. Estima-se o número de mulheres portadoras do vírus em fase latente

em torno de 10 a 40% (Villa, 1995[a]), sendo os maiores percentuais assinalados entre aquelas pertencentes a faixas etárias mais jovens (Kataja *et al.*, 1993; Villa, 1995[a]).

Acredita-se que somente uma parcela reduzida das mulheres infectadas com os HPV de tipo oncogênico desenvolvam lesão maligna (Schiffman *et al.*, 1993), uma vez que grande parte dessas infecções é transitória, desaparecendo em poucos meses (de Villiers *et al.*, 1987; Brisson *et al.*, 1996). Evidências demonstram, entretanto, que as portadoras desses tipos de HPV apresentam risco significativamente maior de desenvolver processo neoplásico cervical do que aquelas sem sinais de infecção por esses agentes virais (Koutsky *et al.*, 1992; Schiffman *et al.*, 1993). Dados preliminares indicam que infecção pelos tipos de HPV com potencial cancerígeno tendem a persistir por um maior período de tempo, se comparadas com a infecção por tipos de HPV considerados de baixo risco para o desenvolvimento de processo neoplásico (Franco *et al.*, 1995).

Grubb (1986) encontrou alteração cervical sugestiva de infecção por HPV em cerca de 1 a 3 % de exames citopatológicos com coloração pelo método de Papanicolaou, e sugeriu em dados preliminares que é cerca de 10 vezes maior a chance de mulheres com infecção cervical por HPV virem a desenvolver neoplasia intra-epitelial cervical, quando comparadas àquelas não infectadas por esse vírus.

Villa (1995[a]) refere que o material genético de alguns tipos de HPV pode ser detectado em cerca de 90% dos carcinomas e lesões precursoras em cérvix uterina.

### 1.2.2 Do câncer de cérvix uterina

O câncer de colo de útero, por outro lado, com uma incidência mundial de cerca de 500.000 casos por ano (Aleixo Neto, 1991; Fisher, 1994) e aproximadamente 300.000 óbitos anuais (WHO, 1996), constitui-se num dos mais sérios problemas de saúde, principalmente para mulheres de países em desenvolvimento (Aleixo Neto, 1991). Estima-se que no Brasil cerca de 40.000 casos novos surjam anualmente (Villa, 1995[a]), sendo que o nordeste brasileiro, especialmente a cidade de Recife (com uma incidência de 96,5/100.000), aparece com o maior índice até o momento detectado (Villa & Franco, 1989).

Dados relativos à área metropolitana de Belém, no período de janeiro de 1989 a dezembro de 1991, revelaram taxas bruta e padronizada de câncer de colo uterino da ordem de 41,6 e 57,9 por 100.000 mulheres, respectivamente (PARÁ. Secretaria..., 1996). No Instituto Ofir Loiola (IOL), em 1992, o câncer cervical representou 83,6% dos cânceres de localização genital em mulheres (INSTITUTO ..., [1993?]). Registros do ano de 1994, no mesmo local, mostraram que 54,9% dos processos neoplásicos diagnosticados no sexo feminino, encontravam-se no aparelho genital (INSTITUTO ..., 1997).

Mesmo que consistentes evidências venham conferindo aos HPV o principal papel no desenvolvimento de doença maligna cervical, a atuação de outros fatores (intrínsecos e extrínsecos), parece exercer fundamental importância no processo (Brinton, 1992).

Das inúmeras variáveis correlacionadas em estudos epidemiológicos às neoplasias cervicais, o número de parceiros sexuais (Cuzick *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1990; Parazzini *et al.*, 1992) e a idade precoce do primeiro coito (Parazzini *et al.*, 1992) conferem a esses processos o perfil de uma doença sexualmente transmissível, cujas evidências demonstram ser o HPV o agente etiológico implicado (Young *et al.*, 1989; Shroyer, 1993; Levine *et al.*, 1993; Eluf Neto *et al.*, 1994).

Acredita-se que a explicação para justificar a precocidade na iniciação sexual como mecanismo facilitador para o desenvolvimento de lesão maligna deva-se ao fato do epitélio cervical, mais precisamente aquele situado na zona de transformação (ZT), encontrar-se imaturo, portanto, facilmente susceptível às modificações causadas por agentes sexualmente transmissíveis (Coppleson & Reid, 1968).

Considera-se que o risco aumentado de neoplasia cervical em mulheres com multiplicidade de parceiros, assim como naquelas em que o companheiro apresenta comportamento sexual promíscuo, seja conseqüência de suas maiores chances de exposição ao HPV (Bosch *et al.*, 1992; Schiffman *et al.*, 1993; van Doornum *et al.*, 1994; Venuti *et al.*, 1994; Burk *et al.*, 1996). Essa elevação no risco desaparece quando há o uso regular de preservativo masculino nos relacionamentos sexuais (Kjaer *et al.*, 1991).

A possibilidade do desenvolvimento de doença maligna do colo uterino em mulheres com 10 ou mais parceiros foi consideravelmente maior que naquelas com 1 parceiro (Peters *et al.*, 1986; Brinton *et al.*, 1987).

Buckley *et al.* (1981) encontraram risco relativo de 7,8 para mulheres cujo cônjuge havia tido 15 ou mais parceiras sexuais fora do casamento.

Bosch *et al.* (1996) detectaram prevalência de DNA de HPV na ordem de 17,5% entre maridos de pacientes com carcinoma cervical, contra 3,5% naqueles cujas companheiras faziam parte do grupo controle.

Ley *et al.*, em 1991 encontraram DNA de HPV pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 21% de mulheres com apenas um parceiro sexual, enquanto que naquelas com 10 ou mais o percentual foi de 69%.

Fatores como fumo, contraceptivos orais e número de filhos (ou de gestações) vêm sendo relacionados a carcinomas e lesões precursoras em cérvix uterina. A participação da dieta, assim como situações de imunossupressão e presença de outros agentes infecciosos de transmissão sexual (além do HPV), embora em menor escala, têm merecido a atenção dos estudiosos do assunto.

A influência do fumo no desenvolvimento de neoplasia de colo uterino é defendida pela maioria dos autores (Winkelstein, 1990; La Vecchia *et al.*, 1986). A detecção de substâncias como nicotina e cotinina no muco cervical de fumantes com neoplasia maligna de cérvix uterina (Schiffman *et al.*, 1987; Helberg *et al.*, 1988), e o fato do cigarro ser considerado um agente que propicia a diminuição da função das células de Langerhans, principais responsáveis pela resposta imunitária local (Mc Ardle & Müller, 1986; Barton *et al.*, 1988), justificam tal associação.



A contribuição de contraceptivos hormonais orais na gênese de lesões malignas de colo uterino vem sendo demonstrada por alguns autores (Beral, Hannaford, Kay, 1988; Negrini *et al.*, 1990; Bosch *et al.*, 1992).

Brock *et al.* (1989) evidenciaram aumento no risco de carcinoma cervical entre mulheres usuárias de anticoncepcional oral por mais de 6 anos. Especula-se que a ação hormonal levaria a alterações no processo normal de maturação epitelial da cérvix uterina (Cox, 1995), assim como induziria a expressão de oncoproteínas virais (Mittal *et al.*, 1993).

De Britton *et al.* (1993) detectaram que o risco de morrer de câncer cervical era significativamente maior entre mulheres com 6 ou mais filhos, se comparadas àquelas com 3 ou menos. Fatores como diminuição da imunidade celular (Purtilo, Hallgren, Yunis, 1972) e ação da progesterona (Mittal *et al.*, 1993) durante o período gestacional, propiciariam a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, em epitélio cervical vulnerável (zur Hausen, 1991[a]). Tal condição poderia ser a chave para explicar a relação direta entre o tamanho da prole e neoplasia cervical maligna.

É um tanto controversa a participação de fatores dietéticos no desenvolvimento de câncer e lesões precursoras em colo de útero. Verreault *et al.* (1989) encontraram diminuição no risco em mulheres com dietas ricas em vitaminas A, C e E, embora o provável efeito protetor conferido por tais nutrientes tenha sido consideravelmente enfraquecido quando ajustado para outras variáveis associadas ao aparecimento de doença maligna em cérvix uterina (Slattery *et al.*, 1990).

### 1.3 AGENTE VIRAL (HPV)

Os Papilomavírus (PV) são classificados como um dos dois gêneros da família *Papovaviridae*. O outro gênero é constituído pelos *Polyomavirus* (PY) e *Simian Virus 40* (SV 40). Entretanto estudos a nível molecular mostram diferença significativa entre esses vírus, o que para alguns autores justificaria que os PV, por si só, constituíssem nova família (Tagami, Oguchi, Ofuji, 1983; Broker, 1987).

A classificação dos PV baseia-se em sua espécie de origem (humana, bovina, etc) e no grau de homologia existente entre o seu material genético e o de outro da mesma espécie (Pfister, 1987). Para que dois vírus da mesma espécie sejam considerados como tipos diferentes é necessário que a similitude de seus DNA esteja situada entre 45% a 50%. Se for maior que 50% e menor que 100% eles são identificados como subtipos (Coggin & zur Hausen, 1979; Almeida Filho, Passos, Lopes, 1995).

Os HPV são vírus de pequenas dimensões, com cerca de 55nm de diâmetro, não envelopados, têm nucleocapsídeos de simetria icosaédrica e possuem 72 capsômeros (Oliveira, 1994). Têm seu genoma constituído de uma molécula de DNA circular de dupla fita, com aproximadamente 8.000 pares de bases e peso molecular de  $5,2 \times 10^6$  daltons. Apresentam organização gênica similar, em que os genes virais, ou unidades de tradução ou *Open Reading Frames* (ORF), estão localizados na mesma fita de DNA. O genoma viral é dividido, funcionalmente, em três regiões: precoce (*Early*) com 6 ORFs (E1, E2, E4, E5, E6, E7), tardia (*Late*) com 2 ORFs (L1 e L2) e uma região denominada

*Long control region* (LCR), onde não se detecta nenhuma ORF. A região precoce representa cerca de 50% do genoma viral, sendo responsável pela replicação do DNA do HPV, pelo controle da transcrição e pela transformação celular. A região tardia (L1, L2) compreende aproximadamente 40% do genoma do vírus e codifica as proteínas estruturais (principal e secundária) do capsídeo. Na região LCR, encontra-se a origem da replicação viral (Shah & Howley, 1990; Villa, 1995[b]; Villa, 1997).

Atualmente estão identificados mais de 70 tipos distintos de HPV (Longuet, Cassonet, Orth, 1996), numerados em ordem crescente na medida de sua descoberta, sendo que aproximadamente 35 infectam o trato genital (de Villiers, 1994). Dentre estes, certos tipos têm um papel reconhecidamente oncogênico, sendo que os HPV 16 e 18 são os mais comumente implicados na gênese das neoplasias cervicais malignas, motivo pelo qual são considerados de maior risco (de Villiers, 1989; Oliveira *et al.*, 1994). Outros tipos de HPV, como os 31,33,35,39,45, 51, 52, 56 e 58, embora em menor proporção, são também associados à oncogênese (Oliveira, 1994; Shah & Howley, 1990; Oliveira *et al.*, 1994; Kónya *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996).

Para alguns autores (Liaw *et al.*, 1995), os HPV podem ser agrupados em: a) tipos de alto risco (16, 18, 31 e 45), tipos de risco intermediário (26, 33, 35, 39, 51, 52, 55,56, 58 e 59) e tipos de baixo risco (6, 11, 40, 42, 53, 54,57), para o desenvolvimento de neoplasia maligna de colo uterino.

#### 1.4 FISIOPATOGENESE DA INFECÇÃO POR HPV

Acredita-se que o HPV penetre no organismo através de contato direto epitélio-epitélio, geralmente por meio de microtraumas durante o intercuro sexual, alcançando, em seguida, o núcleo das células da camada basal (Schneider & Koutsky, 1992; Pereyra, Guerra, Villa, 1996). Essas células, estimuladas pela presença do DNA viral, multiplicam-se aceleradamente e, com isso, impedem a replicação independente do DNA do vírus, razão pela qual são chamadas “não permissivas”, onde o vírus pode apenas expressar suas proteínas precoces. Seguindo o processo natural de maturação, as células da camada basal chegam à região superficial do epitélio, onde não mais se multiplicam. Nesse estágio sofrem maturação e queratinização, tornando-se “permissivas” à replicação vegetativa do DNA viral, à síntese das proteínas do capsídeo e à montagem das partículas virais. A proliferação viral só ocorre em células mais diferenciadas nas quais o vírus exerce seu efeito citopático clássico (coilocitose). Quando a célula coilocitótica sofre processo de descamação, há liberação dos vírions que passam a infectar células vizinhas, induzindo proliferações epiteliais da pele ou mucosa (de Brux *et al.*, 1983; Garcia-Carrancá & Gariglio, 1993; Villa, 1995[a]; Villa, 1995[b]).

Algumas vezes, diferentemente do que ocorre na infecção clássica, em que o DNA viral mantém-se em sua forma epissomal, o DNA de certos tipos de HPV é integrado ao DNA da célula basal infectada (Dürst *et al.*, 1985; Lehn *et al.*, 1988), levando a sínteses proteicas anormais, perda da diferenciação celular e transformação neoplásica. Nessas circunstâncias não

mais ocorre replicação viral, pois a célula transformada torna-se "não-permissiva" (de Brux *et al.*, 1983; Linhares, 1994; Villa, 1995[a]; Villa, 1995[b]).

Trabalhos experimentais demonstraram que os genes precoces E6 e E7 dos HPV 16 e 18 possuem a capacidade de transformar fibroblastos de roedores (Yasumoto *et al.*, 1986; Bedell *et al.*, 1989). Apesar da importância desses genes na mutação celular, acredita-se que a atuação de um oncogene ativado se faça necessária no processo (Matlashewski *et al.*, 1987; Phelps *et al.*, 1988).

Estudos realizados com culturas primárias de ceratinócitos humanos consolidaram a idéia de que os genomas virais de HPV de "alto risco" reservam a propriedade de tornar "imortais" as células nas quais se tenham integrado (Dürst *et al.*, 1987; Schelegel *et al.*, 1988; Munger *et al.*, 1989[a]).

Experimentos *in vitro* demonstrando que a atividade de imortalização do HPV 18 é dezenas de vezes maior que a do HPV 16 (Romanczuk *et al.*, 1991), corroboram a suposição de que os HPV 16 e 18 possuem diferentes potenciais oncogênicos (Villa & Schlegel, 1991).

Possivelmente as pacientes infectadas com HPV 18 apresentam progressão mais rápida das lesões, o que explicaria a freqüente associação desse tipo a neoplasias malignas em mulheres mais jovens (Arends *et al.*, 1990; Kónya *et al.*, 1995).

Pesquisas revelaram que as proteínas E6 e E7 dos HPV oncogênicos ligam-se respectivamente à p53 e à p105RB, proteínas celulares resultantes de genes supressores de tumor (Munger *et al.*, 1989[b]; zur

Hausen, 1991[a]; Werness, Levine, Howley, 1990). Com essa inativação ocorreria proliferação celular descontrolada (Villa, 1995[b]).

Fatores intrínsecos ao organismo do hospedeiro, assim como fatores externos, devem funcionar como co-carcinógenos, contribuindo para progressão tumoral em indivíduos infectados com HPV de potencial oncogênico (zur Hausen, 1991[a]; Villa, 1995[a]; Villa, 1995[b]).

### 1-5 IMUNIDADE RELACIONADA AO HPV

Vários autores têm correlacionado o envolvimento do sistema imunológico à infecção e ao desenvolvimento das lesões provocadas pelo HPV, assim como no que diz respeito ao aparecimento e à prevenção de recidivas (Shah & Howley, 1990).

Embora níveis elevados de anticorpos possam ser detectados, a participação da imunidade humoral não se encontra ainda suficientemente esclarecida (Kienzeler, 1985). A detecção de anticorpos circulantes pode ser realizada pelo método imunoenzimático (ELISA), que utiliza como antígenos proteínas virais ou seus peptídeos expressos por bactérias (Viscidi & Shah, 1992 *apud* Villa, 1995[b]), uma vez que os HPV, até o presente, não podem ser propagados em meio de cultura de tecidos (Shah & Howley, 1990; Jacyntho & Almeida Filho, 1994[b]; Birley, 1995).

Possivelmente ocorre com maior freqüência, e em títulos mais elevados, a produção de anticorpos para as proteínas virais E6 e E7 dos HPV de tipos 16 e 18 em mulheres com carcinoma da cérvix uterina, em

comparação a mulheres sadias (Jochmus-Kudielka *et al.*, 1989; Bleul *et al.*, 1991). No entanto, estima-se que apenas 50% das mulheres com neoplasia maligna apresentam resultados sorológicos positivos (van den Brule *et al.*, 1993 *apud* Villa, 1995[a]).

