



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

MARILÉA DE LIMA GUIMARÃES

**ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MULHERES
COM NEOPLASIA CERVICAL INTRAEPITELIAL OU INVASORA
REFERENCIADAS PARA COLPOSCOPIA**

**RECIFE
2014**

MARILÉA DE LIMA GUIMARÃES

**ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MULHERES COM
NEOPLASIA CERVICAL INTRAEPITELIAL OU INVASORA REFERENCIADAS PARA
COLPOSCOPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

ORIENTADOR

Prof. Dr Jacinto da Costa Silva Neto

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

Patologia

LINHA DE PESQUISA

Modelos Morfofisiológicos e Imunológicos das Doenças

RECIFE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G963a Guimarães, Mariléa de Lima.

Análise da infecção pelo papilomavírus humano em mulheres com neoplasia cervical intraepitelial ou invasora referenciadas para colposcopia / Mariléa de Lima Guimarães. – Recife: O autor, 2014. 73 f. : il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Câncer do colo do útero. 3. HPV. 4. PCR. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título

616.07

CDD (23,ed.)

UFPE (CCS2014-051)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.**

AUTORA: MARILÉA DE LIMA GUIMARÃES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: "ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO PAPILOMA VÍRUS
HUMANO EM MULHERES COM NEOPLASIA CERVICAL INTRAEPITELIAL OU
INVASORA REFERENCIADAS PARA COLPOSCOPIA."**

ORIENTADORA: PROF. DR. JACINTO DA COSTA SILVA NETO

DATA DA DEFESA: 27 DE FEVEREIRO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof^ª. Dr^ª. Bárbara Simas Chagas

Prof^ª. Dr^ª. Virgínia da Conceição Ribes Amorim Bezerra Brandão

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADORA DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COLEGIADO

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo (Coordenador)
Profa. Dra. Manuela Figueroa Lyra de Freitas (Vice- Coordenadora)
Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio
Prof. Dr. Lucas André Cavalcante Brandão
Profa. Dra. Maria Bernadete Souza Maia
Profa. Dra. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima
Prof. Dr. Nicodemos Teles Pontes Filho
Profa. Dra. Paloma Lys de Mendonça
Profa. Dra. Rejane Pereira Neves
Prof. Dr. Roberto Vieira de Mello
Profa. Dra. Wylla Tatiana Ferreira
Paulo Pessoa de A. Filho (Representante discente)

SECRETARIA

Margarete Valdevino

*Ao meu filho Arthur Henrique que a
caminho comigo, ensinou-me da vida
compreender a marcha.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permite todas as oportunidades para que eu faça meu caminho segundo Sua vontade.

A minha mãe, pela semente da Fé.

Ao meu pai, que me ensinou a disciplina.

Ao meu marido, pelo amor, pelo companheirismo e estímulos permanentes aos meus estudos e ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto, meu orientador, pelos ensinamentos e confiança depositada desde o início da caminhada.

À Dra. Bárbara Simas e ao Prof. Nicodemos pelos enormes ensinamentos e sugestões por ocasião da pré-banca.

À Cláudia Marina, minha amiga, pelas incansáveis horas em que esteve comigo me levando pela mão nesta jornada.

Ao Prof. Dr. João Sabino Pinho pela grande contribuição na minha formação profissional.

A todos os docentes e funcionários do Programa de Pós Graduação em Patologia, por terem colaborado direta ou indiretamente com minha formação.

Aos meus amigos, do Setor de Colposcopia do HC, meus colegas Angelina, Isabel, Jefferson, Fabiana, Fátima e Tania, pelo companheirismo de nos faz amar verdadeiramente nosso trabalho, à Enfermeira Luciana Leôncio, as auxiliares Ana Claudia, Eliane e Ivete pela colaboração constante e pelo carinho com que participaram desta pesquisa.

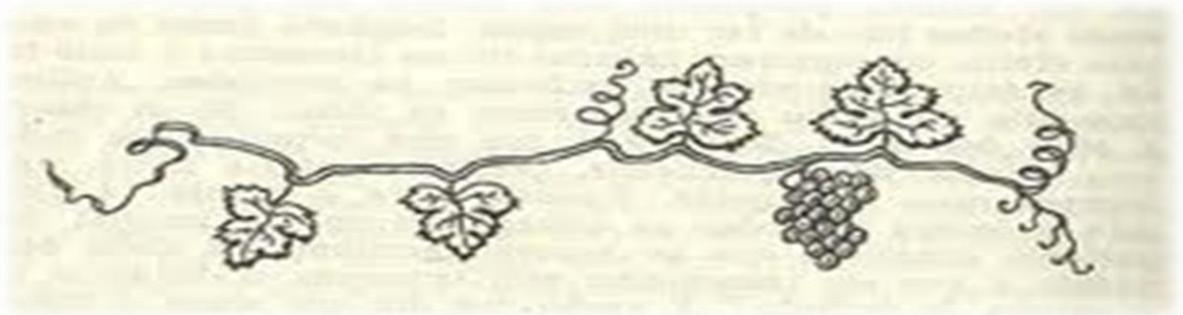
Aos pesquisadores e alunos do Departamento de Genética, pela imensa colaboração na biologia molecular.

As minhas alunas e alunos, que no dia a dia me acumulam de desafios e de muito carinho.

A todas as minhas pacientes do HC que me permitiram a realização deste estudo pela confiança absoluta que me demonstraram.

“Porás no cabeçalho do livro a cepa que te desenhamos porque é o emblema do trabalho do Criador. Aí se acham reunidos todos os princípios materiais que melhor podem representar o corpo e o espírito. O corpo é a cepa; o espírito é o licor; a alma ou espírito ligado à matéria é o bago. O homem quintessencia o espírito pelo trabalho e tu sabes que só mediante o trabalho do corpo, o Espírito adquire conhecimentos.”