A participação da imunidade celular, por meio de mediadores celulares solúveis (linfocinas) e células macrófago-símile (células de Langerhans), na patogenia dos HPV cutâneos encontra-se bem estabelecida (Maldonado, 1994). Observações clínicas registraram maior incidência de verrugas em pacientes com quadros de imunossupressão, nos quais as lesões freqüentemente eram mais numerosas e de maior tamanho, quando comparadas às de grupos de pacientes sem comprometimento do sistema imune (Benton *et al.*, 1989). Por outro lado, estudos histopatológicos demonstraram a presença de células mononucleares em tecido verrucoso (Kirchner, 1986; Tagami *et al.*, 1974).

A resposta celular, entretanto, não ocorre de forma tão evidente quando envolve os tipos mais freqüentemente associados à neoplasia cervical maligna (HPV 16 e 18). Possivelmente, a explicação para tal, esteja na dificuldade que as células infectadas, pertencentes a tecido mucoso, apresentem em estimular o sistema imune, e/ou pelo fato das células de Langerhans, normalmente as apresentadoras de antígenos em mucosas, encontrarem-se em número reduzido na área circunjacente às lesões (Shah & Howley, 1990; Villa, 1995[b]).

## 1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR HPV

Os diferentes tipos de HPV podem infectar a pele e as mucosas. Quando acometem o trato genital inferior podem ser detectados, após período de tempo variável, em um dos seguintes estágios:

### 1.6.1 Clínico

Apresentam-se freqüentemente sob a forma de verrugas genitais benignas, os condilomas acuminados, quase que exclusivamente associados aos HPV de tipos 6 e 11 (Hellberg *et al.*, 1995). Essa forma de expressão clínica, no entanto, raramente é observada em área cervical uterina (Shah & Howley, 1990).

### 1.6.2 Subclínico

Os condilomas planos, reconhecidos há quase duas décadas são considerados o modo mais comum de expressão viral em cérvix uterina (Meisels, Fortin, Roy, 1977; Reid *et al.*, 1980), representando cerca de 95% das infecções por HPV nesse sítio anatômico (Pereyra, Guerra, Villa, 1996). Recebem também a denominação de infecção subclínica pelo HPV por serem visualizados apenas ao colposcópico com utilização prévia do ácido acético a 5%. Essas lesões, quando localizadas na ZT são colposcopicamente indistinguíveis das neoplasias intra-epiteliais cervicais, impondo-se a realização



de biópsia e histopatologia para sua diferenciação (Shah & Howley, 1990; Schneider & Koutsky, 1992; Linhares, 1994).

### 1.6.3 Latente

O HPV não produz alterações morfológicas no epitélio sendo detectado somente por meio de técnicas laboratoriais de biologia molecular como hibridização e PCR (Schneider & Koutsky, 1992). Entretanto, ainda são insuficientes os conhecimentos sobre a latência do vírus no organismo (Villa, 1995[b]).

### 1.6.4 Associado à neoplasia

Quando presente em epitélio com transformação atípica pode expressar-se como neoplasia intraepitelial ou câncer invasivo (Schneider & Koutsky, 1992), sendo os HPV dos tipos 16 e 18 os mais prevalentes (Shah & Howley, 1990).

## 1.7 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HPV pode ser realizado por meio de métodos indiretos, tais como: citologia, colposcopia, e histopatologia, e diretos, dentre os quais: microscopia eletrônica, imunohistoquímica, HIS, hibridização por *dot-blot* e PCR.

### 1.7.1 Citologia

O exame citológico tem sua maior importância como *screening*, uma vez que auxilia na distinção entre epitélio normal e patológico, implicando no eventual encaminhamento das pacientes para ulterior confirmação histopatológica (Beral & Day, 1992).

As alterações citológicas encontradas em esfregaços de colo uterino, sugestivas de infecção por HPV, são: alterações citoplasmáticas (coilocitose, disceratose) e anomalias nucleares (Linhares, 1994; Maldonado, 1994).

Os coilócitos são células escamosas, superficiais ou intermediárias, consideradas patognomônicas; embora não exclusivas da infecção causada pelo HPV (Almeida Filho & Jacyntho, 1994[a]; Gompel & Koss, 1997). Essas células podem ou não apresentar-se com seu tamanho aumentado e caracterizam-se pela presença de uma halo perinuclear (Roy *et al.*, 1983) de tamanho variável. O citoplasma freqüentemente se apresenta cianofílico, entretanto, algumas vezes, é intensamente eosinofílico. O núcleo é grande e hipercromático, podendo ser único, mas freqüentemente é binucleado e às vezes apresenta-se multinucleado (Roy *et al.*, 1983; Almeida Filho, Passos, Lopes, 1995).

A presença de coilócitos em pacientes com infecção por HPV sugere estar ocorrendo replicação viral (Meisels, Morim, Casas-Cordero, 1982). O achado dessas células está associado a lesões de menor gravidade (Almeida Filho, Jacyntho, 1994[a]).

As células disceratóticas originam-se da camada superficial e/ou intermediária. Não são exclusivas das lesões produzidas por HPV, mas aparecem caracteristicamente em epitélio infectado por esse vírus. Apresentam-se diminuídas de tamanho, com citoplasma orangeofílico e núcleo de dimensões normais, embora pareça aumentado em relação às células que não exibem alterações (Almeida Filho & Jacyntho, 1994[b]; Gompel & Koss, 1997).

As anomalias nucleares caracterizam-se por: bi ou multinucleação, aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia, às vezes acompanhada de sinais de degeneração (Linhares, 1994).

## 1.7.2 Colposcopia

Na realização desse exame é de suma importância a análise da ZT, porção da cérvix uterina que representa a união dos epitélios pavimentoso estratificado e cilíndrico, pois é nessa região que as lesões neoplásicas, com maior freqüência, se assestam (Maldonado, 1994).

Embora a diferenciação colposcópica entre neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e infecção por HPV, seja considerada de extrema dificuldade, é descrito que a primeira tende a restringir-se à ZT, enquanto que as infecções por HPV não respeitam tais limites (Maldonado, 1994; Linhares, 1994).

O exame colposcópico é fundamental na distinção entre epitélio normal e alterado, orientando a porção do tecido que deve ser submetida à biópsia (Gompel & Koss, 1997).

A colposcopia, contando com a utilização de substâncias como o ácido acético e o iodo, permite a identificação das áreas suspeitas para que se proceda à biópsia dirigida (Almeida Filho, Passos, Lopes, 1995).

Quando após a aplicação do ácido acético, o epitélio mostrar-se acetobranco há indicação de ter havido coagulação das proteínas, as quais são escassas no tecido normal e encontram-se aumentadas no tecido neoplásico e/ou infectado pelo HPV (Maldonado, 1994).

O teste de Schiller, aplicado após o ácido acético, consiste na utilização tópica de iodo e possibilita a avaliação do conteúdo de glicogênio epitelial que se apresenta abundante no tecido normal. Se o local estiver infectado com HPV, a interação é fraca e desigual. Caso haja processo neoplásico associado o epitélio não sofre coloração, devido à escassa quantidade de glicogênio local (Maldonado, 1994).

Essas características observadas na ZT atípica não são, entretanto, específicas das displasias cervicais; podendo ser observadas em epitélio metaplásico da cérvix uterina (Barrasso, 1994).

Estudo comparativo entre as técnicas de colposcopia e citologia evidenciou maior sensibilidade da primeira. A especificidade mostrou-se superior na citologia (Maldonado, 1994).

### **1.7.3 Histopatologia**

O aspecto histopatológico decorrente das infecções cérvico-vaginais induzidas pelo HPV varia de acordo com o tipo de lesão encontrado.

Tratando-se de processo condilomatoso estão descritos vários formatos: plano, pontiagudo, exofítico e endofítico. Entre eles, o predominantemente encontrado em área cervical é o condiloma plano. Essa variedade apresenta-se, histopatologicamente, como lesão de limites bem definidos, com acentuadas modificações nas camadas superficiais onde o citoplasma é mais claro e o epitélio acantótico, sendo a presença de coilócitos a característica marcante. Há bi ou multinucleação, hiperchromasia com graus variáveis de hiper e paraqueratose (Almeida Filho & Jacyntho, 1994[a]; Linhares, 1994; Maldonado, 1994).

Como os processos malignos e lesões precursoras em cérvix uterina cervicais vêm sendo firmemente considerados como manifestações da infecção por HPV (Pereyra, Guerra, Villa, 1996), as diversas classificações histopatológicas utilizadas para os diferentes estágios dessas alterações merecem ser descritas:

a) Utiliza-se o termo displasia (Reagan, Seidemann, Saracusa, 1953) e subdivide-se em leve, moderada e grave, de acordo com o grau de comprometimento do tecido escamoso. Quando toda a espessura do epitélio está acometida, designa-se o processo patológico de carcinoma *in situ*.

b) Adota-se a nomenclatura neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), proposta por Richart em 1967 (com modificações), a qual conforme o grau de estadiamento pode ser dividida em:

• NIC I (displasia leve): as alterações acometem 1/3 do epitélio basal, embora células com núcleos anormais possam migrar para superfície epitelial e ser detectadas nos esfregaços de Papanicolaou.

• NIC II (displasia moderada): encontram-se alterações nos terços inferior e médio do epitélio.

• NIC III (displasia acentuada/carcinoma *in situ*) quando os transtornos celulares acometem todas as camadas epiteliais.

c) Faz-se uso da classificação de Bethesda (Anonymous, 1989), critério citológico adaptado, que classifica as lesões como:

• Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau:

•• Condiloma plano

•• Displasia leve  $\Leftrightarrow$  NIC I

• Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau:

•• Displasia moderada  $\Leftrightarrow$  NIC II

•• Displasia grave/Carcinoma *in situ*  $\Leftrightarrow$  NIC III

• Carcinoma invasivo

O quadro a seguir reproduz de forma didática as classificações (citológicas e histológicas) utilizadas para descrever as anomalias cervicais (IARC, 1995).

Quadro 1 - Resumo dos termos usados para anormalidades cervicais.

Termos Histológicos		Normal	Inflamatório/ resposta reparativa, HPV relacionado ?	Displasia leve (coilocitoses, atipia coilocitótica, condiloma plano)	Displasia moderada	Displasia severa	Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma invasivo
		Normal	Inflamatório/ resposta reparativa, HPV relacionado ?	NIC grau I	NIC grau II	NIC grau III		Carcinoma invasivo
		Normal	Inflamatório/ resposta reparativa, HPV relacionado ?	NIC de baixo grau		NIC de alto grau		Carcinoma invasivo
Termos Citológicos	Classificação de Bethesda	Dentro dos limites da normalidade	CEASI	Lesão intra-epitelial de baixo grau	Lesão intra-epitelial de alto grau			Carcinoma invasivo
	Classificação de Papanicolaou	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV		Classe V	

CEASI = células escamosas atípicas de significado indeterminado (Fonte: adaptado de IARC, 1995).

Breves comentários a respeito das alterações histopatológicas da infecção por HPV em NIC (de baixo e de alto grau):

Nas lesões diagnosticadas como NIC de baixo grau (de malignidade) as células epiteliais são bem diferenciadas, apresentando alterações características do efeito citopatogênico resultante da replicação viral. Tais lesões podem ser ocasionadas por qualquer tipo de HPV capaz de infectar o trato genital. Embora não seja possível, por meio da microscopia, observar-se diferenças entre as alterações celulares induzidas por diferentes tipos de HPV, alguns autores supõem que as lesões provocadas pelo tipo 16 podem apresentar um maior pleomorfismo que as decorrentes da infecção pelos demais tipos (IARC, 1995).

As principais características histológicas da infecção por HPV em NIC de baixo grau traduzem-se por: atipia nuclear, bi ou multi-nucleação e cavitação citoplasmática perinuclear com espessamento do citoplasma. As figuras de mitose encontram-se em maior número e geralmente limitadas ao terço inferior do epitélio (Almeida Filho, Jacyntho, 1994[a]; IARC, 1995).

A combinação de atipia nuclear e halo perinuclear na camada epitelial superficial, representa o principal marcador de infecção produtiva pelo HPV (Cotran, Kumar, Robbins, 1989; Almeida Filho, Jacyntho, 1994[a]; IARC, 1995).

Nas NIC de alto grau (de malignidade) observa-se aumento nuclear, substancial pleomorfismo e perda da organização celular. Figuras de mitose estão presentes também nos terços médio e superior do epitélio. A detecção de mitoses anormais constitui-se em um dos melhores parâmetros



para distinguir NIC de alto e baixo grau. A ausência de coilocitose demonstra não estar ocorrendo replicação viral. (Cotran, Kumar, Robbins, 1989; Almeida Filho, Jacyntho, 1994[a]; IARC, 1995).

#### **1.7.4 Microscopia eletrônica**

Constitui-se no único método que possibilita o estudo da morfologia do vírus, ampliando a partícula viral na ordem de até 100.000 vezes. Apresenta, entretanto, como desvantagens, tratar-se de teste bastante laborioso e que não é dotado de boa especificidade, uma vez que não diferencia facilmente o PV do PY. Além disso, não proporciona a identificação dos tipos de HPV (Cavalcanti *et al.*, 1991; Almeida Filho, Passos, Lopes, 1995).

#### **1.7.5 Testes imunoquímicos**

Podem ser realizados em esfregaços celulares (imunocitoquímica) ou cortes de tecido (imunohistoquímica). Eles possibilitam a identificação dos antígenos virais estruturais, permitindo a diferenciação com os PY. A sensibilidade é bastante variável, ainda não estando bem estabelecida. Kurman *et al.*, em 1984 *apud* Cavalcanti *et al.* (1991) referiram que em estudos imunohistoquímicos, dependendo do tipo de lesão, ocorrem níveis de detecção compreendidos entre 15% a 70%.

Acredita-se na possibilidade de relação inversa entre a presença das proteínas estruturais do HPV e a severidade da neoplasia cervical (Warhol *et al.*, 1984).

### 1.7.6 HIS

Apresenta como principais vantagens:

a) A possibilidade de ser aplicada em material coletado para exame histopatológico e conservado em formol, parafina ou congelamento, assim como em material obtido por exfoliação da vagina e cérvix uterina (Linhares, 1994; Villa & Medeiros, 1995).

b) Única técnica a permitir a identificação do tipo de HPV em relação à topografia do tecido (Cavalcanti *et al.*, 1991; Stoler *et al.*, 1992; Linhares, 1994; Villa & Medeiros, 1995).

Em contrapartida, o procedimento é considerado laborioso e a sensibilidade relativamente baixa. Com efeito, para detectá-lo fazendo-se uso de sonda radioativa, há necessidade de, no mínimo, 20 - 50 cópias do genoma viral (Schneider *et al.*, 1991; Villa, 1995[a]). Utilizando-se sondas não radioativas, a sensibilidade decresce, pois torna-se necessária a presença de, no mínimo, 350 cópias do genoma do vírus para que o mesmo seja detectado pelo teste (Crum *et al.*, 1988 *apud* de Villiers, 1992).

### 1.7.7 PCR

Trata-se de técnica desenvolvida por Mullis em meados da década de 80 (Mullis, 1990), tendo como base o mecanismo natural de duplicação do material genético: separação das duas fitas de DNA, acoplamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e complementação das fitas simples, tornando-as novamente duplas.

Constitui-se no método que oferece maior sensibilidade e especificidade, pois permite que uma sequência específica do DNA seja replicada mesmo com uma quantidade de genoma viral inferior a 0,01 por célula (Villa, 1995[a]). Esse procedimento é capaz de fornecer 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas partindo de uma única molécula de DNA (Mullis, 1990).

A possibilidade de contaminação dos espécimes submetidos a exame, levando a resultados falso-positivos representa, sem dúvida, a maior preocupação durante a execução dessa técnica, justificando-se a adoção de cuidados excepcionais quanto à assepsia (Bauer *et al.*, 1991; Etherington & Shafi, 1996). Controles negativos são necessários para detectar essa eventual intercorrência (Erich, Gelfand, Sninsky, 1991).

Os componentes da mistura de reação (MIX), além do DNA genômico, são representados pelos *primers* específicos, DNA polimerase termoestável, os quatro desoxirribonucleotídeos (as 4 bases e seus correspondentes açúcares e fosfatos) e um tampão apropriado (Brasileiro Filho & Pena, 1992; Villa & Medeiros, 1995).

Para que haja separação, é necessário que a temperatura seja elevada a aproximadamente 95°C, após o que a dupla fita de DNA dá origem a duas fitas simples e complementares. Chama-se a este processo de "Desnaturação" (Villa & Medeiros, 1995).

Os *primers* nada mais são que pequenos fragmentos de DNA de fita simples, cuja função é localizar as regiões para as quais foram sintetizados e acoplar-se às sequências complementares nas duas fitas simples, surgindo assim um pequeno fragmento de DNA de dupla fita (Brasileiro Filho & Pena, 1992). O pareamento ou *annealing* dos *primers* ocorre à temperatura situada entre 40-60°C (PRODUTOS Roche...,s.d.).

As polimerases atuam ligando um a um os nucleotídeos correspondentes, ou seja, as bases com as moléculas de açúcar e radicais fosfatos, tornando duplas as fitas de DNA simples. Essas enzimas têm a capacidade de diferenciar as duas extremidades dos *primers* (3' e 5') e iniciar sempre pela extremidade 3' completando a fita simples a partir deste ponto. Quando se utilizam polimerases termoestáveis de DNA, a polimerização é realizada a cerca de 72°C de temperatura (Villa & Medeiros, 1995).

A utilização da polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus* (*Taq-polimerase*) em substituição àquela anteriormente utilizada, derivada da *E.coli*, concorreu de forma significativa para o aperfeiçoamento da técnica. Em virtude da *Taq polimerase* tratar-se de enzima termoestável, permite que os diversos ciclos sejam processados de maneira automática em um mesmo tubo, não havendo necessidade de interrompê-los para adição de

nova polimerase ativa (Saiki *et al.*, 1988; Villa & Medeiros, 1995; Andrade, 1993).

As três etapas que constituem o ciclo podem ser repetidas diversas vezes com a mesma solução. A duração de cada ciclo é , em média, de 3 minutos; logo, em apenas 1 hora, cerca de um milhão de cópias podem ser produzidas (PRODUTOS Roche...s.d.; Villa & Medeiros, 1995).

### **1.7.8 Hibridização por *dot-blot***

Caracteriza-se como método relativamente rápido e simples com alta sensibilidade e especificidade (Koutsky; Galloway; Holmes, 1988; Shroyer, 1993).

Consiste, resumidamente, na determinação dos diferentes tipos de HPV por meio da hibridização em pontos, a qual utiliza os princípios gerais de hibridização com a particularidade do produto previamente amplificado por PCR ser aplicado em um ponto da membrana de nitrocelulose ou nylon.

## **1.8 TRATAMENTO DAS LESÕES ASSOCIADAS AO HPV**

Há um verdadeiro paradoxo quanto à conduta terapêutica nas infecções por HPV. Existe um relativo consenso de que as lesões clínicas devem ser tratadas, mesmo sabendo-se que em até 80% das vezes ocorre regressão espontânea, e que essas lesões estão freqüentemente associadas aos HPV 6 e 11, considerados de baixo potencial oncogênico. Por outro lado,

há uma certa concordância entre os autores em não tratar as lesões subclínicas que, quando localizadas em colo uterino, regridem em cerca de 40% dos casos, embora em aproximadamente 10% evoluam para processos neoplásicos malignos (Maldonado, 1994).

A infecção genital por HPV, apesar dos inúmeros recursos terapêuticos disponíveis, constitui-se muitas vezes num verdadeiro desafio, devido à persistência do quadro ou freqüentes recidivas a que estão sujeitos alguns pacientes. A escolha do tratamento baseia-se em critérios tais como: aspecto clínico, localização, distribuição e principalmente, associação ou não à neoplasia intra-epitelial (Almeida Filho, Jacyntho, Maldonado, 1994[a]).

O arsenal medicamentoso inclui substâncias cáusticas como podofilina e ácido tricloroacético e produtos químicos como fluorouracil (5-FU) e thiotepa. Imunoterapia utilizando BCG, idoxuridina, isoprinosine, levamisole e interferon, podem ser tentados. Na terapêutica cirúrgica pode-se utilizar electrocauterização/criocauterização, excisão com alça diatérmica, laser ou excisão cirúrgica com bisturí (Robboy, Duggan, Kurman, 1988; Cotran, Kumar, Robbins, 1989; Almeida Filho, Jacyntho, Maldonado, 1994[a]).

## 1.9 PROFILAXIA DO HPV E DO CÂNCER DE CÉRVIX UTERINA

A exemplo das demais infecções transmitidas por via sexual, a prevenção do HPV baseia-se primordialmente na educação orientada para a prática do sexo seguro, estimulando o uso de preservativos e desencorajando a multiplicidade de parceria sexual.

De outro lado, o emprego regular da citologia cervical através da técnica de Papanicolaou, é fator fundamental na detecção precoce da neoplasia de colo uterino. Lesões precursoras, detectáveis por esse procedimento, iniciam geralmente em um período superior a 10-20 anos antes do aparecimento do câncer cervical (Kamb, 1995).

Para Almeida Filho, Jacyntho, Maldonado (1994[b]), mulheres que tiveram infecção genital por HPV considerados com potencial oncogênico devem ser monitoradas por toda a vida.

#### 1.10 JUSTIFICATIVA

O IOL, localizado em Belém, Pará, constitui-se dentro da região Amazônica, no maior centro especializado em diagnóstico e tratamento de processos malignos, registrando elevados índices de câncer em colo uterino. Por outro lado, o Instituto Evandro Chagas (IEC), localizado na mesma cidade, é referência laboratorial para o diagnóstico de HPV.

Diversos autores, em áreas geográficas diferentes, vêm apontando certos tipos de HPV como os principais agentes desencadeadores do processo de malignização em colo uterino, porém não temos conhecimento de pesquisas similares a esta em outras localidades do norte do Brasil.

Com base nas considerações acima expostas tornou-se premente a realização deste estudo com a finalidade de verificar a existência e a intensidade de tal associação na região, contribuindo para que novas pesquisas sejam desenvolvidas a partir dos resultados encontrados.

## 1.11 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo geral determinar a prevalência de HPV em mulheres com lesão de cérvix uterina, segundo diagnóstico histopatológico, em Belém, Pará, utilizando dois métodos diagnósticos: PCR e hibridização por *dot-blot*.

Os objetivos específicos compreendem:

-Detectar, pela técnica de hibridização por *dot-blot*, a frequência com que ocorrem os vários tipos de HPV.

-Estabelecer a prevalência de HPV por HIS e observar a sensibilidade dessa técnica em relação ao PCR.

-Verificar os dados epidemiológicos concernentes a:

-Número de parceiros sexuais.

-Idade do primeiro coito.

-Tabagismo.

-Número de filhos.

-Uso de anticoncepcional hormonal.



## 2 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2.1 POPULAÇÃO

A amostragem constituiu-se de 228 mulheres, que no período de março de 1992 a maio de 1996 foram encaminhadas ao Serviço de Ginecologia do IOL, na cidade de Belém, Pará, por apresentarem suspeita clínica e/ou laboratorial (citologia) de neoplasia maligna da cévix uterina. Após avaliação ginecológica e quando necessária, colposcópica, as pacientes foram submetidas à biópsia cervical.

Somente as mulheres que não haviam recebido tratamento antineoplásico anteriormente, foram convidadas a fazer parte da pesquisa. A totalidade delas concordou em participar do estudo, assinando termo de consentimento (Anexo 1) e respondendo à questionário (Anexo 2) para análise epidemiológica.

### 2.2 COLETA DO MATERIAL

Os espécimes estudados foram obtidos de colo uterino, por meio de biópsias e constituíram-se em:

- a) Um fragmento que foi fixado em formol tamponado e encaminhado ao Serviço de Patologia do IOL para diagnóstico histopatológico.

b) Outro fragmento, também fixado em formol tamponado, o qual foi transportado ao IEC onde, no Serviço de Patologia Geral, foi processado pela técnica de HIS.

c) Um terceiro fragmento foi armazenado a baixas temperaturas, em nitrogênio líquido, objetivando diagnóstico pela técnica de PCR no Serviço de Virologia Geral do IEC.

d) Posteriormente, amostras do material (já submetido à amplificação) foram encaminhados pelo Serviço de Virologia Geral do IEC ao Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, em São Paulo, para tipificação pela técnica de hibridização por *dot-blot*.

## 2.3 MÉTODOS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO

### 2.3.1 HIS

Os fragmentos de tecido foram processados por métodos histológicos e incluídos em parafina.

Posteriormente se produziram, da amostra de cada paciente, cinco lâminas de tecido sobre as quais se efetuou a pesquisa de diferentes tipos de HPV.

A técnica empregada foi não radioativa, segundo descrição de Beckmann *et al.*, 1985 (com modificações), utilizando-se kit comercial DIGENE TISSUE HYBRIDIZATION, fabricado em Maryland/U.S.A., com sondas para detectar HPV 6/11, 16/18 e 31 33/35 .

Resumidamente a técnica pode ser descrita em três etapas:

### 2.3.1.1 Pré-tratamento

As lâminas foram mergulhadas em xilol por duas vezes, com 10 minutos de duração cada. A seguir, processo semelhante foi realizado utilizando-se álcool absoluto. Após secarem por 10 minutos, as lâminas foram incubadas em solução de digestão a 37°C em banho-Maria por 10 minutos e, posteriormente, lavadas em solução tampão (*Buffer I*) por 1 minuto, álcool a 95% (1 minuto) e álcool absoluto (1 minuto). Secaram em temperatura ambiente por 10 minutos.

A finalidade dessa fase foi facilitar o acesso das sondas ao tecido.

### 2.3.1.2 Hibridização

Adicionou-se uma gota de cada sonda (controle positivo, controle negativo, HPV 6/11, HPV 16/18 e HPV 31/33/35) sobre as lâminas correspondentes a cada paciente. De maneira resumida, os componentes:

- lâmina (+) = sonda (+): controle positivo
- lâmina (-) = sonda (-): controle negativo
- lâmina 1 = sonda positiva p/ HPV 6 e 11
- lâmina 2 = sonda positiva p/ HPV 16 e 18
- lâmina 3 = sonda positiva p/ HPV 31, 33 e 35

Resumidamente a técnica pode ser descrita em três etapas:

### 2.3.1.1 Pré-tratamento

As lâminas foram mergulhadas em xilol por duas vezes, com 10 minutos de duração cada. A seguir, processo semelhante foi realizado utilizando-se álcool absoluto. Após secarem por 10 minutos, as lâminas foram incubadas em solução de digestão a 37°C em banho-Maria por 10 minutos e, posteriormente, lavadas em solução tampão (*Buffer I*) por 1 minuto, álcool a 95% (1 minuto) e álcool absoluto (1 minuto). Secaram em temperatura ambiente por 10 minutos.

A finalidade dessa fase foi facilitar o acesso das sondas ao tecido.

### 2.3.1.2 Hibridização

Adicionou-se uma gota de cada sonda (controle positivo, controle negativo, HPV 6/11, HPV 16/18 e HPV 31/33/35) sobre as lâminas correspondentes a cada paciente. De maneira resumida, os componentes:

- lâmina (+) = sonda (+): controle positivo
- lâmina (-) = sonda (-): controle negativo
- lâmina 1 = sonda positiva p/ HPV 6 e 11
- lâmina 2 = sonda positiva p/ HPV 16 e 18
- lâmina 3 = sonda positiva p/ HPV 31, 33 e 35

Os cortes de tecido foram cuidadosamente cobertos com lamínulas de 18x18 mm, evitando-se a formação de bolhas.

As lâminas foram depositadas em chapa quente a 96°C por 5 minutos e, a seguir, colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C por duas horas.

As lamínulas foram removidas em 200ml de solução tampão (*Buffer II*), a 37°C, e as lâminas lavadas em três banhos de solução tampão (*Buffer III*), por três minutos cada.

### 2.3.1.3 Detecção

Em cada lâmina adicionou-se uma gota do reagente de detecção. A seguir as lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, lavadas em três banhos de solução tampão (*Buffer III*), por 3 minutos cada, e incubadas em solução de substrato a 37°C, por 1 hora. Posteriormente, foram por três vezes imersas em água destilada, coradas por 1 minuto pela solução de contraste e novamente lavadas em 3 banhos de água destilada. Por fim foram passadas em álcool a 95% por 1 minuto, desidratadas em álcool absoluto por 1 minuto, clareadas em xilol por 1 minuto, montadas em resina sintética e analisadas ao microscópio óptico. A presença de DNA do HPV foi indicada pela observação de precipitado azul escuro nos tecidos onde a hibridização ocorreu.

## 2.3.2. Isolamento do DNA tissular

### 2.3.2.1 Extração

Os espécimes clínicos congelados foram rapidamente imersos em tubo de centrifuga de vidro, tipo corex ou em plástico resistente a solventes orgânicos, contendo 2 ml de tampão TE (10mM Tris HCl pH 7,4 1mM EDTA). As amostras que tinham tamanho maior do que o recomendado (3 a 6 mm) foram "trituras" com o auxílio de um bisturi, objetivando facilitar a digestão proteica. Em seguida foi adicionado 100 $\mu$ l de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% e 10 $\mu$ l de proteinase K 20mg/ml. A concentração final das duas substâncias foi de 1% e 100 $\mu$ g/ml, respectivamente. O material, depois de misturado, foi submetido a banho-Maria a 50-55°C, por 2 a 3 horas, ou até que a maioria do tecido tivesse sido digerida. Em alguns casos optou-se pela permanência das amostras a 37°C durante toda a noite.

Após a digestão, acrescentaram-se 2ml de fenol saturado (uma parte do material e uma parte de fenol), homogeneizando por 5 minutos e centrifugando por 5 minutos a 10.000 rpm. A fase aquosa (superior) foi removida para um novo tubo onde foram adicionados 2ml de clorofórmio/álcool isoamílico (diluição 25:1), agitando-se por 5 minutos e centrifugando-se a 10.000 rpm por mais 5 minutos. Em seguida a fase superior foi transferida para um novo tubo, desprezando-se apropriadamente os resíduos orgânicos.

### 2.3.2.2 Precipitação

Adicionou-se 0,2ml de acetato de sódio 3M e 5ml de etanol absoluto à fase aquosa, misturando-a por inversão. O material foi submetido a precipitação em  $-70^{\circ}\text{C}$ , por 2 horas, e centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ . A seguir desprezou-se o etanol, mantiveram-se os tubos invertidos para secar o *pellet* de DNA e suspendeu-se novamente em 50 a  $100\mu\text{l}$  de TE, transferindo-se para tubo de microcentrífuga de 1,5ml, tipo *Eppendorf*.

### 2.3.3. PCR

A técnica baseou-se em descrição de Manos *et al.* (1989).

Em um microtubo de polipropileno preparou-se a MIX cuja composição e volume para processamento de uma amostra foi a seguinte:

<u>Componente</u>	<u>Volume</u>	<u>Concentração final</u>
H <sub>2</sub> O bidestilada	35,75 $\mu\text{l}$	-
Sol.tampão(*)	5,00 $\mu\text{l}$	1x
dNTPs	5,00 $\mu\text{l}$	200,0 $\mu\text{M}$
Primer MY9	1,00 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Primer MY11	1,00 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
G73 (globina)	0,50 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
G74 (globina)	0,50 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Taq DNA polimerase	<u>0,25<math>\mu\text{l}</math></u>	1 unidade
	49,00 $\mu\text{l}$	

(\*)*10xbuffer* Taq (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, pH:8,3).

A mistura foi preparada na quantidade proporcional ao número de amostras a serem testadas de cada vez.

A seguir, distribuíram-se em cada tubo de 0,5ml, devidamente identificado, 49µl do MIX e 1µl da amostra do DNA a ser testado, obtendo-se assim o volume final de 50µl. Logo após adicionou-se a cada frasco uma gota de óleo mineral (Nujol) para evitar evaporação do material durante a reação.

Levaram-se os frascos a um aparelho ciclador de temperatura programável (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus), onde foram submetidos à ciclos, obedecendo ao seguinte esquema:

<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>	<u>Efeito</u>
94°C	1 min	Desnaturação
55°C	1 min	Pareamento
72°C	2 min	Polimerização
72°C	10 min	Polimerização (final, 1 ciclo)

O tempo de duração do processo foi de aproximadamente 3 horas.

Após eletroforese em gel de agarose a 2% os produtos da PCR foram corados em solução de brometo de etídio e visualizados à luz ultravioleta.



Durante a manipulação dos espécimes para extração do DNA e preparo da técnica de PCR, foram tomadas precauções com a finalidade de evitar-se contaminação do material. Tais cuidados incluíram: uso de luvas, trocadas a intervalos constantes, e utilização de ambientes físicos diferentes para cada etapa (isolamento do DNA, preparo da reação e preparação dos géis que determinam a separação eletroforética dos produtos da PCR) do processo.

Como controle de qualidade do DNA extraído de cada espécime, utilizaram-se *primers* capazes de amplificar um fragmento do gene da globina humana. Os resultados da pesquisa do HPV foram emitidos quando observou-se o produto específico desse gene, assegurando-se não se tratar de reações falso-negativas. Nas amostras onde não foi observada amplificação do gene da globina, o que ocorreu em um número reduzido de casos, repetiu-se o ensaio, alterando-se a concentração de DNA do espécime.