LIVRO DOS ESPÍRITOS. PROLEGÔMENOS



RESUMO

O câncer do colo do útero e o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres com aproximadamente 530 mil casos anuais resultando em 275 mil óbitos a cada ano. No Brasil, para 2014, são esperados 15.540 casos novos com risco estimado de 15 casos por 100 mil mulheres. Na região Nordeste as estimativas são de 5.370 casos novos com incidência de 19 casos/100.000. Numerosos estudos epidemiológicos referem o Papilomavírus Humano de alto risco (HPV-AR), como causa necessária para o desenvolvimento do câncer do cervical indicando que a persistência da infecção pelo HPV é o fator de risco mais significativo para esse tipo de neoplasia que é precedida por longa fase de doença não invasiva denominada neoplasia intraepitelial cervical categorizada em três graus evolutivos: 1, 2 e 3 (NIC 1, NIC 2 e NIC 3).

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar a prevalência da infecção por HPV de alto risco e de seus respectivos genótipos, em infecções únicas ou múltiplas, correlacionando com o grau da neoplasia diagnosticada pela citologia e pela histologia.

Trata-se de um estudo observacional, analítico, transversal realizado em mulheres, referenciadas para colposcopia com citologia prévia alterada. Todas realizaram uma segunda citologia em esfregaço convencional, testes de detecção de HPV em escovado endocervical por reação em cadeia da polimerase (PCR) e colposcopia. As que apresentaram anormalidades à colposcopia foram submetidas à biopsia.

O teste de detecção do HPV de alto risco foi positivo em 81.5% dos casos. Em 48% dos casos houve positividade para um único genótipo e em 52% estavam presentes dois ou três genótipos. Os tipos de HPV mais prevalentes foram, na sequência: 16, 31, 58, 18, 33. O HPV-16 foi o tipo mais prevalente, estando associado em percentuais importantes a NIC 3 e câncer invasor em infecção única ou múltipla.

Os dois tipos de HPV mais prevalentes foram HPV-16 e HPV-31, frequentemente associados a lesões de alto grau histológico, principalmente quando em infecção dupla 16/31.

PALAVRAS-CHAVE: Neoplasia intraepitelial cervical. Câncer do colo do útero. HPV. PCR.

ABSTRACT

Cervical cancer and the second most common cancer among women with approximately 530,000 cases annually resulting in 275,000 deaths each year. In Brazil, for 2014, 15,540 new cases with an estimated risk of 15 cases per 100,000 women are expected. In the Northeast the estimates are 5,370 new cases with an incidence of 19 casos/100,000. Numerous epidemiological studies have addressed the high-risk human papillomavirus (HPV-HR) as a necessary cause for the development of cervical cancer indicating that the persistence of HPV infection is the most significant for this type of cancer which is preceded by long phase of noninvasive disease called cervical intraepithelial neoplasia categorized into three evolutionary grades: 1 2 and 3 (CIN 1, CIN 2 and CIN 3).

This study was conducted with the objective to determine the prevalence of HPV infection of high risk and their respective genotypes in single or multiple infections, correlating with the degree of malignancy diagnosed by cytology and histology.

This was an observational cross-sectional study, analytical, conducted in women referred for colposcopy for abnormal Pap smear.

All underwent a second conventional cytology smears, testing for HPV in endocervical brushed by polymerase chain reaction (PCR) and colposcopy. Women who exhibited abnormalities to colposcopy underwent biopsy.

The test for detection of high risk HPV was positive in 81,5% of cases. In 48,0% of cases there was positivity for a single genotype and in 52,0% there were two or three genotypes. The most prevalent HPV types were the following: 16, 31, 58, 18 and 33. HPV - 16 was the most prevalent type, associated in a significant percentage with CIN3 and invasive cancer in single or multiple infections.

The two most prevalent HPV types were HPV-16 and HPV-31, often associated with lesions of high histological grade, especially when dual infection in 16/3.

KEY WORDS: Cervical intraepithelial neoplasia. Invasive cervical cancer. HPV. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Morfologia do Papilomavírus humano	20
Figura 2	Representação esquemática do genoma do Papilomavírus humano	21
Figura 3	O ciclo vital do Papilomavírus humano	22
Figura 4	Ação da interferência de E6 sobre o ciclo celular	24
Figura 5	Ação da interferência de E7 sobre o ciclo celular	24
Quadro 1	Variáveis, definições e desfechos investigados	36

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1	Gel representativo demonstrando a tipificação viral	48
Gráfico 1	Média de idade em relação ao resultado da histologia	47
Gráfico 2	Distribuição dos genótipos nos testes positivos	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na detecção do HPV	34
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados na tipificação do HPV	35

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1	Distribuição segundo a faixa etária	45
Tabela 2	Resultados da segunda citologia	46
Tabela 3	Resultados da histologia	46
Tabela 4	Distribuição das amostras analisadas quanto a detecção viral	47
Tabela 5	Associação da citologia com a presença de HPV-AR e genótipos pesquisados	50
Tabela 6	Associação da histologia com a presença de HPV-AR e genótipos pesquisados	51
Tabela 7	Associação da histologia com infecções únicas e múltiplas	52
Tabela 8	Associação de fatores de risco e infecção pelo HPV-AR	54
Tabela 9	Fatores de risco em relação ao tipo de HPV-AR	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCUS	<i>Atypical squamous cells of undertermined significance</i>
ASC-H	<i>Atypical squamous cells possible of high grade</i>
CEI	Carcinoma escamoso invasor
DNA	<i>Deoxiribonucleic acid</i>
E2F	Fator de transcrição
E6	Oncogene E6
E7	Oncogene E7
E6-AP	Proteína de associação a E6
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
IARC	<i>Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCR	<i>Long Control Region</i>
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	<i>Open Read Frames</i>
p53	Proteína 53, supressora de tumor.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pRb	Proteína do retinoblastoma
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLP	<i>Virus like particles</i>

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Histórico das pesquisas	20
2.2 A estrutura do vírus e patogênese viral	20
2.3 A infecção viral	25
2.4 A vacina profilática	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MÉTODO	31
4.1 Tipo de estudo	31
4.2 Local do estudo	31
4.3 População alvo e período	32
4.4 Critérios de inclusão e exclusão	32
4.5 Método de coletas	32
4.6 Técnicas laboratoriais	33
4.6.1 Citologia oncótica.....	33
4.6.2 Histopatologia.....	34
4.6.3 Detecção e genotipagem do HPV.....	34
4.7 Definição das variáveis	36
4.8 Métodos de análise estatística	37
4.9 Considerações éticas	37

5	ARTIGO	
	PREVALÊNCIA, PERFIL GENOTÍPICO E FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MULHERES REFERENCIADAS PARA COLPOSCOPIA.....	39
	Resumo	39
	Abstract	40
	Introdução	41
	Método	43
	Resultados	45
	Discussão	55
	Conclusão	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICES	69
	ANEXOS	72

1 APRESENTAÇÃO

1 APRESENTAÇÃO

O câncer de colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 530 mil casos novos por ano no mundo, resultando em 275 mil óbitos a cada ano (WHO, 2008).

No Brasil, para 2014, são esperados 15.540 novos casos, com risco estimado de 15 casos / 100.000 mulheres, sendo para elas o terceiro tipo de câncer mais comum. No Nordeste, onde ocupa a segunda posição, os dados apontam estimativas de 5.370 casos novos com taxas de incidência de 19 casos / 100.000 (INCA Brasil, 2013).

Considerando a incidência mundial houve uma queda de 75% na incidência mundial desde a introdução do exame citológico de Papanicolaou nos anos de 1950, mas em nenhum país a doença foi erradicada (MONSONEGO et al., 2004).

A relação causal entre câncer cervical e infecção pelo Papilomavírus Humano– HPV, já foi bem estabelecida (MUÑOZ et al., 2003). Estudos reportam que o DNA do HPV é detectado na maioria das amostras histológicas de cânceres invasores (97.9 a 99.7%) e nenhum outro fator de risco para câncer cervical tem magnitude comparável (BOSCH et al, 2002).

Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados sendo que cerca de 40 cepas infectam o trato anogenital (GARCIA-ESPINOSA et al., 2009). Esses tipos virais têm sido classificados de acordo com propensão das células infectadas à progressão maligna. Há os chamados HPV de baixo risco, representados pelos tipos 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81, geralmente encontrados nas lesões de baixo grau, e os HPV de alto risco, encontrados nas lesões de alto grau e câncer, representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 73 (MUÑOZ et al., 2003; de VILLIERS et al., 2004).

Aproximadamente 90% dos cânceres do colo uterino são causados por cinco tipos de HPV: 16, 18, 31, 33 e 45, estando o tipo HPV 16 relacionado a 53% dos casos, e o HPV 18 a 15%, o HPV 45 é encontrado em 9%, o HPV 31 em 6% e o HPV33 em 3%, nos casos restantes aparecem outros tipos menos comuns (MUÑOZ et al., 2006).

A infecção por HPV é atualmente considerada causa necessária para o surgimento das lesões cervicais e sua progressão para câncer invasor, sendo, contudo, insuficiente (WALBOOMERS et al. 1999). Fatores referentes ao vírus, como seu genótipo e a presença de mais de um tipo oncogênico, e ao hospedeiro, tais como: imunossupressão, tabagismo, outras infecções sexualmente transmissíveis, deficiências nutricionais e uso de anticoncepcional hormonal tem sido relacionados com a persistência da infecção, o que representa o fator central de progressão (RODRIGUEZ et al., 2010).

Numerosos estudos epidemiológicos demonstram os HPV de alto risco (HPV-AR), como fator primário para o desenvolvimento do câncer do colo indicando que a persistência da infecção pelo HPV é o fator de risco mais significativo para esse tipo de neoplasia (zur HAUSEN, 2002; DUARTE-FRANCO; FRANCO, 2004).

Uma longa fase de doença pré-invasora denominada de neoplasia intraepitelial cervical – NIC, categorizada em três graus histológicos: NIC 1, NIC 2 e NIC 3, precede o desenvolvimento do câncer do colo do útero.

A infecção duradoura por HPV de alto risco, cujos produtos proteicos interferem particularmente na regulação do ciclo celular, ocasiona instabilidade genômica nas células infectadas se não houver intervenção neste estágio, estimado entre 15 a 20 anos (MONSONEGO, 2010).

Embora a prevalência do vírus na comunidade seja alta a maioria das mulheres infectadas será bem sucedida na eliminação do vírus sem desenvolver câncer (NOBBENHUIS et al., 1999).

Apesar dos avanços das pesquisas, ainda é difícil para um clínico prever o risco que uma mulher tem no presente ou no futuro, independente da técnica empregada na rotina: citologia, colposcopia ou histologia. Assim, está claro que há uma necessidade da utilização de marcadores de prognóstico suplementares ou mais confiáveis a fim de prever a evolução de uma lesão pré-cancerosa.

Desta forma, a análise da infecção pelo HPV, considerando uma região de alta incidência de câncer de colo do útero, enfocando os tipos virais de alto risco envolvidos e dados epidemiológicos de grupos de indivíduos mais vulneráveis à aquisição e à persistência

da infecção pelo vírus, seja pela faixa etária ou por fatores comportamentais, poderá favorecer adoção de meios preventivos, por exemplo, através de prioridades de rasteio em idades de alta prevalência de NIC. Por outro lado o conhecimento dos tipos virais envolvidos poderá fornecer subsídios importantes no manejo clínico das pacientes tratadas, através de um seguimento diferenciado.

A partir da delimitação do problema sobre a infecção pelo HPV e as neoplasias cervicais surgiram questionamentos que geraram a seguinte pergunta condutora: existe associação entre tipos virais específicos e o grau da neoplasia?

As atividades desta pesquisa foram desenvolvidas de forma a permitir o estudo dessa possível associação e a investigação dos tipos de HPV mais prevalentes nessa região geográfica, além de verificar se infecções múltiplas estão presentes e se outros fatores de risco como a idade, o comportamento sexual, o uso de anticoncepcionais hormonais e o tabagismo estão significativamente envolvidos com a presença da infecção.

A dissertação consta de capítulo de revisão de literatura, de métodos, um artigo original e, por fim, as considerações finais e recomendações. No capítulo de revisão, encontra-se uma descrição narrativa sobre o histórico das pesquisas sobre o papel do papilomavírus humano e o câncer do colo do útero, a estrutura e patogênese do vírus HPV e sobre a história natural da infecção.