Em todos os ensaios de PCR foram empregados controles positivos (células He-la ou células Caski) e negativos (água).

### **2.3.4 Hibridização por *dot-blot***

Com base na descrição de Manos *et al.* (1989), com modificações, realizou-se a técnica a seguir descrita:

Utilizaram-se oligonucleotídeos específicos tornados radioativos pela incorporação de P32 em uma reação que envolveu a T4 polinucleotídeo quinase. Empregaram-se sondas específicas para os seguintes tipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59,

66, 68, 70, 72, 73, Pap.155, Pap.291, W13B (os três últimos são tipos ainda não classificados) e sonda genérica.

A décima parte do volume da PCR foi desnaturada em placa de ELISA com NaOH. Pipetou-se a mistura sobre uma membrana de nylon ajustada a uma placa de acrílico (*dot-machine*), ligada constantemente ao vácuo. A membrana foi removida com vácuo ainda ligado e colocada sobre um papel de filtro para marcar as posições das amostras. Fixou-se o DNA expondo a membrana à luz ultravioleta por 5 minutos. Colocou-se a membrana em saco plástico com solução de hibridização: [6 x solução citrato salina padrão (SSC): (NaCl → 900mM, Na citrato → 90mM); 10 x Denhardt's: (0,2% de soro de albumina, 0,2% de polyvinylpirrolidona, 0,2% ficoll); 0,5% de SDS, 100µg/ml de esperma de salmão desnaturado] e incubou-se por 3 horas a 56°C. A seguir a sonda radioativa foi adicionada ao interior do saco plástico junto com a solução de hibridização e incubada por 12-18 horas a 56°C. Após a hibridização as membranas foram removidas do saco plástico e lavadas a temperatura ambiente por duas vezes, por 15 minutos cada, seguindo-se duas vezes a 56°C por 20 minutos, com uma solução de 2 X SSC e 0,1% SDS. No final as membranas foram expostas a filmes de raio X por períodos de 12 a 24 hs.

A seguir a tipagem dos HPV foi realizada nas amostras que amplificaram ou não 450 pares de bases da região L1 dos HPV.

## 2.4 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística deste estudo compreendeu:

Determinação de médias aritméticas, desvios padrões e medianas das idades das pacientes integrantes dos 3 grupos estudados.

Determinação da média de idade ao primeiro coito, da média de parceiros sexuais e da média de gestações das mulheres pertencentes aos três grupos.

Os dados acima descritos foram analisados com o recurso *software Epi-Info* (versão 6.0).

Verificação da probabilidade da detecção de HPV na presença de lesão cervical neoplásica (Probabilidade condicional-Regra de Bayes).

Determinação da diferença entre a sensibilidade das técnicas de PCR e HIS (Teste de *Mc Nemar* dos Pares Discordantes).

Estabeleceu-se em 0,05 (5%) o nível alfa de rejeição da hipótese de nulidade.

### 3 RESULTADOS

As 228 pacientes estudadas foram reunidas em 3 grupos (A, B e C) conforme diagnóstico histopatológico. Do grupo A (155/228) fizeram parte aquelas com adenocarcinoma (5/155) ou com carcinoma epidermóide invasor (150/155). As com NIC II (1/54) ou com NIC III (53/54) foram incluídas no grupo B (54/228), e as com cervicite crônica constituíram o grupo C (19/228).

A idade das mulheres variou de 16 a 86 anos. Os valores das médias, desvios padrões e medianas são observados na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição da idade (em anos) das pacientes, segundo os grupos estudados\*, Belém, Pará, 1992-1996.

Grupos	Intervalo	Média	Desvio padrão	Mediana
A	23-86	51,5	14,3	51
B	16-76	43,6	11,9	43
C	25-84	44,3	13,8	41
Total	16-86	49,0	14,1	48

\*Ambulatório do IOL.

No que diz respeito ao estado civil, observou-se que 66,7% (152/228) eram casadas ou viviam em regime de concubinato. Em uma das

pacientes este dado não foi conhecido. As restantes (75/228) eram solteiras, viúvas, divorciadas ou separadas.

Quanto a profissão que exerciam, observamos que um elevado contingente (77,6%) dedicava-se a tarefas do lar, 30,7% (70/228) em seu próprio domicílio e 46,9% (107/228) como empregada doméstica. Cerca de 10% referiram ser lavradoras. As demais, com exceção de duas onde a ocupação não foi determinada, dedicavam-se a diversas atividades.

A grande maioria das pacientes teve como procedência o Estado do Pará (90,4%). Esse dado não foi identificado em 5,7% (13/228) delas. As restantes (9/228) tiveram como origem os estados do Maranhão, Amapá, Acre e Paraíba. Belém foi a cidade que contribuiu com o mais elevado percentual de mulheres (28,9%).

Todas as amostras foram testadas pela técnica de PCR, enquanto que pela hibridização por *dot-blot*, devido a fatores tais como insuficiência de material ou espécime clínico inadequado para estudo, analisaram-se 147 (de um total de 150) no grupo A, 49 (das 54) no grupo B e 17 (das 19) no grupo C (dados não exibidos em tabela).

Consideraram-se positivas para HPV as amostras nas quais a presença do vírus foi detectada por PCR e *dot-blot* (136/228), aquelas positivas por *dot-blot* e negativas por PCR (10/228), e as positivas por PCR e não testadas por *dot-blot* (4/228).

A prevalência de HPV na população estudada foi de 70,3% (109/155) no grupo A, 63,0% (34/54) no B e 36,8% (7/19) no C (Tabela 2). Verifica-se ainda, na mesma tabela, que o grupo A se constituiu

predominantemente de mulheres com diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermóide invasor (150/155), enquanto que o grupamento B foi representado quase que exclusivamente por pacientes com NIC III (53/54).

Aplicando-se testes estatísticos (Regra de Bayes), a probabilidade de detectar-se HPV, dada a presença de carcinoma (grupo A) ou NIC II/NIC III (grupo B) foi de 0,806 (80,6%).

Tabela 2- Prevalência de HPV em lesões de cérvix uterina, pelas técnicas de PCR e hibridização por *dot-blot*, segundo os grupos estudados\*, Belém, Pará 1992-1996

Grupos	Diagnóstico Histopatológico	n	Presença de HPV		Ausência de HPV	
			Nº	%	Nº	%
A	Adenocarcinoma	5	4	80,0	1	20,0
	Ca epid. Invasor•	150	105	70,0	45	30,0
	Sub-total	155	109	70,3	46	29,7
B	NIC II	1	1	100,0	0	0,0
	NIC III	53	33	62,7	20	37,3
	Sub-total	54	34	63,0	20	37,0
C	Cervicite Crônica	19	7	36,8	12	63,2
Total		228	150	65,8	78	34,2

\*Ambulatório do IOL

•Carcinoma epidermóide invasor

A Tabela 3 mostra que no grupo A 100 amostras foram positivas pelas técnicas de PCR e *dot-blot*; em 6 o HPV foi detectado por apenas uma das técnicas (*dot-blot*); e em 3 amostras positivas por PCR não se realizou *dot-blot*. No grupo B, o DNA do vírus foi detectado por ambas as técnicas em 30 amostras; em 3, somente por *dot-blot*; e em uma por PCR. Em 6 amostras do grupo C obteve-se resultados positivos pelos dois métodos; e em uma o PCR mostrou-se negativo e o *dot-blot* positivo.

Ignorando-se as 4 amostras em que a hibridização por *dot blot* não foi realizada, verificamos que nas 146 restantes, a técnica de PCR deixou de detectar HPV em 10 delas, representando um percentual de discordância entre os testes da ordem de 6,8%.

Tabela 3- Presença de HPV em lesões de cérvix uterina, pelas técnicas de PCR e hibridização por *dot-blot*, segundo os grupos estudados\*, Belém, Pará, 1992 -1996.

Grupos	Positivas por <i>dot-blot</i> e PCR	Positivas por <i>dot-blot</i> e negativas por PCR	Positivas por PCR e <i>dot-blot</i> não realizado	Total
A	100	6	3	109
B	30	3	1	34
C	6	1	-	7
Total	136	10	4	150

\*Ambulatório do IOL

A Figura 1 demonstra que nas 106 amostras pertencentes a mulheres do grupo A, em que o HPV foi detectado por *dot-blot*, encontrou-se nítido predomínio do tipo 16 com 60,4% do total (64/106); o HPV 18 contribuiu com 11,3% (12/106), incluindo-se neste grupo 1 espécime que foi simultaneamente positivo para HPV 6, 11 e 18. Os HPV 31, 33, 45, 52, 58, 59, 73 representaram em conjunto 18,9% (20/106), sendo que o HPV 73 contribuiu com apenas 0,9% (1/106) e em 9,4% (10/106) houve reação positiva na sonda genérica, significando, provavelmente, a presença de outros tipos de HPV para os quais sondas moleculares específicas não estão disponíveis.

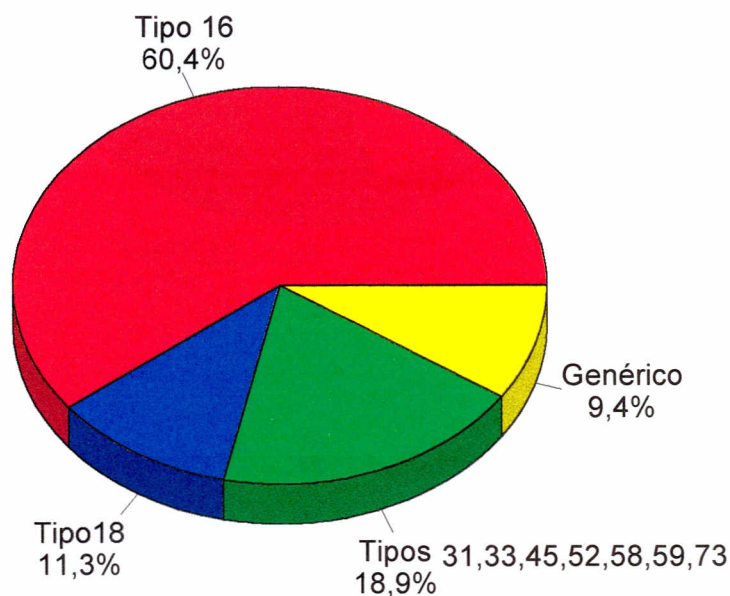


Figura 1- Tipos prevalentes de HPV em 106 amostras de pacientes do grupo A\*, pela técnica de hibridização por *dot-blot*, Belém, Pará 1992-1996.

\*Ambulatório do IOL



Nas 33 amostras oriundas de mulheres do grupo B, em que a hibridização por *dot-blot* foi positiva, observa-se (Figura 2) que o HPV 16 representou 54,5% (18/33), o HPV 18 apenas 3% (1/33); os HPV 31, 33 e 58 concorreram com 21,2% (7/33) e, em 21,2% (7/33) a presença de HPV foi detectada apenas pela sonda genérica.

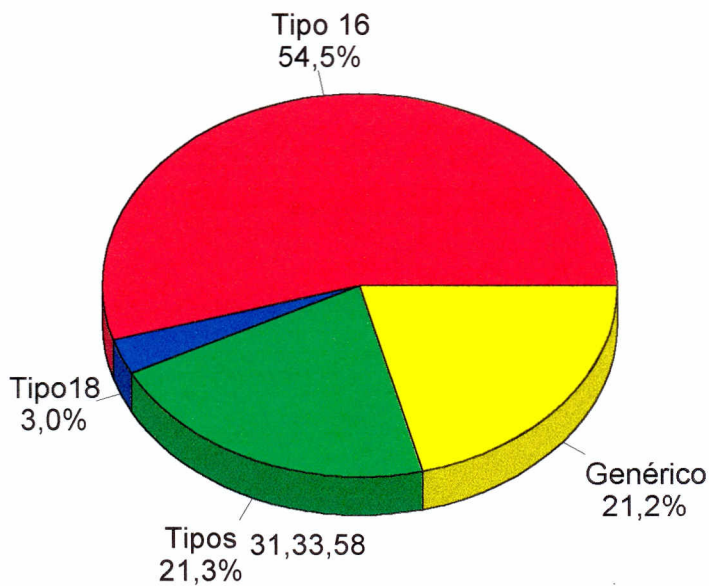


FIGURA 2- Tipos prevalentes de HPV em 33 amostras de pacientes do grupo B\*, pela técnica de hibridização por *dot-blot*, Belém, Pará, 1992-1996.

\*Ambulatório do IOL

No grupo C, das 7 amostras positivas por *dot-blot*, 5 (71,4%) pertenciam a um dos seguintes tipos: 16, 18 e 33. A sonda genérica exibiu-se positiva em 2 casos (dados não exibidos em figura).

Em 155 das amostras testadas pelo PCR procedeu-se, também, ao teste de HIS com a finalidade de comparar as duas técnicas. Pela técnica de PCR detectou-se o HPV em 65,2 % (101/155), enquanto que pela hibridização *in situ* o percentual caiu para 17,4% (27/155), sendo esta diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ) pelo teste de *Mc Nemar* (Tabela 4).

TABELA 4- Prevalência de HPV pelas técnicas de PCR e HIS em amostras de pacientes com lesões de cérvix uterina\*, Belém, Pará, 1992-1996.

PCR	HIS				Total	
	Positivo		Negativo		N°	%
	N°	%	N°	%		
Positivo	24	15,5	77	49,7	101	65,2
Negativo	03	1,9	51	32,9	54	34,8
Total	27	17,4	128	82,6	155	100,0

\*Ambulatório do IOL.

Na Figura 3 observa-se fotomicrografia de tecido cervical com processo neoplásico maligno, processado pela técnica de hibridização *in situ*. A coloração escura, visível no núcleo de algumas células epiteliais é indicativa da presença de DNA de HPV.

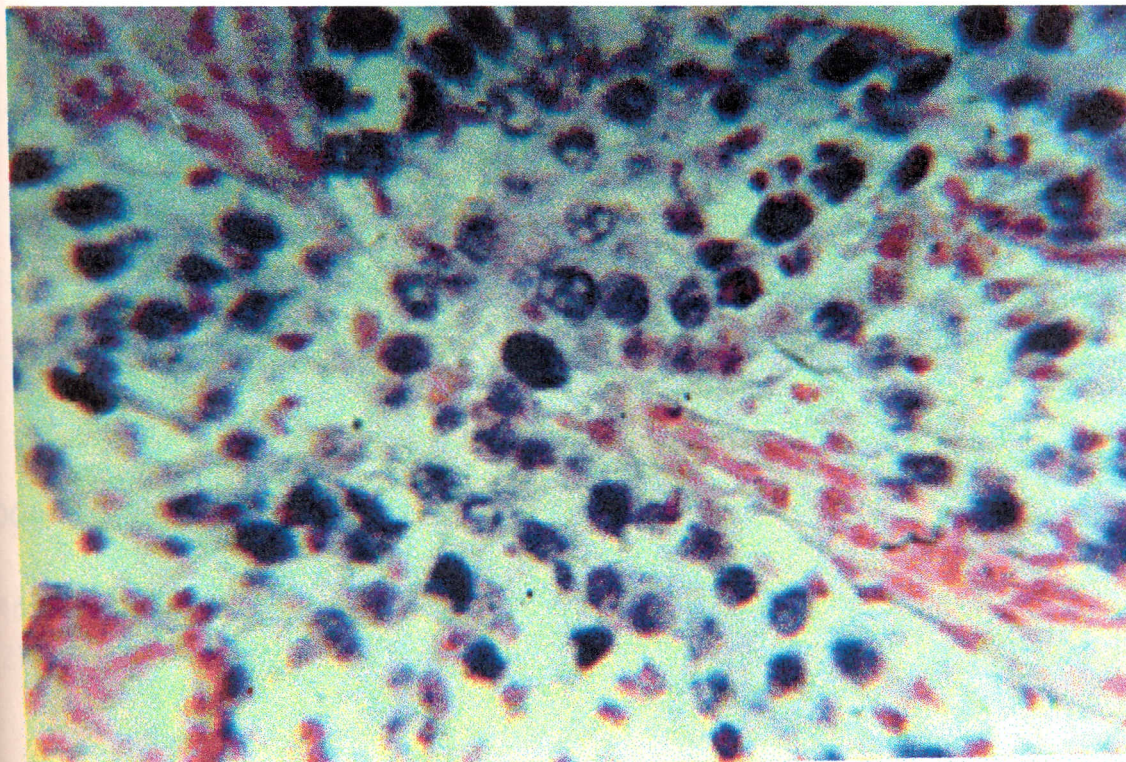


Figura 3- Fotomicrografia de tecido de carcinoma epidermóide invasivo de cérvix uterina, positivo para HPV, hibridizado *in situ* com sonda biotinilada correspondente aos HPV tipo 31/33/35 (Digene Diagnosis Inc., Silver Spring, USA)

Após a realização da técnica de PCR, as misturas da reação foram testadas para sinais positivos em gel de eletroforese e hibridização por *dot-blot*. As amostras que revelaram bandas bem definidas na eletroforese e/ou sinais de hibridização, foram interpretadas como positivas para infecção por HPV.

As Figuras 4 e 5 são representativas de tais ensaios. Observe-se, no entanto, que devido ao grande número de sondas empregadas, a interpretação da hibridização por *dot-blot* se baseia na análise de vários autoradiogramas (não apresentados).

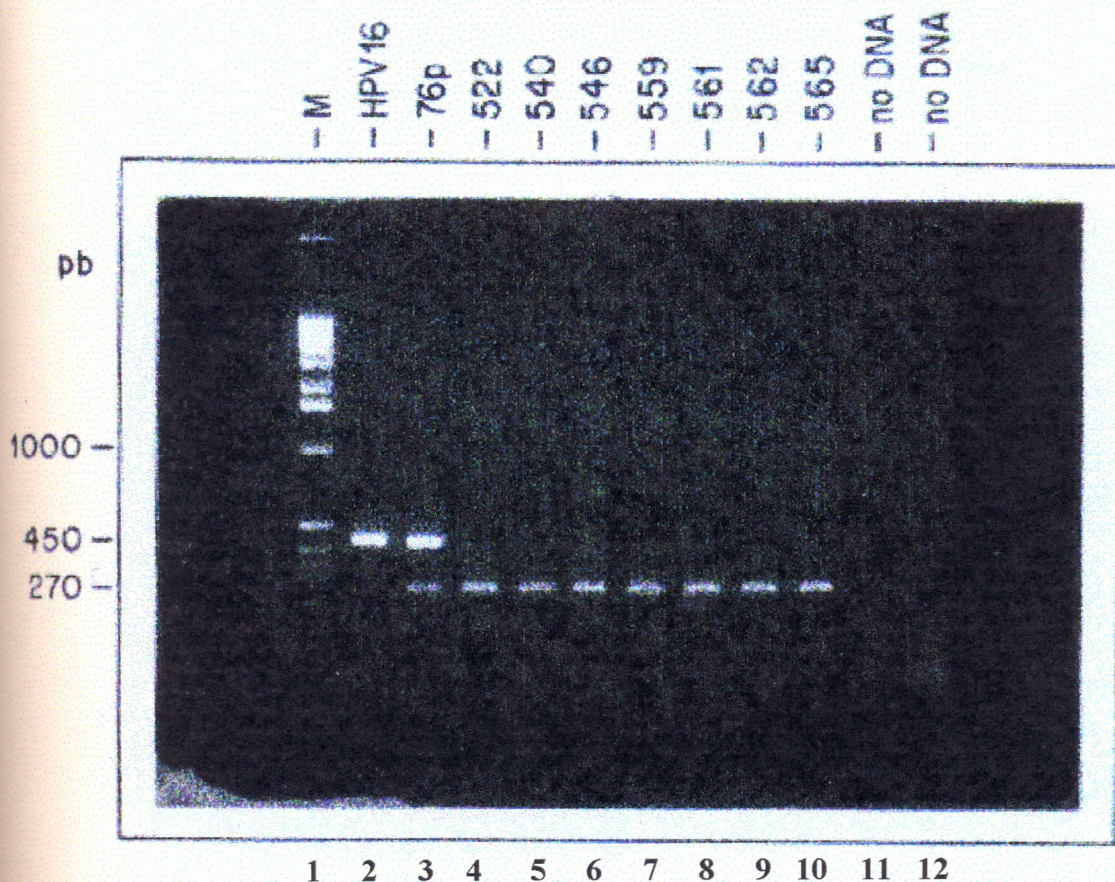


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA de HPV (obtidos de biópsia) amplificados por PCR. Observa-se na linha 1, o marcador de peso molecular (Phi-X/Hae III); na 2, o controle positivo de DNA de HPV 16; nas linhas de 3 a 10, as amostras; nas 11 e 12 os controles negativos de DNA.

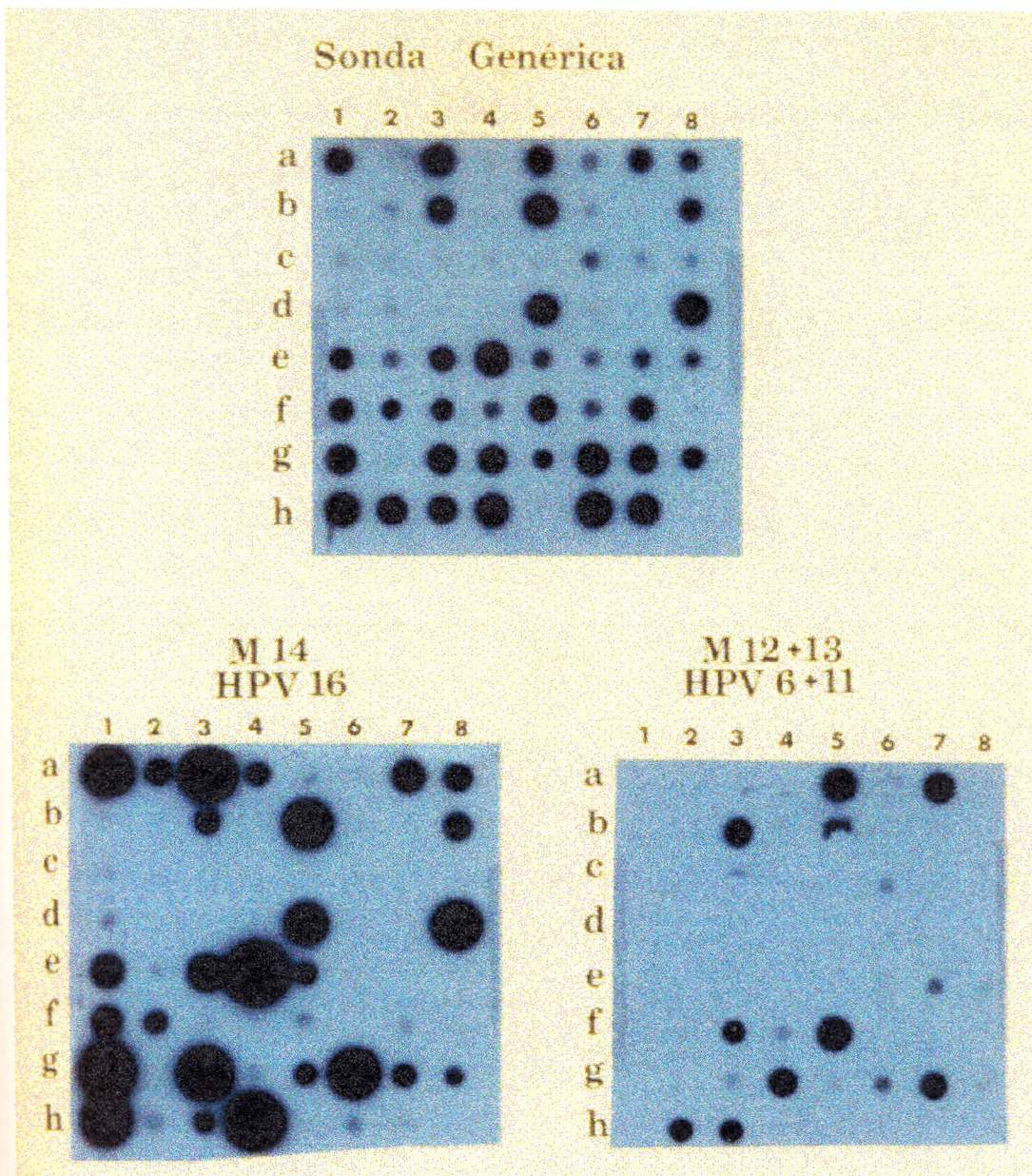


Figura 5- Autoradiograma representativo de filtros hibridizados por *dot-blot* com sondas genéricas marcadas radioativamente (superior) e sondas específicas para HPV 16 e 6+11, também marcadas com isótopo radioativo (inferior). Nas posições h2 e h3 encontram-se os controles de HPV 6 e 11, respectivamente, em h1 e h4 os de HPV 16, em h8 estão os controles negativos. Nas posições d5 e d8 foram aplicados os produtos de PCR Derivados das amostras das pacientes 1 e 26, ambos mostram claramente hibridização positiva com a sonda genérica e com a sonda específica de HPV 16.

A Tabela 5 exibe, em cada grupo estudado, a idade em que as pacientes iniciaram a atividade sexual, assim como o número de parceiros e o número de gestações.

Tabela 5- Idade (em anos) do 1º coito, nº de parceiros e nº de gestações, segundo os grupos estudados\*, Belém, Pará 1992-1996.

Grupos	Idade do 1º coito		Nº de parceiros		Nº de gestações	
	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média
A	(146) 11-28	16,7	(145) 1-30	2,9	(153) 0-18	8,0
B	(48) 10-23	16,5	(46) 1-50	4,4	(51) 0-15	6,6
C	(19) 13-27	17,6	(17) 1-30	4,6	(19) 2-17	6,7

\* Ambulatório do IOL.

( ) número de mulheres analisadas.

A Tabela 6 mostra a distribuição de algumas das variáveis epidemiológicas associadas com processos neoplásicos malignos, por grupo de estudo.

Tabela 6- Distribuição de fatores epidemiológicos de risco para lesões malignas em cérvix uterina, por grupos estudados\*, Belém, Pará, 1992-1996.

Variáveis Epidemiológicas	Grupos					
	A		B		C	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Idade do 1º coito						
≤15	60	41,1	17	35,4	3	15,8
>15	86	58,9	31	64,6	16	84,2
Nº de parceiros						
1-3	121	83,4	34	73,9	13	76,5
4 ou mais	24	16,6	12	26,1	4	23,5
Nº de gestações						
<6	47	30,7	23	45,1	6	31,6
≥6	106	69,3	28	54,9	13	68,4
Uso de Anticoncepcional hormonal						
Sim	31	20,8	18	41,0	12	66,7
Não	118	79,2	26	59,0	6	33,3
Tabagismo						
Sim	68	43,7	27	51,6	7	36,8
Não	85	56,7	25	48,1	12	63,2

\*Ambulatório do IOL

#### 4 DISCUSSÃO

Os HPV no presente estudo foram detectados em 70,3% (Tabela 2) das amostras pertencentes a mulheres com lesão carcinomatosa (Grupo A). Tal índice está em concordância com o referido pela literatura especializada que situa a prevalência na faixa de 70 a 90% quando utilizadas técnicas laboratoriais similares, em sensibilidade, às empregadas nesta pesquisa. De Brinton *et al.* (1993) e Muñoz *et al.* (1993), utilizando técnica de PCR em espécime clínico, obtido por meio de biópsia de cérvix uterina, apresentaram resultados que consubstanciam nossos dados. Percentuais dentro dos mesmos níveis foram também encontrados em material coletado por meio de *swabs* ou *scrapes* de região cervical (Bosch *et al.*, 1992; Eluf Neto *et al.*, 1994).

Considerando as pacientes com adenocarcinoma isoladamente, verificamos alta prevalência de HPV entre as mesmas. Milde-Langosch *et al.* (1993) registraram, em estudo realizado na Alemanha, percentual de 64%.

O grupo B, constituído quase que exclusivamente de mulheres diagnosticadas como portadoras de NIC III (apenas uma possuía NIC II), apresentou 63% de amostras positivas para HPV (Tabela 2). Estabelecendo comparação com o trabalho de Muñoz *et al.* (1993), verificamos que esses autores encontraram prevalência de 70,7% e 63,2% em pacientes com Ca *in situ* estudadas na Espanha e Colômbia respectivamente.

Cumpramos ressaltar que as alterações designadas como Ca *in situ* e displasia severa (Reagan, Seidmann, Saracusa, 1993), em virtude do elevado



grau de dificuldade na distinção histopatológica que por vezes apresentam, passaram a ser mais freqüentemente agrupadas sob a denominação de NIC III (Richart, 1967), daí a comparação estabelecida entre os resultados locais e aqueles de Muñoz *et al.* (1993).

É pertinente comentar, entretanto, que resultados positivos superiores a 90% já foram detectados. Young *et al.* (1989), por exemplo, demonstraram prevalência de 100% em mulheres com diagnóstico citológico anormal. Os achados de Liaw *et al.* (1995) em amostragem agrupando mulheres com NIC II, NIC III e carcinoma invasivo revelaram prevalência de 92%. Tais autores procederam a pesquisa de HPV em amostras coletadas por esfregaço de cérvix uterina. Na Hungria, Kónya *et al.* (1995) registraram presença de HPV em 98% das amostras, obtidas por meio de biópsia, de pacientes com carcinoma cervical invasivo. Em estudo realizado com mais de 1000 espécimes clínicos oriundos de mulheres com carcinoma invasivo de colo uterino, residentes em 22 diferentes países, encontrou-se DNA de HPV em 93% das amostras (Bosch *et al.*, 1995), não sendo registrada diferença significativa entre os percentuais dos diversos países.

A identificação de 10 amostras que, testadas por PCR não revelaram HPV, mas ao serem analisadas por *dot-blot* foram positivas (Tabela 3), pode ser explicada pelo maior poder de resolução desta última técnica quando aplicada em material previamente submetido à técnica de PCR, ou seja, um método de hibridização executado em material amplificado, pode ser mais facilmente visualizado que o sinal demonstrado na leitura em gel de agarose. Estima-se a possibilidade da ocorrência deste evento em cerca de 4

a 10% dos espécimes clínicos testados (Luísa Villa, comunicação pessoal), portanto de acordo com o índice de 6,8% aqui encontrado.

A caracterização antigênica dos HPV, revelando nítida predominância do tipo 16 em lesões neoplásicas, foi de cardinal importância (Figura 1 e Figura 2), pois demonstrou que os achados em nossa região corresponderam aos que vêm sendo registrados por diversos autores em áreas geográficas distintas (Muñoz *et al.*, 1993; Eluf Neto *et al.*, 1994). Estudo realizado em Barbados com 20 mulheres portadoras de carcinoma em região genital (19 das quais em cérvix uterina), demonstrou presença de HPV 16 em 65% dos casos (Prussia, ter Schegget, Smits, 1993). A pesquisa de Bosch *et al.* (1995), já referida anteriormente, detectou que 50% das amostras testadas foram positivas para HPV 16.

Contrariamente ao que foi observado nos resultados de Chang *et al.*, 1997, em Taiwan, o presente estudo não registrou (com exceção de um caso positivo para HPV 6, 11 e 18) infecções múltiplas, ou seja, presença de mais de um tipo de HPV na mesma amostra.

Ainda em relação aos tipos de HPV, notamos que cerca de 90% e 79% dos identificados nos grupos A e B, respectivamente, são considerados de risco para processos malignos e lesões precursoras em região genital (Liaw *et al.*, 1995). Nesse contexto, nossos percentuais situam-se entre os de Eluf-Neto *et al.* (1994) e Liaw *et al.* (1995). Os primeiros registraram que entre mulheres com carcinoma de colo uterino e portadoras de HPV, o percentual de amostras positivas para os tipos 16, 18, 31, 33, foi de 78%. O segundo trabalho, efetuado em grupamento de pacientes com diagnóstico de NIC II,

NIC III e carcinoma invasor, demonstrou que, aquelas positivas para HPV estavam infectadas com tipos considerados de risco para progressão oncogênica em 98% dos casos. Dados oriundos de estudo piloto conduzido por Mello *et al.*, 1992, em Belém, revelaram que os tipos 16 e 18, sabidos de nítido potencial oncogênico, estavam presentes em 20% das amostras. Acreditamos que a utilização de técnica comprovadamente menos sensível (HIS) tenha sido fator decisivo para justificar o percentual encontrado. Possivelmente a reduzida amostragem (espécimes clínicos de 10 pacientes) e o fato da pesquisa desses autores ter abrangido lesões neoplásicas de toda área ano-genital, e não somente da cérvix uterina, também contribuíram para esse resultado.

O registro de amostras positivas apenas com a sonda genérica, que correspondeu a 9,4% e 21,2% nos grupos A e B respectivamente (Figura 1 e Figura 2), sugere o envolvimento de outros tipos de HPV cujas sondas moleculares não estão disponíveis.