O capítulo de métodos descreve o percurso metodológico utilizado para responder ao objetivo do estudo. O artigo original intitulado “Prevalência, perfil genotípico e fatores de risco para infecções pelo Papilomavírus humano em mulheres referenciadas para colposcopia”, teve como objetivo identificar a associação entre tipos de HPV de alto risco e o grau de neoplasias cervicais e será submetido ao periódico *BMC Public Health*. Ao final, as considerações finais e recomendações são expostas baseadas nos achados científicos. As referências seguiram as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6030).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico das pesquisas

Entre 1974 e 1976 os pesquisadores começaram a analisar um possível papel do Papilomavírus humano (HPV) no câncer cervical. Em 1976, Meisel e Fortin revendo esfregaços com diagnóstico de displasia leve, relacionaram a presença de coilócitos com infecção por HPV.

O subsequente isolamento de tipos específicos em lesões genitais bem como a aplicação de técnicas de biologia molecular permitiu uma visão mais abrangente do possível envolvimento do HPV no câncer anogenital.

Os primeiros tipos de HPV isolados diretamente de espécimes de biopsia do colo de útero, o HPV-16 e o HPV-18, foram clonados por zur Hausen et al. (1983), Dust et al.(1984) e Boshart et al.(1984). Os estudos com HPV deram a Harald zur Hausen o Premio Nobel de Medicina em 2008.

Ao final dos anos de 1980, o papel do HPV na etiologia do câncer cervical já tinha sido descrito em detalhes e a expressão de genes virais específicos como E6 e E7 foram demonstrados em cultivos de células e fragmentos de biopsias de câncer cervical (MÜNGER et al., 1989). O encontro do genoma viral integrado ao genoma da célula hospedeira deu sustentação às hipóteses iniciais.

2.2 A estrutura do vírus e a patogênese viral

Os HPV são pequenos vírus de 52 a 55 nm de diâmetro, cuja cápsula é formada por 72 capsômeros em simetria icosaédrica (**Figura 1**) (PRETÈT et al., 2010)

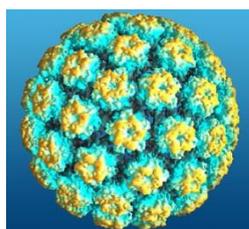


Figura 1 - Morfologia do Papilomavírus humano. Fonte: geraldojose.com. br

O genoma viral é constituído por um DNA circular de dupla hélice de aproximadamente 8000 pares de bases e está dividido em uma região codificante com oito fases de leitura aberta (ORF) que codificam as proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as proteínas tardias (L1 e L2), e outra região não codificante chamada LCR (*Long Control Region*), implicada no controle da replicação do DNA viral e no controle da transcrição dos genes virais (**Figura 2**) (MOUGIN, NICOLIER e DECRION-BARTHOD, 2008).

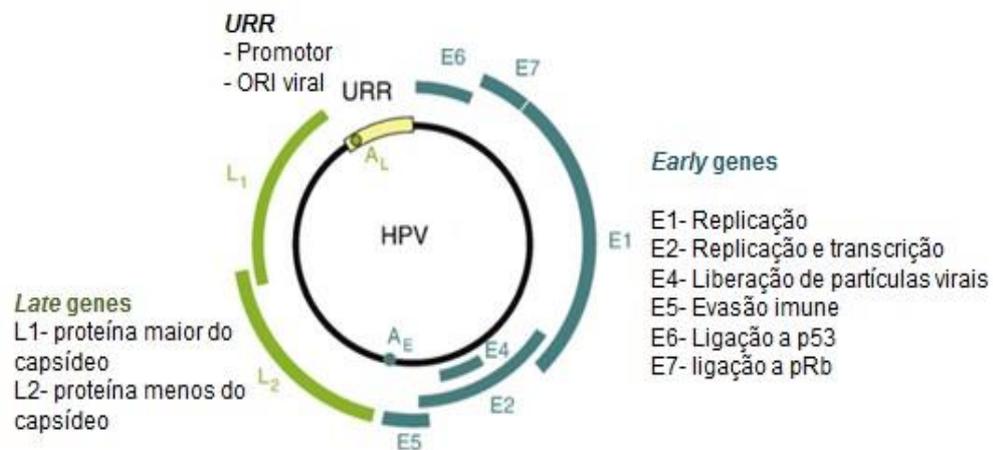


Figura 2 - Representação esquemática do genoma do Papilomavírus humano.

Fonte: Stanley 2012

Os HPV penetram nas células basais do epitélio da junção escamo-colunar (JEC) ou através de microfissuras presentes na ectocervice. A entrada na célula se faz por endocitose e o DNA viral é transportado para o núcleo, seguindo a rede proteica do citoesqueleto, após o desnudamento do capsídeo (BOUSARGHIN et al., 2003).

Pesquisas recentes reforçam a possibilidade destas duas vias e trazem a possível resposta ao diferente comportamento evolutivo das infecções nos vários sítios do trato anogenital. A identificação por Imunohistoquímica, de células embrionárias presentes na JEC original do colo do útero e da região anorretal, não encontradas na camada basal do epitélio escamoso maduro das demais regiões, parece explicar o risco aumentado de progressão para câncer no colo e no anus em relação ao risco de evolução das lesões de vulva, vagina, região perianal e pênis (HERFS et al., 2012).

O ciclo viral é estreitamente dependente da diferenciação das células epiteliais. Numa primeira fase, as proteínas virais precoces E1 e E2 se expressam e permitem a replicação do DNA viral nas células basais e parabasais. O genoma viral se multiplica sob a forma episossomal na razão de 50 a 100 cópias por célula. As células filhas contendo o genoma viral migram em seguida para a camada parabasal mantendo-se em divisão celular subvertendo o programa de diferenciação epitelial. Os queratinócitos não infectados não entram mais em ciclo após deixarem a camada parabasal, enquanto que as células basais infectadas pelo HPV entram novamente em divisão para permitir a replicação do DNA viral (**Figura 3**) (MOUGIN, NICOLIER e DECRION-BARTHOD, 2008)