Vale destacar nesta investigação, a presença relativamente elevada de HPV considerados de alto risco para o desenvolvimento de processos cervicais malignos, em mulheres com diagnóstico histopatológico de cervicite crônica, embora a detecção de HPV em pacientes com alterações mínimas e mesmo sem alterações de colo uterino, não se constitua em um achado extraordinário (de Villiers *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1993; Shroyer *et al.*, 1993; Cavalcanti *et al.*, 1994 ; Liaw *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1997). Os estudos de Venuti *et al.* (1994), mostraram prevalência de 27% para os tipos 16 e 18, pela técnica de HIS, em material proveniente de mulheres com cérvix

uterina morfológicamente normal. Resultados interessantes foram publicados por Roteli-Martins *et al.* (1996), em São Paulo. Esses autores detectaram prevalência de HPV com potencial oncogênico em 38% das amostras com diagnóstico histopatológico de cervicite. Em nossa casuística o percentual de HPV foi de 37% (7/19), sendo que em 26% (5/19) os tipos corresponderam aos associados a processos carcinogênicos e em 11% (2/19) não foi possível identificar-se o HPV presente no material examinado; logo, se levamos em conta apenas aqueles em que o HPV foi detectado (7/19), verificaremos que em 71% (5/7) deles confirmou-se tipos relacionados a processos malignos.

Aplicando-se a técnica de HIS em 155 amostras pertencentes aos 3 grupos do presente estudo (Tabela 4), verificamos que o percentual de resultados positivos (17,4%) mostrou-se inferior ao descrito pela maioria dos autores (de Villiers *et al.*, 1987; Cavalcanti *et al.*, 1994; Cavalcanti *et al.*, 1996).

Comparando-se os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e HIS nas 155 amostras de nosso estudo, testadas pelos dois métodos (Tabela 4), verificamos divergentes prevalências de HPV. A explicação poderia, em princípio, ser encontrada no fato da HIS, ao contrário da técnica de PCR, ter tido a chance de detectar apenas 7 tipos de HPV, resultando no baixo percentual de HPV registrado por essa metodologia. Cumpre esclarecer, entretanto, que os tipos predominantes em nosso estudo (determinados pela técnica de hibridização por *dot-blot*), foram essencialmente aqueles identificáveis por HIS. Tal fato reforça a idéia de que a expressiva diferença entre os dois métodos seja decorrente, principalmente, do fator sensibilidade, este, reconhecidamente superior com a técnica de PCR.

Outro fator que deve ser considerado em relação ao que é discutido no parágrafo anterior, seria a possibilidade do material submetido à HIS ter sofrido alterações, visto ter sido fixado em parafina (Luísa Villa, comunicação pessoal). Ao contrário, as amostras submetidas ao PCR, foram armazenadas sob congelamento.

Corroborando nossos achados, no que diz respeito ao baixo percentual registrado pela HIS, Meyer *et al.*, 1993, detectaram prevalência de HPV em 19% de amostras com diagnóstico histopatológico de NIC II e NIC III. Nos mesmos espécimes, porém, esse percentual subiu para 69%, quando utilizada a técnica de Vira Pap.

Quanto ao registro de 3 amostras positivas pela HIS e negativas por PCR, a justificativa que nos parece plausível é a de que, no fragmento encaminhado para HIS havia HPV, enquanto naquele enviado para PCR (provavelmente oriundo de outro sítio anatômico na cérvix uterina), o DNA viral estava ausente.

Além do HPV, outros fatores são, em diversos estudos, associados a processos malignos de colo uterino admitindo-se que, muitas vezes, atuem como importantes co-fatores na evolução do processo.

No que diz respeito à idade de iniciação da atividade sexual, chama a atenção, neste estudo, o percentual de pacientes (dos grupos A e B) cujo primeiro coito se deu com 15 anos ou menos (Tabela 6). Peters *et al.*, 1986, Brinton *et al.*, 1987, Brock *et al.*, 1989, Parazzini *et al.*, 1992, Liaw *et al.*, 1995, mesmo estabelecendo "níveis de cortes", para efeito de comparação, em

idades acima da por nós considerada (ou seja por volta dos 16 aos 19 anos), encontraram prevalências consideravelmente inferiores (de 11% a 21%).

Estudos conduzidos em diversas regiões do mundo demonstram a influência da iniciação sexual precoce no desenvolvimento de neoplasia cervical maligna. Parazzini *et al.* (1992) encontraram maior risco em desenvolvimento de processo cervical oncogênico em mulheres que tiveram o primeiro coito antes dos 18 anos. Os estudos de Peters *et al.* (1986) em Los Angeles, U.S.A., por sua vez consubstanciaram tais observações. Brinton *et al.* (1987) e Brock *et al.* (1989) verificaram tal associação, em estudos similares, embora esta se tornasse menos expressiva quando ajustada para outras variáveis. São dignos de nota, entretanto, achados divergentes dos anteriores, que não revelam influência da precocidade na iniciação sexual para o desenvolvimento de malignidade em cérvix uterina (Jones *et al.*, 1990).

Ao contrário das pacientes dos grupos A e B, a maioria das pertencentes ao grupo C, referiram ter iniciado a atividade sexual com mais de 15 anos. No entanto, a média de idade ao 1º coito ainda pode ser considerada baixa (Tabela 5).

Embora o elevado número de parceiros sexuais seja fortemente relacionado ao surgimento de lesões cancerígenas e suas precursoras (Jones *et al.*, 1990; Parazzini *et al.*, 1992), verificamos que a grande maioria das pacientes informou ter tido no máximo 3 parceiros (Tabela 6). Esse questionamento, entretanto, por tratar-se de assunto de foro íntimo, suscita dúvidas quanto à precisão das respostas, sendo plausível admitir-se subestimativa dos dados disponíveis. A média de parceiros registrada, em

relação às mulheres dos grupos B e C, deve ter sido influenciada pelos valores extremos de 50 e 30 parcerias sexuais, em uma amostragem um tanto reduzida em relação a do grupo A (Tabela 5).

São dignos de nota, por outro lado, dados de Liaw *et al.* (1995). Esses autores encontraram relato de monogamia em 100% das mulheres incluídas como caso em sua pesquisa, as quais, mesmo assim, apresentaram alta prevalência de HPV (92%).

Achados como o acima referido levam à suspeição de que o comportamento sexual dos parceiros dessas mulheres pode influenciar sobretudo o aparecimento de neoplasias. Buckley *et al.* (1981), em estudo caso-controle, encontraram risco estatisticamente maior de doença cervical neoplásica em mulheres cujos companheiros referiam história de contato sexual com 6 ou mais parceiras.

No que concerne à gravidez, chamamos a atenção para o fato de cerca de 2/3 das mulheres de nossa casuística terem referido 6 ou mais gestações (Tabela 6), com média de 8 no grupamento A (Tabela 5). Essa frequência foi sobretudo mais elevada às referidas por vários autores (Brock *et al.*, 1989, Jones *et al.*, 1990). Peters *et al.* (1986), registraram índice de 39% em mulheres latinas e não latinas de Los Angeles.

O percentual de mulheres pertencentes ao grupo A que admitiram haver usado anticoncepcional hormonal (oral e/ou injetável) em alguma época de suas vidas foi o mesmo revelado por De Brinton *et al.* (1993) em pacientes com câncer cervical no Panamá, ou seja, 21%. Autores como Brinton *et al.* (1987), por sua vez, assinalaram frequência mais elevada (43%). Observamos

ainda que as mulheres dos grupos B e C apresentaram prevalência superior às do grupo A (Tabela 6). Acreditamos que tais resultados foram diretamente influenciados, não só pela diferença no tamanho das amostras, mas principalmente, pela idade das pacientes. Com efeito, as do grupo A, além de representarem cerca de 2/3 de toda a população estudada, exibem idade média superior às dos demais grupos (Tabela 1), caracterizando um expressivo contingente de mulheres que passou pela fase reprodutiva de suas vidas antes do advento dos anticoncepcionais hormonais.

O uso de anticoncepcionais entre as mulheres desta pesquisa, principalmente naquelas do grupo A, parece pouco freqüente se estabelecermos comparações com as taxas encontradas por outros autores. Jones *et al.*, (1990), estudando portadoras de carcinoma *in situ* nos EUA verificaram que 70% delas tinham história de uso de pílulas anticoncepcionais. A idade média dessas mulheres (38,7anos) e a área geográfica justificam tal diferença.

As pacientes dos grupos A e B com história de tabagismo representaram 44% e 52%, respectivamente (Tabela 6). As do grupo C contribuíram com percentual mais baixo. Os estudos de La Vecchia *et al.* (1986), realizados na Itália, demonstraram que 33% e 52% das mulheres com carcinoma invasivo e NIC respectivamente, eram ou tinham sido fumantes. Vários pesquisadores, em estudos controlados (La Vecchia *et al.*, 1986 Cuzick, *et al.*, 1990, Parazzini *et al.*, 1992), têm registrado relação direta entre tabagismo e alteração maligna cervical.



Acreditamos que os resultados aqui discutidos reforçam a correlação dos HPV no desenvolvimento de lesão maligna de cérvix uterina, assim como ressaltam a importância de contínuas pesquisas abrangendo as diversas áreas sobre o assunto. A nível local, acreditamos no prosseguimento deste estudo a partir de levantamento soro epidemiológico, utilizando amostras de soro que encontram-se estocadas, pertencentes às mulheres que fizeram parte desta pesquisa.

A magnitude com que as lesões cervicais malignas se expressam, impõe que todos os esforços sejam viabilizados na tentativa de um maior conhecimento sobre os HPV, abrindo-se, desse modo, perspectivas para a elaboração de uma vacina eficaz.

## 5 CONCLUSÕES:

1- Os HPV foram detectados em 70,3%, 63,0% e 36,8% das amostras de cérvix uterina, pertencentes a mulheres dos grupos A, B e C, respectivamente.

2- O tipo de HPV predominante foi o 16, representando 60,4% daqueles encontrados em pacientes do grupo A e 54,5% dos detectados nas mulheres do grupo B.

3- Com exceção do HPV 73, presente em apenas 1 amostra, todos os outros tipos detectados por sondas específicas são relacionados a malignidade.

4- Em 155 amostras testadas por PCR e HIS, a prevalência de HPV foi de 65,2% e 17,4% respectivamente, demonstrando maior sensibilidade da primeira com diferença altamente significativa.

5- Observou-se iniciação sexual precoce (com 15 anos ou menos) em elevado percentual de mulheres incluídas nos grupos A e B), embora a grande maioria não admita comportamento sexual promíscuo.

6- Verificou-se elevado número de gestações (6 ou mais) nas mulheres pertencentes aos três grupamentos estudados. A utilização de anticoncepcionais hormonais não pareceu ser freqüente, principalmente entre as mulheres do grupo A.

7- O tabagismo esteve presente em 43,7% e 51,6% das mulheres dos grupos A e B, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEIXO NETO, A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. **Rev. Saúde Pública**, S.Paulo, v.25, n.4, p.326-333,1991.
- ALMEIDA, J.D.; PINKUS, G.S.; STANNARD, L.M. Characterization of the virus found in human genital warts. **Microbios**, Cambridge, v.3, p.225-232, 1969.
- ALMEIDA FILHO, G.; JACYNTHO, C. Métodos Diagnósticos. In: JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G.; MALDONADO, P. **HPV Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994. cap.4. p.19-27.[a].
- ALMEIDA FILHO, G.; JACYNTHO, C. Imunidade e Regressão. In: JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G.; MALDONADO, P. **HPV Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994. cap.5. p.29-30.[b].
- ALMEIDA FILHO, G.; JACYNTHO, C.; MALDONADO, P. Terapêutica. In: JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G.; MALDONADO, P. **HPV Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994. cap.10. p.97-103.[a].
- ALMEIDA FILHO, G.; JACYNTHO, C.; MALDONADO, P. Prevenção. In: JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G.; MALDONADO, P. **HPV Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994. cap.13. p.113.[b].
- ALMEIDA FILHO, G.; PASSOS, M.R.L.; LOPES, P.C. Papilomavirose Genital. In: Passos (Coord.). **Doenças Sexualmente Transmissíveis (Condiloma Acuminado)**, 4ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. cap.20. p. 221-262.
- ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.39, n.3, p.175-186, 1993.
- ANONYMOUS: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses: National Cancer Institute Workshop. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.262, n.7, p.931-934, 1989.
- ARENDS, J.M.; WYLLIE, A.H.; BIRAL, C.C. Papillomaviruses and Human Cancer. **Human Pathology**, Philadelphia, v.21, n.7, p.686-698,1990.

- BARRASSO, R. Colposcopic diagnosis of HPV cervical lesions . In: MUÑOZ,N.; BOSCH,F.X.; SHAH,K.V.; MEHEUS,A. eds. **The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer**. Lyon: World Health Organization,1992. p.67-74. (IARC Scientific Publications, 119).
- BARRET, J.T.; SILBAR; J.D.; Mc GILNLEY, J.P. Genital warts-a venereal disease. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.154, n.1, p.333-334, 1954
- BARTON, S.E.; MADDOX, P.H.; JENKINS, D.; EDWARDS, R.; CUZICK, J.; SILNGER, A. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? **The Lancet**, London, v.2, n.8612, p.652-654, 1988.
- BAUER,H.M.; TING,Y.; GREER,C.E.; CHAMBERS,J.C.; TASHIO,C.J.; CHIMERA,J.; REINGOLD,A.; MANOS,M. Genital Human Papillomavirus Infection in Female University Students as Determined by a PCR-Based Method. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.265, n.4, p.23-30, 1991.
- BECKER, T.M.; STONE, K.M. Genital human papillomavirus infection. A growing concern. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, Philadelphia, v.14, n.2, p.389-396, 1987.
- BECKMAN, A.M.; MYERSON, D.; DALING, J.R.; KIVIAT, N.B.; FENOGLIO, C.M.; Mc DOUGALL, J.K. Detection and localization with biotinylated probes. **Journal of Medical Virology**, New York, v.16, n.3, p.265-273, 1985.
- BEDELL, M.A.; JONES, K.H.; GROSSMAN, S.R.; LAIMINS, L.A. Identification of Human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. **Journal Virology**, Washington, v.. 63, n.3, p.1247-1255, 1989.
- BENTON, E.C., McLAREN, K., BARR, B.B., BLESSING, K., BUNNEY, M.H., RÚDLINGER, I.W., SMITH, I.W., HUNTER, J.A.A. Human papilloma virus infection and its relationship to skin cancer in a group of renal allograf recipients. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v.18, p.168-177, 1989.
- BERAL, V.; DAY, N.E. Screening for cervical cancer: is there a place for incorporation tests for the human papillomavirus. In: MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; SHAH, K.V.; MEHEUS, A. eds. **The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer**. Lyon: World Health Organization, 1992. p.263-269 (Iarc Scientific Publications, 119).

- BERAL, V.; HANNAFORD, P.; KAY, C. Oral contraceptive use and malignancies of the genital tract. **The Lancet**, London, v.2, n.8624, p.1331-1334, 1988.
- BIRLEY, H.D.L. Human papillomaviruses, cervical cancer and the Developing World. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, vol.89, n.5, p.453-463, 1995.
- BLEUL, C.; MÜLLER, M.; FRANK, R. GAUSEPOHL, H.; KOLDOVSKY, U.; MGAYA, H.N.; LUANDE, J.; PAWLITA, M.; MEULEN, J.; VISCIDI, R.; GISSMANN, L. Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Antibodies in Human Sera: Increased Anti-E7 Prevalence in Cervical Cancer Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.8, p.1579-1588, 1991.
- BOSCH, F.X.; CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N.; SANJOSÉ, S de.; GHAFARI, A.M.; GONZÁLEZ, L.C.; GILI, M.; IZARZUGARA, I; VILADIU, P.; NAVARRO, C.; VERGARA, A.; ASCUNCE, N.; GUERREIRO, E.; SHAH, K.V. Male Sexual Behavior and Human Papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.88, n.15, p.1060-1067, 1996.
- 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 group. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.87, n.11, p.796-802, 1995.
- BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; SANJOSÉ, S.; IZARZUGAZA, I.; GILI, M; VILADIU, P.; TORMO, M.J.; MORFO, P.; ASCUNCE, N.; GONZAONZALEZ, I.C.; TAFUR, I; KALDOR, J.M.; GUERRERO, E.; ARISTIZABAL, N.; SANTAMARIA, M.; ALONSO de RUIZ, P; SHAH, K. Risk Factors for Cervical Cancer in Colombia and Spain. **International Journal of Cancer**, New York, v.52, n.5, p.750-758, 1992.
- BRASILEIRO FILHO, G; PENA, S.D.J. Molecular Biological Techniques for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.25, n.1, p.59-71, 1992.
- BRINTON, L.A. Epidemiology of cervical cancer - overview. In: MUÑOZ,N.; BOSCH,F.X.; SHAH, K.V.; MEHEUS, A. eds. **The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer**. Lyon: World health Organization **IARC Scientific Publication, n.119**, Lyon, World Health Organization, 1992. p.3-23. (Iarc Scientific Publications, 119).