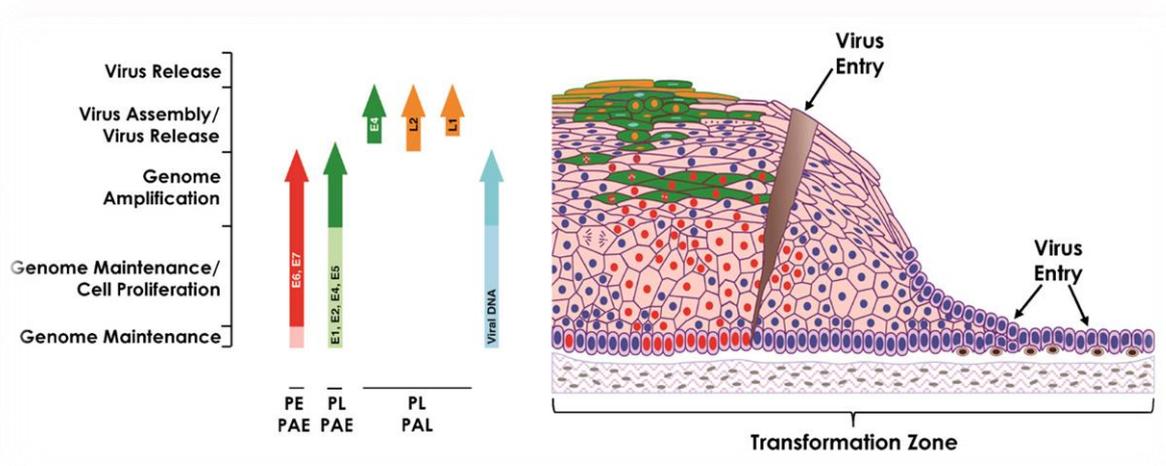


Figura 3 - O ciclo vital do Papilomavírus humano.

Fonte: J. Doorbar (2012)

Esse fenômeno é essencialmente devido à expressão da proteína viral E7 que inativa as proteínas da família Rb (proteínas do retino blastoma) do hospedeiro, responsáveis pela manutenção das células em G1. Estando pRb inibida, as células avançam para a fase S proliferativa benéfica ao ciclo viral produtivo (PRETÈT et al., 2010).

Numa segunda fase, há expressão das proteínas tardias L1 e L2 implicadas na formação do capsídeo viral. Novos vírions completos infectantes finalmente são liberados no meio exterior com as células descamativas, completando o ciclo do vírus (DOORBAR, 2005).

Quando ocorre quebra do genoma viral nas regiões E1 e E2, resultando na produção de uma proteína E2 mutada, que não é capaz de limitar a superexpressão de E6 e E7, há uma consequente instabilidade cromossômica na célula infectada. Nessa situação pode ocorrer integração do DNA viral ao DNA celular, iniciando assim, a transformação da célula hospedeira e imortalização de clones alterados (JEON e LAMBERT, 1995, MUNGER et al. 2004).

É justamente a perda da capacidade de completar o ciclo reprodutivo que diferencia a infecção viral produtiva infectante da infecção viral transformante e tumoral, característica dos HPV de alto risco. A progressão para uma NIC de grau maior ou câncer cervical está associada à perda da regulação deste ciclo reprodutivo do HPV, havendo superexpressão dos genes E6 e E7 (MUNGER et al. 1989).

O HPV interfere no controle do ciclo celular e na apoptose, por meio do produto de seus oncogenes E6 e E7 que se ligam e degradam respectivamente as proteínas supressoras de tumor p53 e pRB, ocasionando instabilidade genômica causadora de progressão neoplásica (DOORBAR et al. 2012).

A proteína celular p53 é responsável por ativar os genes de mecanismo de reparo do DNA ou sinalizar para apoptose. O gene viral E6 estando presente na célula, se liga a uma proteína de associação (E6-AP) com atividade ubiquitina ligase, resultando em ubiquitinação e degradação de p53 no proteassoma (**Figura 4**). Na sequência, sem a atividade de p53, a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos ao DNA, havendo acúmulos de mutações e consequentes clones celulares com fenótipos neoplásicos (MOUGIN, NICOLIER e DECRION-BARTHOD, 2008).

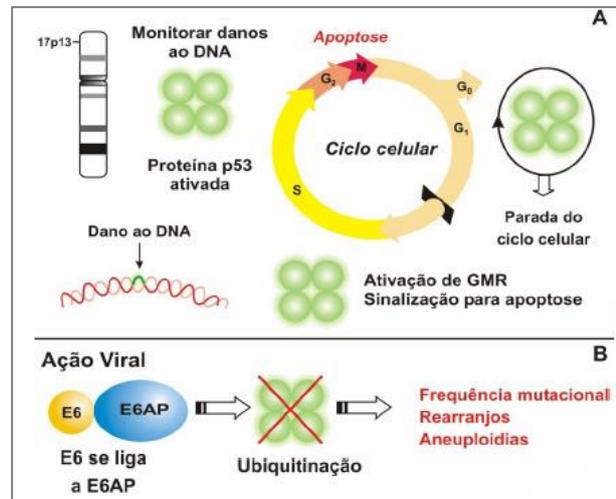


Figura 4 - Ação da interferência de E6 sobre ciclo celular. Fonte: Silva et al. (2003).

A expressão alterada do gene E7 inibe a atividade da proteína do retinoblastoma (pRb), que tem um papel fundamental na manutenção da célula em G1, por formar complexos estáveis com o fator de transcrição de RNA mensageiro, E2F (CARVALHO, 2010).

Na ausência da pRB, o E2F fica livre, indo ao núcleo, onde estimula numerosos genes cujos produtos proteicos (ciclina E, DNA-polimerases, helicases etc) promovem a replicação do DNA, liberando o ciclo celular (**Figura 5**) (KLAES e FRIEDRICH, 2001).

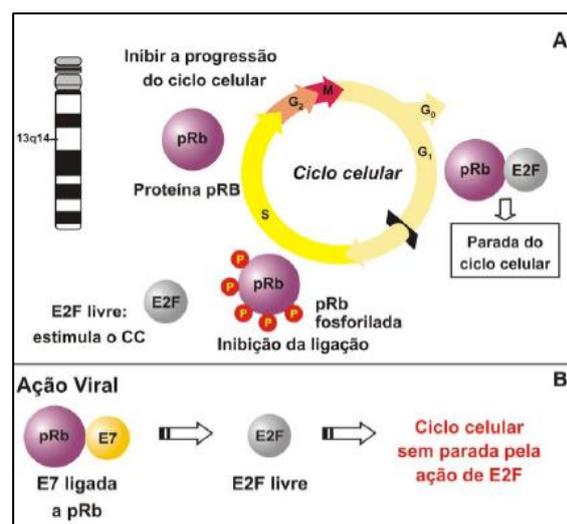


Figura 5 - Ação da interferência de E7 sobre o ciclo celular. Fonte: Silva et al. (2003).