- BRINTON, L.A.; HAMMAN, R.F.; HUGGINS, G.R.; LEHMAN, H.F.; LEVINE, R.S.; MALLIN, K., FRAUMENI JR., J.F. Sexual and Reproductive Risk Factors for Invasive Squamous Cell Cervical Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.79, n.1, p.23-30, 1987.
- BRISSON, J.; BAIRATI, I.; MORIN, C.; FORTIER, M.; BOUCHARD, C., CHISTEN, A.; BERNARD, P.; ROY, M.; MEISELS, A. Determinants of persistent detection of Human Papillomavirus DNA in the uterine cervix. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.173, n.4, p.794-799, 1996.
- BROCK, K.E.; BERRY, G; BRINTON, L.A.; KERR, C.; MAC LENNAN, R.; MOCK, P.A.; SHEARMAN, R.P. Sexual, reproductive and contraceptive risk factors for carcinoma *in situ* of the uterine cervix in Sydney. **The Medical Journal of Austrália**, Sydney, v.150, n.3, p.125-130, 1989.
- BROKER, T.R. Structure and genetic expression of papillomaviruses. **Obstetrics and Gynecology of North America**, Philadelphia, v.14, n.2, p.329-348, 1987.
- BUCKLEY, J.D.; HARRIS, R.W.C.; DOLL, R.; VESSEY, M.P.; WILLIAMS, P.T. Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. **The Lancet**, London, v.2, n.8254, p.1010-1015, 1981.
- BURK, R.; HO, G.Y.F.; BEARDSLEY, L.; LEMPA, M.; PETERS, M.; BIERMAN, R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital Human Papillomavirus infection in young women. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.174, n.4, p. 679-689, 1996.
- CAVALCANTI, F.B.C.; GOLDENBERG, D.C.; SCAFURY, G.G; SANTOS, T.M.S.; ALVES, V.A.F. Detecção de Papilomavírus em Condiloma Acuminado de Colo Uterino por Métodos Imunohistoquímicos e de Hibridização "In Situ"- Um Estudo Preliminar. **Laes & Haes**, São Paulo, v.12, n.70, p.38-48, 1991.
- CAVALCANTI, S.M.B.; DEUS, F.C.C.; ZARDO, L.G.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; OLIVEIRA, L.H.S. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer in Brazil: a Retrospective Study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, n.4, p.433-440, 1996.
- CAVALCANTI, S.M.B.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; PASSOS, M.R.L.; FONSECA, M.E.F.; OLIVEIRA, L.H.S. Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Female Cervical Lesions from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, n.4, p.575-580, 1994.

- CHANG, D.Y.; CHEN, R.J.; LEE, S.C.; HUANG, S.C. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various of cervical neoplasia. **Journal Medical Microbiology**, Edinburg, v.46, n.1 p.54-60, 1997.
- COGGIN Jr, J.H., zur HAUSEN, H. Workshop on papillomaviruses and cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v.39, p.545-546, 1979.
- COPPLESON, M.; REID, B.L. The etiology of squamous carcinoma of the cervix. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.32, n.3, p.432-436, 1968.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Aparelho Genital Feminino. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1989. cap. 18. p. 929-974.
- COX, T. Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**; London, v.9, n.1, p.1-37, 1995.
- CUZICK, J.; SINGER, A.; de STAVOLA, B.L.; CHOMET, J. Case-control Study of Risk Factors for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Young Women. **European Journal of Cancer**, London, v.26, n.6, p.684-690, 1990.
- DE BRINTON, R.C.; HILDESHEIN, A.; DE LAO, S.L.; BRINTON, L.A.; SATHYA, P.; REEVES, W. Human Papillomaviruses and Other Influences on Survival From Cervical Cancer in Panama. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.81, n.1, p.19-24, 1993.
- DE BRUX, J.; ORTH, G.; CROISSANT, O.; COCHARD, B.; IONESCO, M. Lésions condylomateuses du col utérin: évolution chez 2466 patientes. **Bulletin du Cancer**, Paris, v.70, n.5, p.410-422, 1983.
- DE VILLIERS, E.M. Heterogeneity of the Human Papillomavirus Group. **Journal of Virology**, Washington, v.63. n.11, p.4898-4903, 1989.
- DE VILLIERS, E.M. Hybridization methods other than PCR: An update. In: MUNÓZ, N; BOSCH, F.X.; SHAH, K.V.; MEHEUS, A. **The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus**. Lyon: World Health Organization, 1992. p. 111-119 (IARC Scientific Publication, 119).
- DE VILLIERS, E.M. Human pathogenic papillomavirus types: An update. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v.186, .1-12, 1994.

- DE VILLIERS, E.M.; SCHNEIDER, A.; MIKLAW, H.; PAPENDICK, U.; WAGNER, D.; WESCH, H.; WAHRENDORF, J.; zur HAUSEN, H. Human Papillomavirus Infections in women with and without abnormal cervical cytology. **The Lancet**, London, v.2, n.8561, p.703-706, 1987.
- DUNN, A.E.G.; OGILVIE, M.M. Intranuclear Virus Particles in Human Genital Wart Tissue: Observations on the Ultrastructure of the Epidermal Layer. **Journal Ultrastructure Research**, v.22, n.3, p.282-295, 1968.
- DÜRST, M.; DZARLIEVA-PETRUSEVSKA, R.T.; BOUKAMP, P.; FUSENIG, N.E.; GISSMAN, L. Molecular and cytogenic analyses of immortalized human keratinocytes obtained after transfection with papillomavirus type 16 DNA. **Oncogene**, London, v.1, n.3, p.251-256, 1987.
- DÜRST, M.; KLEINHEINZ, A.; HOTZ, M.; GISSMANN, L. The Physical State of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Benign and Malignant Genital Tumours. **Journal of General Virology**, London, v.66, pt.7, p.1515-1522, 1985.
- ELUF NETO, J.; BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal of Cancer**, London, v.69, n.1, p.114-119, 1994.
- ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. **Science**, Washington, v.252, n.5013, p.1643-1651, 1991.
- ESCUADERO, P.B. Infection Genital por virus papiloma humano . Aspectos en clinica ginecologica. **Revista Chilena de Obstetricia y Ginecologia**, Santiago, v.61, n.2, p.128-131, 1996.
- ETHERINGTON, I.J.; SHAFI, M.I. Human papillomaviruses and cervical screening. **Genitourinary Medicine**, London, v.72, n.3, p.153-154, 1996.
- FISHER, S.G. Epidemiology: A tool for the Study of Human Papillomavirus-Related Carcinogenesis. **Intervirolgy**, Basel, v.37, n.3-4, p.215-225, 1994.
- FRANCO, L.; VILLA, L.L.; RUIZ, A.; COSTA, M.C. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.172, n.3, p.756-763, 1995.
- GARCIA-CARRANCA, A. & GARIGLIO, P.V. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. **Revista de Investigacion Clinica**, Mexico, v.45, n.1, p.85-92, 1993.



- GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Human papilloma virus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity. e **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.73, n.4, p.1310-1313, 1976.
- GOMPEL, C.; KOSS, L.G. Lesões pré cancerosas malpighianas do colo uterino.: In: GOMPEL,C.; KOSS,L.G. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. São Paulo:Manole, cap.9, 1997. p.79-195.
- GRUBB, G.S. Human papillomavirus and cervical neoplasia: epidemiological considerations. **International Journal of Epidemiology**, London, v.15, n.1, p.1-7, 1986.
- HELLBERG, D.; BORENDAL, N.; SIKSTRÖM, B.; NILSSON, S.; MÁRDH, P.A. Comparasion of women with cervical human papillomavirus infection and genital warts. I. Some behavioural factors and clinical findings. **Genitourinary Medicine**, London, v.71, n.2, p.88-91, 1995.
- HELLBERG, D; NILSSON, S; HALEY, N.J.; HOFFMAN, D; WYNDER, E. Smoking and cervical intraepitelial neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and non smokers. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v.158, n.4, p.910-913, 1988.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 1995: Lyon, France. **Human Papillomaviruses** - Lyon, 1995 (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 64, p35-86).
- INSTITUTO Ofir Loiola (Pará). **Relatório das Atividades: Exercício de 1992**. Belém, [1993?]. 50p.
- INSTITUTO Ofir Loiola, (Pará). **Registro Hospitalar de Câncer: 1994**. Belém, 1997. 28p.
- JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G. Introdução-Histórico. In: JACYNTHO,C; ALMEIDA FILHO,G; MALDONADO,P. **HPV. Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994. cap.1. p.1-4.[a].
- JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G. Ciclo Fisiopatológico viral. In: JACYNTHO, C; ALMEIDA FILHO,G; MALDONADO,P. **HPV. Infecção Genital Feminina e Masculina**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994. cap.2. p.5-10.[b].

- JOCHMUS-KUDIELKA, I.; SCHNEIDER, A.; BRAUN, R.; KIMMIG, R.; KOLDOVSKY, U.; SCHNEWEIS, K.E.; SEEDORF, K.; GISSMANN, L. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Washington, v.81, n.22, p.1698-1704, 1989.
- JONES, C.J.; BRINTON, L.A.; HAMMAN, R.F.; STOLLEY, P.D.; LEHMAN, H.F.; LEVINE, R.S. Risk Factors for *in situ* Cervical Cancer: Results from a Case-Control Study. **Cancer Research**, Baltimore, v.50, n.12, p.3657-3662, 1990.
- KAMB, M.L. Cervical Cancer Screening of Women Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.20, suppl 1, p.98-103, 1995.
- KATAJA, V.; SYRJÄNEN, S.; YLISKOSKI, M.; HIPPELÄINEN, M.; VÄYRYNEN, M.; SAARIKOSKI, S.; MÄNTYJÄRVI, R.; JOKELA, V.; SALONEN, J.T.; SYRJÄNEN, K. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.138, n.9, p.735-745, 1993.
- KIENZELER, J.L. Humoral immunity to human papillomavirus. **Clinics in Dermatology**, New York, v.3, n.144, 1985.
- KIRCHNER, H. Immunobiology of human papillomavirus infection. **Progress in Medical Virology**, Basel, v.33, p.1-41, 1986.
- KIVIAT, N.B.; KOUTSKY, L.A.; CRITCHLOW, C.W.; LORINCZ, A.T.; CULLEN, A.P.; BROCKWAY, J.; HOLMES, K.K. Prevalence and cytologic manifestations of human papilloma virus (HPV) types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, and 56 among 500 consecutive women. **International Journal of Gynecological Pathology**, New York, n.11, v.3, p.197-203, 1992.
- KJAER, S.K.; DE VILLIERS, E-M., DAHL, C., ENGHOLM, G., BOCK, J.E. Case-control study of risk factors for cervical neoplasia in Denmark. I.: Role of the "male factor" in women with one lifetime sexual partner. **International Journal of Cancer**, New York, v.48, n.1, p.39-44, 1991.
- KÓNYA, J.; VERESS, G.; HERNÁDI, Z.; SOÓS, G.; CZEGLÉDY, J.; GERGELEY, L. Correlation of Human Papillomavirus 16 and 18 with Prognostic Factors in Invasive Cervical Neoplasias. **Journal of Medical Virology**, New York, v.46, n.1, p.1-6, 1995.

- KOUTSKY, L.A.; GALLOWAY, D.A.; HOLMES, K.K. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 10, p. 122-163, 1988.
- KOUTSKY, L.A.; HOLMES, K.K.; CRITCHLOW, C.W.; STEVENS, C.E.; PAAVONEN, J.; BECKMANN, A.M.; DE ROUEN, T.A.; GALLOWAY, D.A.; VERNON, D.; KIVIAT, N.B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.327, n.18, p.1272-1278, 1992.
- LA VECCHIA, C; FRANCESCHI, S; DECARLI, A; FASOLI, M; GENTILE, A; TOGNONI, G. Cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.123, n.1, p.22-29, 1986.
- LEHN, H.; VILLA, L.L.; MARZIONA, F.; HILGARTH, M.; HILLEMANS, H-G.; SAUER, G. Physical State and Biological Activity of Human Papillomavirus Genomes in Precancerous Lesions of the Female Genital Tract. **Journal of General Virology**, London, v.69, n.1, p.187-196, 1988.
- LEVINE, A.J.; HARPER, J.; HILBORNE, L.; ROSENTHAL, D.L.; WEISMEIER, E.; HAILE, R. HPV DNA and the Risk of Squamous Intraepithelial Lesions of the Uterine Cervix in Young Women. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.100, n.1, p.6-11, 1993.
- LEY, C.; BAUER, H.M.; REINGOLD, A.; SCHIFFMAN, M.H.; CHAMBERS, J.C.; TASHIRO, C.J.; MANOS, M.M. Determinants of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.83, n.14, p.907-1003, July 17, 1991.
- LIAW, K-L.; HSING, A.W.; CHEN, C-J.; SCHIFFMAN, M.H.; ZHANG, T.Y.; HSIEH, C-Y.; GREER, C.E.; YOU, S-L.; HUANG, T.W.; WU, T-C.; O'LEARY, T.J.; SEIDMAN, J.D.; BLOT, W.J.; MEINERT, C.L.; MANOS, M.M. Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia: a case-control study in Taiwan. **International Journal of Cancer**, New York, v.62, n.5, p. 565-571, 1995.
- LINHARES, L. Diagnóstico da Infecção Cervical pelo HPV. Avaliação Colposcópica, Citopatológica e Histopatológica. **DST-Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v.6, n.3, p.7-22, 1994.
- LONGUET, M.; CASSONNET, P.; ORTH, G. A Novel Genital Human Papillomavirus (HPV), HPV Type 74, Found in Immunosuppressed Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.7, p.1859-1862, 1996.

- MALDONADO, P. Papilomavirose Cervicovaginal (Colposcopia). cap.7. In: JACINTHO,C; ALMEIDA FILHO,G; MALDONADO,P. **HPV Infecção Genital Feminina e Masculina**.1994. Rio de Janeiro: Ravinter, 1994. cap.7. p.43-65.
- MANOS, M.M.; TING, T.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.J.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v.7, p.209-214, 1989.
- MATLASHEWSKY, G.; SCHNEIDER, J.; BANKS, L.; JONES, N.; MURRAY, A. CRAWFORD, L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated *ras* in transforming primary cells. **The EMBO Journal**, Oxford, v.6, n.6, p.1741-1746, 1987.
- MC ARDLE, J.P.; MÜLLER, H.K. Quantitative assessment of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia and wart virus infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v.154, n.3, p.509-515, 1986.
- MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina: I. Citologic patterns. **Acta Cytologic**, Baltimore, v.20, n.6, p.505-509, 1976.
- MEISELS, A.; FORTIN, R.; ROY, M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. **Acta Cytologic**, Baltimore, v.21, n.3, p.379-390, 1977.
- MEISELS, A.; MORIN, C.; CASAS-CORDERO, M. Human papillomavirus infection of the uterine cervix. **International Journal of Gynecological Pathology**, New York, v.1, n.1, P.75-94, 1982.
- MELLO, W.A; BARROS, V.L.R.S.; RIBEIRO, M.R.P.R.; RAHAL, P.; VILLA, L.L.; MACEDO, J.E.; LINHARES, A.C. Human Papillomavirus and cancers in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, n.3, p.445-447, 1992.
- MEYER, M.P.; CARBONELL, R.I.; MAUSER, N.A.; MAUSER, N.A.; KANBOUR, A.I.; AMORTEGUI, M.D. Detection of Human Papillomavirus in Cervical Swab Samples by ViraPap and in Cervical Biopsy Specimens by *in situ* Hybridization. **Human Pathology**, Philadelphia, v.100, n.1, p.12-17, 1993.
- MILDE-LANGOSCH, K.; SCHREIBER, C.; BECKER, G.; LÖNING, T.; STEGNER, H-E. Human Papillomavirus Detection in Cervical Adenocarcinoma by Polimerase Chain Reaction. **Human Pathology**, Philadelphia, v.24, n.6, p.590-594, 1993.

- MITTAL, R.; TSUTSUMI, K.; PATER, A.; PATER, M. Human Papillomavirus Type 16 Expression in Cervical Keratinocytes: Role of Progesterone and Glucocorticoid Hormones. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.81, n.1, p.5-12, 1993.
- MULLIS, K.B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, New York, v.262, n.4, p.56-65, 1990.
- MÜNGER, K.; PHELPS, W.C.; BUBB, V.; HOWLEY, P.M.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 Genes of the Human Papillomavirus Type 16 Together and Sufficient for Transformation of Primary Human Keratinocytes. **Journal of Virology**, Washington, v.63, n.10, p.4417-4421, 1989[a].
- MÜNGER, K.; WERNESS, B.A.; DYSON, N.; PHELPS, W.C.; HARLOW, E.; HOWLEY, P.M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **The EMBO Journal**, Oxford, v.8, n.13, p.4099-4105, 1989[b].
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S.; VILADIU, P.; TORMO, J.; MOREO, P.; ASCUNCE, N.; GONZÁLEZ, L.C.; TAFUR, L.; GILI, M.; IZARZUGAZA, I.; GUERRERO, E.; ARISTIZÁBAL, N.; SANTAMARIA, M.; DE RUIZ, P.A.; SHAH, K.V. El virus del papiloma humano en la etiología del cancer cervicouterino. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington, v.115, n.4, p.301-308, 1993.
- NEGRINI, B.P.; SCHIFFMAN, M.H.; KURMAN, R.J.; BARNES, W.; LANNOM, L.; MALLEY, K.; BRINTON, L.A.; DELGADO, G.; JONES, S.; TCHABO, J-G.; LANCASTER, W.D. Oral Contraceptive Use, Human Papillomavirus Infection, and Risk of Early Cytological Abnormalities of the Cervix. **Cancer Research**, Baltimore, v.50, n.15, p.4670-4675, 1990.
- OLIVEIRA, L.H.S. Virus Oncogênicos. In: Oliveira, L.H.S. (Coord.). **Virologia Humana**, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. cap.26. p.302-314.
- OLIVEIRA, L.S.H.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; PASSOS, M.R.L.; CAVALCANTI, S.M.B.; FONSECA, M.E.F. Human Papillomavirus Detection in Genital Lesions by in Situ Hybridization and Ultrastructural Observations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, n.2, p.195-202, 1994.
- ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. **British Journal Venereal Diseases**, London, v.47, n. 1, p.1-13, 1971.
- ORIEL, J.D.; ALMEIDA, J.D. Demonstration of virus particles in human genital warts. **British Journal Venereal Diseases**, London, v.46, n.1, p.37-42, 1970.

- PARÁ. Secretaria de Estado de Saúde Pública. Núcleo de Pesquisa. Registro de Câncer de Base Populacional. **Câncer em Belém do Pará-Amazonia-Brasil; incidência: 1989 a 1991; mortalidade: 1989 a 1991**. Belém, 1996. 52p.
- PARAZZINI, F.; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; FEDELE, L.; FRANCESCHI, S.; GALLOTTA, L. Risk Factors for Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Cancer**, Philadelphia, v.69, n.9, p.2276-2282, 1992.
- PARK, T.W.; RICHART, R.M.; SUN, X.W.; WRIGHT JR, T.C. Association Between Human Papillomavirus Type and Clonal Status of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.88, n.6, p.355-358, 1996.
- PEREYRA, E.A.G.; GUERRA, D.M.M.; VILLA, L.L. Papilomaviruses Humanas. In: VERONESI, R. & FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, S. Paulo: Atheneu, 1996. cap.30, p.457-463.
- PETERS, R.K.; THOMAS, D.; HAGAN, D.G.; MACK, T.M.; HENDERSON, B.E. Risk Factors for Invasive Cervical Cancer Among Latinas and Non-Latinas in Los Angeles County. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.77, n.5, p.1063-1077, 1986.
- PFISTER, H. Papillomaviruses: general description, taxonomy, and classification. In: SALZMAN, N.P., HOWLEY, P.M., eds. **The Papovaviridae**, v.2. New York: Plenum Press, 1987, p.1-38.
- PHELPS, W.C.; YEE, C.L.; MÜNGER, K.; HOWLEY, P.M. The Human Papillomavirus Type 16 E7 Gene Encodes Transactivation and Transformation Functions Similar to Those of Adenovirus E1A. **Cell**, Cambridge, v.53, n.4, p.539-547, 1988.
- PRODUTOS Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. **PCR-Polimerase Chain Reaction**; Introdução à Metodologia. São Paulo; s.d. p.3-5.
- PRUSSIA, P.R.; TER SCHEGGET, J.; SMITS, H.L. Detection of oncogenic HPV DNA by a consensus polymerase chain reaction method in genital carcinomas in twenty women in Barbados. **Western Indian Medical Journal**, Kingston, v.42, n.4, p.144-146, 1993.
- PUROLA, E.; SAVIA, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. **Acta Cytologica**, Baltimore, v. 21, n.1, p. 26-31, 1977.
- PURTILO, D.T; HALLGREN, H.M.; YUNIS, E.J. Depressed maternal lymphocyte response to phytohaemagglutinin in human pregnancy. **The Lancet**, London, v.1, n.7754, p.769-771, 1972.

- REAGAN, J.W.; SEIDEMANN, I.L.; SARACUSA, Y. Cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of uterine cervix. **Cancer**, Philadelphia, v.6, p.224-235, 1953.
- REID, R.; LAVERTY, C.R.; COPPLESON, M.; ISARANGKUL, W.; HILLS, E. Noncondylomatous cervical wart virus infection. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.55, n.4, p.476-483, 1980.
- RICHART, R.M. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v.10, p.748-784, 1967.
- ROBBOY, S.J.; DUGGAN, M.A.; KURMAN, R. J. Patologia Ginecológica. In: RUBIN, E. & FARBER, J.L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1988. cap. 18, p. 830-871.
- ROMANCZUK, H.; VILLA, L.L.; SCHLEGEL, R.; HOWLEY, P.M. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18., **Journal Virology**, Washington, v.65, n.5, p.2739-2740, 1991.
- ROTELI-MARTINS, C.; DERCHAIN, S.F.M.; DORES, G.B.; SIQUEIRA, S.A.C.; ALVES, V.A.F.; PANETTA, K. Associação entre diversos tipos de HPV e outras infecções vaginais com lesões intraepiteliais cervicais de alto grau. **Revista Brasileira de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.1, n.1, p.9-14, 1996.
- ROY, M.; MORIM, C.; CASAS-CORDERO, M.; MEISELS, A. Human Papillomavirus and Cervical Lesions. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v.26, n.4, p.949-967, 1983.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, Washington, v.239, n.4839, p.487-490, 1988.
- SCHIFFMAN, M.H.; BAUER, H.M.; HOOVER, R.N.; GLASS, A.G.; CADELL, D.M.; RUSH, B.B.; SCOTT, D.R.; SHERMAN, M.E.; KURMAN, R.J.; WACHOLDER, S. Epidemiologic evidence showing that Human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.85, n.12, p.958-964, 1993.

- SCHIFFMAN, M.H.; HALEY, N.J.; FELTON, J.S.; ANDREWS, A.M.; KASLOW, R.A.; LANCASTER, W.D.; KURMAN, R.J.; BRINTON, L.A.; LANNOM, L.B.; HOFFMAN, D. Biochemical Epidemiology of Cervical Neoplasia: Measuring Cigarette Smoke Constituents in the Cervix. **Cancer Research**, Baltimore, v.47, n.14, p.3886-3888, 1987.
- SCHIFFMAN, M.H.; KIVIAT, N.B.; BURK, R.D.; SHAH, K.V.; DANIEL, R.W.; LEWIS, R.; KUYPERS, J.; MANOS, M.M.; SCOTT, D.R.; SHERMAN, M.E.; KURMAN, R.J.; STOLER, M.H.; GLASS, A.G.; RUSH, B.B.; MIELZYNSKA, I.; LORINCZ, A.T. Accuracy and Interlaboratory Reliability of Human Papillomavirus DNA Testing by Hybrid Capture. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.3, p.545-550, 1995.
- SCHLEGEL, R.; PHELPS, W.C.; ZHANG, Y.L.; BARBOSA, M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. **The EMBO Journal**, Oxford, v.7, n.10, p.3181-3187, 1988.
- SCHNEIDER, A. Natural History of Papillomavirus Infections. **Intervirolgy**, Basel, v.37, n.3-4, p.201-214, 1994.
- SCHNEIDER, A., KIRCHHOFF, T., MEINHARDT, G., GISSMANN, L. Repeated evaluation of human papillomavirus 16 status in cervical swabs of young women with a history of normal Papanicolaou smears. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.79, n.5, pt.1, p.683-688, 1992.
- SCHNEIDER, A.; KOUTSKY, L.A. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. In: MUÑOZ, N; BOSCH, F.X.; SHAH, K.V; MEHEUS, A. eds. **The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer**. Lyon: World Health Organization, 1992, p.25-52. (IARC Scientific Publication, 119).
- SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; KIRCHMAYR, R.; SCHNEIDER, V. Prevalence of human papillomavirus genomes in tissues from the lower genital tract as detected by molecular in situ hybridization. **International Journal Gynecological Pathology**, New York, v.10, n.1, p.1-14, 1991.
- SHAH, K.V.; HOWLEY, P.M. Papillomaviruses. In: FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M. (Coord.). **Virology**. 2<sup>a</sup>ed. v.2. New York: Raven Press, 1990. cap.59. p.1651-1676.
- SHROYER, K.R. Human Papillomavirus and Endocervical Adenocarcinoma. **Human Pathology**, Philadelphia, v.24, n.2, p. 119-120, 1993.



- SHROYER, K.R.; LOVELACE, G.S.; ABARCA, M.L.; FENNEL, R.H.; CORKILL, M.E.; WOODARD, W.D.; DAVILLA, G.H. Detection of Human Papillomavirus DNA by In situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction in Human Papillomavirus Equivocal and Dysplastic Cervical Biopsies. **Human Pathology**, Philadelphia, v.24, n.9, p.1012-1016, 1993.
- SLATERRY, M.L.; ABBOT, T.M.; OVERALL, J.C. Jr.; ROBISON, L.M.; FRENCH, T.K.; JOLLES, C.; GARDNER, J.W.; WEST, D.W. Dietary vitamins A, C and E and selenium as risk factors for cervical cancer. **Epidemiology**, Cambridge, v.1, n.1, p.8-15, 1990.
- STOLER, M.H.; RHODES, C.R.; WHITBECK, A.; WOLINSKY, S.M.; CHOW, L.T.; BROKER, T.R. Human Papillomavirus Type 16 and 18 Gene Expression in Cervical Neoplasias. **Human Pathology**, Philadelphia, v.23, n.2, p.117-128, 1992.
- STRAUSS, M.J.; SHAW, E.W.; BUNTING, H.; MELNICK, J.L. "Crystalline" Virus-like Particles from Skin Papillomas Characterized by Intranuclear Inclusion Bodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v.72, n.1, p.46-50, 1949.
- TAGAMI, H.; OGINO, A.; TAKIGAWA, M.; IMAMURA, S.; OFUJI, S. Regression of plane warts following spontaneous inflammation. An histopathological study. **British Journal of Dermatology**, London, v.90, n.2, p.147-154, 1974.
- TAGAMI, H.; OGUCHI, M.; OFUJI, S. Immunological aspects of wart regression with special reference to regression phenomenon of numerous flat warts. An experiment on tumor in man by nature. **The Journal of Dermatology**, Tokyo, v.10, n.1, p.1-12, 1983.
- VAN DOORNUM, G.J.J.; PRINS, M.; JEFFERMANS, L.H.J.; HOOYKAAS, C.; VAN DEN HOCK, J.A.R.; COUTINHO, R.A.; QUINT, W.G.V. Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterossexual men and women with multiple sexual partners: a prospective study. **Genitourinary Medicine**, London, v. 70, n.4, p. 240-246, 1994.
- VENUTI, A.; BADARACCO, G.; SEDATI, A.; CARBINI, R.; MARCANTE, M.L. Determinants of human papillomavirus types 16 and 18 infection in the lower female genital tract in an Italian population. **European Journal Gynaecological Oncology**, Padua, v.15, n.3, p.205-210, 1994.
- VERREAULT, R.; CHU, J.; MANDELSON, M.; SHY, K. A case control study of diet and invasive cervical cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v.43, n.6, p.1050-1054, 1989.

- VILLA, L.L. Papilomavírus Humano e Câncer do Colo do Útero. **Laes & Haes**, São Paulo, v.47, n.4, p.57-62, 1995[a].
- VILLA, L.L. O papel do papilomavírus na neoplasia genital feminina. In: ABRÃO, F.S. **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**. São Paulo: Roca, 1995. p.39-48. [b].
- Villa, L.L. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. **Advances in Cancer Research**, San Diego, 321-341, 1977.
- VILLA, L.L.; FRANCO, E.L.F. Epidemiological correlates of cervical neoplasia in asymptomatic women Brasil. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.81, n.5, p.332-340, 1989.
- VILLA, L.L.; MEDEIROS, A.C. Métodos de Análise de DNA e RNA. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, São Paulo. v.5, n.3, p.349-355, 1995.
- VILLA, L.L.; SCHLEGEL, R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. **Virology**, New York, v.181, n.1, p.374-377, 1991.
- WERNESSE, B.A.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. **Science**, Washington, v.248, n.4951, p.76-79, 1990.
- WHARHOL, M.J.; PINKUS, G.S.; RICE, R.H.; EL-TAWIL, G.H.; LANCASTER, W.D.; JENSON, A.B.; KURMAN, R.J. Papillomavirus infection of the cervix. I I I: Relationship of the presence of viral structural proteins to the expression of involucrin. **International Journal Gynecological Pathology**, New York, v.3, n.1, p.71-81, 1984.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. Papovaviridae. In: WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. USA: Academic Press, 1994. cap. 18, p.294-305.
- WHO. Memoranda/Memorandus. **Cervical cancer control in developing countries: Memorandum from a WHO meeting**, Geneve, v.74, n.4, p.345-351, 1996.
- WINKELSTEIN JR., W. Smoking and Cervical Cancer- Current Status: A Review. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.131, n.6, p.945-957, 1990.
- YASUMOTO, S.; BURKHARDT, A.L.; DONIGER, J.; DI PAOLO, J.A. Human Papilomavirus Type 16 DNA-Induced Malignant Transformation of NIH 3T3 Cells. **Journal of Virology**, Washington, v.57, n.2, p.572-577, 1986.

- YOUNG, L.S.; BEVAN, I.S.; JOHNSON, M.A.; BLOMFIELD, P.I.; BROMIDGE, T.; MAITLAND, N.J.; WOODMAN, C.B.J. The Polimerase Chain Reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. **British Medical Journal**, London, v.298, n.6665, p.14-18, 1989.
- ZUR HAUSEN, H. Condiloma acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v.36, n.2 pt.2, p.794, 1976.
- ZUR HAUSEN, H. Human Papillomaviruses in the Pathogenesis of Anogenital Cancer. **Virology**, New York, v.184, n.1, p. 9-13, 1991[a].
- ZUR HAUSEN, H. Viruses in human cancers. **Science**, Washington, v.254, n.5035, p.1167-1173, 1991[b].
- ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G.W. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hibridizations with complementary RNA of human wart virus. **International Journal of. Cancer**, New York, v.13, n.5, p.650-656, 1974.

## ANEXO 1

### ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM NEOPLASIAS DE COLO DE ÚTERO NA REGIÃO NORTE DO BRASIL.

INSTITUTO LUDWIG DE PESQUISA SOBRE O CANCER, SÃO PAULO (SP)  
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS E INSTITUTO OFIR LOIOLA, BELÉM (PA)

#### INFORMAÇÕES GERAIS

01. Nome da paciente: \_\_\_\_\_
02. Número do RG hospitalar: \_\_\_\_\_
03. Procedência da paciente: \_\_\_\_\_
04. Estado civil: \_\_\_\_\_
05. Profissão: \_\_\_\_\_
06. Idade do primeiro coito: \_\_\_\_\_
07. Número de parceiros sexuais: \_\_\_\_\_
08. Número de gestação: \_\_\_\_\_
09. Número de filhos: \_\_\_\_\_
10. Método anticoncepcional usado: \_\_\_\_\_
11. Hábito de fumar: \_\_\_\_\_
12. Outras informações relevantes: \_\_\_\_\_

#### INFORMAÇÕES LABORATORIAIS

13. Diagnóstico histopatológico: \_\_\_\_\_
14. Localização do tumor primário: \_\_\_\_\_
15. Outras informações relevantes: \_\_\_\_\_

#### 16. Resultado da HIS

HPV 6/11	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Duvidoso
HPV 16/18	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Duvidoso
HPV 31/33/35	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Duvidoso

Espécime não permite a avaliação: \_\_\_\_\_

17. Resultado do PCR: \_\_\_\_\_

18. Resultado do *dot-blot*: \_\_\_\_\_

19. Data de colheita: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

20. Médico (a) responsável: \_\_\_\_\_

**ANEXO 2****TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu (nome) \_\_\_\_\_

Residente (endereço) \_\_\_\_\_

Fui devidamente informada sobre o projeto e concordo de forma voluntária em participar de um estudo científico, sem finalidade terapêutica imediata. Para tanto, autorizo a coleta de amostras que serão analisadas neste trabalho.

Belém, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 199\_\_

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Médico(a) \_\_\_\_\_

NOTA: Sua assinatura neste documento não isenta a equipe do projeto, sob hipótese alguma, das responsabilidades que assumiu ao desenvolver a pesquisa. De acordo com as recomendações da Conferência Internacional de Helsinque (1964) o presente termo de consentimento apenas confirma sua aprovação, autorização e colaboração com respeito ao estudo que estamos propondo.