A p53 é conhecida como a guardiã do genoma, pois atua como inibidora de CDK, mantendo o complexo pRb/E2F sustentando as células em fase G1, até que os sistemas de reparo do DNA corrijam o defeito provocado. Quando ocorrem defeitos no DNA que não são corrigidos, a p53 induz a célula a entrar em apoptose. Esse fato ilustra bem a cooperação entre pRb e p53 (BRASILEIRO FILHO et al., 2009).

2.3 A infecção viral

A infecção por HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais frequentes predominando em mulheres jovens, no início de sua vida sexual. Abaixo dos 25 anos são encontradas taxas elevadas havendo um progressivo decréscimo após essa idade, alcançando menos de 1% após os 55 anos. Essa queda é independente do comportamento sexual e parece estar mais relacionada ao desenvolvimento de imunidade tipo-específica à infecção (MONSONEGO et al., 2004).

A incidência do HPV de alto risco oncogênico tende a ser maior que os de baixo risco. Os subtipos mais frequentes são o 16, 18, 31, 33 e 51 (IARC, 1995). Os tipos 16 e 18 são aqueles encontrados com maior frequência nas lesões imediatamente pré-cancerosas (NIC 3) e nos cânceres (GARCIA-ESPINOSA et al., 2009).

No Brasil, o HPV 16 é o tipo predominante nos cânceres cervicais invasivos em todas as regiões geográficas. Em relação a outros tipos como os HPVs 18, 31 e 33 observam-se variações regionais. O HPV 18 é o segundo mais prevalente na maioria das regiões, com exceção do Centro-Oeste onde o HPV 33 ocupa essa posição (RIBEIRO, 2011) e do Nordeste, onde o HPV 31 é o segundo em prevalência (LORENZATO et al., 2000; SILVA et al., 2006; BALDEZ da SILVA et al., 2009).

A transmissão do vírus ocorre por contato sexual (SHIFFMAN e KJAER, 2003) sendo que no caso de vírus de baixo risco, por expressarem lesões produtivas muito infectantes, possa, às vezes, haver transmissão não sexual (MONSONEGO, 2010). Os vírus HPV são vírus não envelopados, portanto muito resistentes às condições do meio. Sendo particularmente, pouco sensíveis ao calor e ao cloro usado nas piscinas (PRÉTET et al., 2010).

Estudos epidemiológicos indicam que a idade em que ocorre a primeira relação sexual e o número de parceiros sexuais são fatores determinantes da infecção por HPV oncogênico (ROUSSEAU, FRANCO e VILLA, 2000; SILVA et al, 2006).

A maioria das infecções é controlada por mecanismos que não foram ainda perfeitamente elucidados. A eliminação viral é feita entre 8 e 16 meses, variando de acordo com os genótipos considerados. O HPV de baixo risco é eliminado em aproximadamente 3 a 6 meses, enquanto que para o HPV de alto risco esse tempo se estende para 12 a 18 meses (FRANCO et al., 1999; MUÑOZ et al. 2004).

A evolução natural da infecção por HPV é a cura espontânea, o que parece estar relacionado com mecanismos imunológicos humorais e celulares. Em certos casos a infecção pode ficar latente e ser reativada em um período de imunossupressão. Uma infecção por HPV de alto risco resulta em progressão para câncer cervical apenas em uma pequena percentagem de mulheres, após um longo período de persistência (zur HAUSEN, 1996; zur HAUSEN, 2002). A persistência da infecção é um fator preditor para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical, particularmente pelo HPV de alto risco (SCHLECH e KALUGA, 2001).

Permanece ainda obscuro por que somente em algumas mulheres, ocorre integração viral, situação encontrada na vigência de transformação maligna das células, que se tornam imortalizadas. Nos casos que evoluem para câncer, os genomas virais antes mantidos em forma episomal, passam, em algum momento, a integrar o genoma das células do hospedeiro (SCHIFFMAN e KJAER, 2003).

A integração viral é uma etapa chave para a carcinogênese cervical devido às alterações do ciclo celular do hospedeiro produzidas pela inibição de genes supressores de tumor, conseqüente à superexpressão dos genes virais E6 e E7. É a superexpressão contínua e concomitante desses dois genes que está na origem da imortalização das células infectadas (MÜNGER et al., 2003).

2.4 A vacina profilática

O HPV não se reproduz em cultura celular e por muito tempo foi difícil desenvolver uma vacina. Vacinas com vírus atenuados, oriundas deste tipo de fabricação, conteriam genes

virais potencialmente oncogênicos não podendo ser utilizadas em indivíduos saudáveis (MONSONEGO, 2006)

O desenvolvimento da vacina se iniciou com a produção da proteína L1, que compõe o capsídeo viral. Essas partículas pseudovirais, chamadas VLPs (*virus like particles*), parecem com o vírus, mas não contem seu material genético, não provocando doença, mas podem promover uma reação antigênica poderosa, capaz de eliminar o vírus em indivíduos ainda não infectados pelos tipos vacinais, uma vez que atua no vírus em sua forma completa infectante que contem ainda o capsídeo (STANLEY, LOWY e FRASER, 2006).

As VLPs tem grande poder imunogênico em doses de 10 a 50 microgramas depois de três doses intramusculares (VILLA et al., 2005).

Duas vacinas foram avaliadas sendo homologadas para comercialização entre 2006 e 2007: a vacina quadrivalente que utiliza as VLPs L1 dos HPV 6, 11,16 e 18, e a vacina bivalente constituída das VLPs L1 dos vírus HPV 16 e 18. Uma vacina polivalente de contendo tipos adicionais de HPV VLP além dos tipos 6, 11, 16 e 18,está sendo desenvolvida pelo Laboratório Merck (STANLEY,LOWY e FRASER, 2008)

O maior desafio ainda é conhecer melhor a resposta do hospedeiro à infecção. O meio biológico das células infectadas é determinante na expressão ou não dos genes virais transformantes (MONSONEGO, 2010).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar os genótipos do HPV presentes em mulheres portadoras de neoplasias intraepiteliais e invasoras do colo do útero, relacionando com o grau das lesões.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a prevalência dos tipos de HPV presentes;
- Relacionar os genótipos encontrados com o grau das lesões cervicais;
- Verificar a presença de infecção viral múltipla;
- Avaliar os cofatores envolvidos com a infecção por HPV.

4 MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, analítico, transversal.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no setor de Colposcopia e Patologia Cervical do Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

O Setor de Colposcopia e Patologia Cervical, como unidade de saúde de média complexidade, tem como enfoque principal atender à demanda de pacientes que são referenciadas do ambulatório de ginecologia do próprio hospital, da rede de assistência básica e de outros serviços, com resultado do exame citológico de rastreio mostrando anormalidades de células epiteliais, atendendo também pacientes encaminhadas com sinais clínicos de doença neoplásica invasora do colo do útero.

As pacientes, agendadas como colposcopia-referência são submetidas à nova coleta citológica convencional de confirmação, colposcopia e biópsia dirigida das áreas com aspectos colposcópicos anormais.

Após esses procedimentos, as pacientes são agendadas para consulta de retorno quando, de acordo com o resultado dos exames citológico e histológico é definida a conduta segundo protocolos preconizados pelo INCA em Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (INCA 2006).

Havendo indicação de tratamento cirúrgico por alça diatérmica, com bisturi de alta frequência (CAF), esse procedimento é realizado no ambulatório. Outros tipos de tratamento seja cirúrgico, quimioterápico e ou radioterápico são oferecidos no Serviço de Ginecologia ou no Serviço de Oncologia.

Também é assegurado o seguimento pós-tratamento, dentro da periodicidade indicada, pelo tempo necessário a cada caso. Os exames citológicos e histológicos são realizados no Serviço de Anatomia Patológica.

Nesta pesquisa os exames de Biologia Molecular foram realizados no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental do Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (LEMTE-UFPE).

4.3 População alvo e período

Foram convidadas a participar do estudo, pacientes referenciadas para o Setor de Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior do Hospital das Clínicas – UFPE, apresentando anormalidades de células epiteliais, ou sinais clínicos de neoplasia invasora do colo do útero, no período de janeiro a setembro de 2013. Desta forma a coleta de dados foi realizada de forma sequencial. O número de participantes foi de 104 mulheres.

4.4 Critérios de inclusão e de exclusão

Incluímos neste estudo, mulheres maiores de 18 anos, referenciadas para colposcopia no Hospital das Clínicas da UFPE, no período de janeiro a setembro de 2013. Todas aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram excluídas: gestantes, portadoras do vírus HIV e mulheres em uso de medicamentos imunossupressores.

4.5 Método de coletas

Após os esclarecimentos necessários e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi feito o registro, em formulário próprio para o estudo, da idade da paciente, do número de gestações, idade da primeira relação sexual e do número parceiros sexuais. Também foi interrogado sobre o uso de anticoncepcional hormonal e sobre o hábito de fumar.

Após a anamnese foi realizado o exame ginecológico, iniciando com a inspeção da vulva, e em seguida o exame especular. Nesse momento foi colhido material da ectocervice

com espátula de Ayres, e da endocervice com escova ginecológica, para um esfregaço citológico convencional fixado em álcool absoluto. A escova de coleta endocervical após ser espalhada na lamina, não foi descartada, sendo colocada em um tubo criogênico de 2 ml, com solução preservadora de DNA (PBS pH 7.4).

Em seguida foi realizada a colposcopia, usando o ácido acético a 3%, e a solução de lugol para o teste de Schiller. Foram realizadas biopsias dirigidas das áreas com anormalidades colposcópicas encontradas, usando pinça de Gaylor-Medina de 0.5cm de diâmetro, tomando-se múltiplos fragmentos que foram fixados em formol a 10% tamponado. A hemostasia foi feita com gel de cloreto férrico a 48% e tamponamento vaginal, orientando a paciente a retirá-lo após 24 horas.

A colposcopia foi descrita segundo a Nomenclatura Colposcópica da *Internacional Federation for Cervical Pathology and Colposcopy*- IFCPC, 2011 (BORNSTEIN et al. 2011).

O material para citologia convencional e os fragmentos de biopsia seguiram para o Laboratório de Anatomia Patológica do HC, acompanhados das respectivas fichas de requisição padronizadas pelo Ministério da Saúde.

O escovado cervical colocado em tubo criogênico com solução preservadora de DNA, foi enviado para o Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental do Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, onde foi pesquisada a presença HPV e feita a genotipagem.

4.6 Técnicas laboratoriais

Citologia oncótica

A citologia oncótica foi realizada em esfregaço convencional fixado em álcool absoluto, corado pela técnica de Papanicolau. Os laudos foram emitidos utilizando-se a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas (INCA 2006).

Histopatologia

Os fragmentos obtidos por biópsia foram incluídos em blocos de parafina, obtendo-se cortes de 4 a 7 mm. As preparações foram coradas utilizando-se hematoxilina e eosina (HE). Os laudos foram emitidos segundo a Nomenclatura de Richart (RICHART, 1973).

Detecção e genotipagem do HPV

Para a extração de DNA viral foi utilizado o Kit *DNeasy Blood Tissue* (Qiagen), a partir do escovado cervical, seguindo as seguintes etapas: Ressuspensão do *pellet* celular em PBS (pH 7.4), lise celular, purificação, lavagem e secagem do material, bem como eluição para obtenção do DNA.

Posteriormente, todos os produtos da extração foram quantificados e qualificados, utilizando um espectrofotômetro (*Nano Vue Plus Spectrophotometer*) para posterior utilização na PCR.

A detecção do DNA do HPV foi realizada pela técnica da PCR convencional, através da amplificação do gene codificador da proteína L1, utilizando os *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11) (**Tabela 1**) para uma ampla faixa dos diferentes tipos de HPV na região do gene viral L1 (Karlsen et al., 1996).

Tabela 1 - *Primers* utilizados na detecção do HPV

PRIMER	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	TAMANHO (BP)	
		OLIGO	FRAGMENTO
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	20	
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	20	445

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 54°C durante um minuto, seguida de 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto e extensão final a 72°C durante 10 minutos. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo (plasmídeo do HPV-16 clonado) e negativo (água milli-Q). Os produtos

da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose na concentração de 2% corados com brometo de etídio.

A tipificação do DNA do HPV foi realizada pela técnica de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos específicos para os HPVs 16, 18, 31, 33 e 58, os quais anelam no oncogene E6 (**Tabela 2**).

Tabela 2 - *Primers* utilizados na tipificação do HPV

PRIMERS	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	TAMANHO (BP)	
		OLIGO	FRAGMENTO
E6 HPV16 - <i>Forward</i>	TTCTAAGGCCAACTAAATGTCACCC	25	769
E6 HPV16 - <i>Reverse</i>	TAGAGATCAGTTGTCTCTGGTTGC	24	
E6 HPV18 - <i>Forward</i>	TTG GGCAGCACATACTATAC	20	732
E6 HPV18 - <i>Reverse</i>	CATCGTTTTCTTCCTGTGAGT	21	
E6 HPV31 - <i>Forward</i>	CGTTTTTCGGTTACAGTTTTACAAGC	25	728
E6 HPV31 - <i>Reverse</i>	AGCTGGACTGTCTATGACAT	20	
E6 HPV33 - <i>Forward</i>	TTCAAACCTTAAGTGCAGTTTTGGC	25	747
E6 HPV33 - <i>Reverse</i>	TTCCTTTAACGTTGGCTTGTGTCC	24	
E6 HPV58 - <i>Forward</i>	CCGTTTTGGGTCACATTGTTTCATGT	25	733
E6 HPV58 - <i>Reverse</i>	AAGCCTATTTTCATCCTCGTCTGAG	24	

A tipificação viral foi realizada por amplificação de DNA através de reação de PCR em um volume final de 25µl, contendo 12.5µl de Master Mix (GoTaq Green PCR Marter Mix, Promega), 1.5µl de cada *primer* (10 pM/µl), 5.5µl de água sem nuclease (Nuclease-Free Water, Promega) e 4µl de DNA (50 ng/µl) de cada amostra. As condições de amplificação foram: Desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 57°C para HPV-16, 53°C para HPV-18 55°C para HPV-31, 58°C para HPV-33 e 59°C para HPV-58, todos por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 5 minutos. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles positivo e negativo

(água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5% corados com brometo de etídio.

4.7 Definição das variáveis

São considerados três grupos de variáveis: independentes, dependentes e de caracterização amostral.

Quadros 1 - Variáveis, definições e desfechos investigados

VARIÁVEIS DEPENDENTES		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Genótipo do HPV	Tipo do HPV presente em amostras positivas.	HPV 16 HPV 18 HPV 31 HPV 33 HPV 58

VARIÁVEIS INDEPENDENTES		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIAS
Diagnóstico citológico	Resultado da observação microscópica das células do esfregaço da cérvix uterina coradas pelo método de Papanicolaou.	Células Escamosas Atípicas: de significado indeterminado /não podendo afastar alto grau Células Glandulares Atípicas Lesão Intraepitelial de Baixo Grau Lesão Intraepitelial de Alto Grau Carcinoma escamoso invasor Adenocarcinoma <i>in situ</i> Adenocarcinoma invasor
Diagnóstico Histológico	Resultado da avaliação das alterações histológicas em material de biopsia da cérvix uterina, observando os critérios de Richart.	Benigno Neoplasia intraepitelial cervical grau 1 Neoplasia intraepitelial cervical grau 2 Neoplasia intraepitelial cervical grau 3 Carcinoma invasor

VARIÁVEIS DE CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIAS
Idade	Número de anos completos transcorridos entre a data de nascimento e a data do atendimento.	≤ 20 a 29 anos 30 a 39 anos 40 a 49 anos 50 a 59 anos 60 a 69 anos ≥ 70 anos
Coitarca	Idade informada em que ocorreu o primeiro coito.	10 a 19 anos 20 a 30 anos
Número de gestações	Corresponde ao número de gestações informados, ocorridos até a data do atendimento.	1-2 ≥ 3
Número de parceiros	Representado pela quantidade de indivíduos do sexo masculino com quem declarou ter mantido intercurso sexual.	01 02 ≥ 03
Uso de contraceptivos hormonais	Considerado o relato do uso de anticoncepcionais hormonais.	Sim Não
Tabagismo	Considerado como relatado pela paciente o consumo de pelo menos um cigarro por dia.	Sim Não

4.8 Métodos de análise estatística

Para análise estatística de associação da infecção pelo HPV com os fatores de risco, utilizaram-se o *Odds Ratio*(OR) com intervalo de Confiança (IC) ao nível de significância de $p \leq 0.05$. Para o ajuste do efeito de cada uma das variáveis empregou-se o modelo de regressão logística com significância expressa pelo valor de p.

4.9 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFPE (CEP/CCS/UFPE) em 18/12/2012, CAAE: nº 09307612.8.0000.5208.

TÍTULO

PREVALÊNCIA, PERFIL GENOTÍPICO E FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MULHERES REFERENCIADAS PARA COLPOSCOPIA

RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais frequentes em toda população mundial, porém, a maioria das mulheres infectadas será bem sucedida na eliminação do vírus e, conseqüentemente não desenvolverá doença, podendo apresentar regressão das lesões ou estabilização em estágios não invasivos de neoplasia cervical.

O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de HPV de alto risco e seus respectivos genótipos, em infecções únicas ou múltiplas, correlacionando com o grau da neoplasia.

Trata-se um estudo analítico, transversal realizado em mulheres, referenciadas para colposcopia com citologia prévia alterada. Todas realizaram uma segunda citologia em esfregaço convencional, testes de detecção de HPV em escovado endocervical por reação em cadeia da polimerase (PCR) e colposcopia. As que apresentaram anormalidades à colposcopia foram submetidas à biopsia

O câncer cervical invasor foi diagnosticado em mulheres na faixa etária abaixo dos 50 anos. O teste de detecção do HPV de alto risco foi positivo em 81.5% dos casos, em infecções únicas e múltiplas. Os tipos de HPV mais prevalentes foram, na sequência: 16, 31, 58, 18, 33. O HPV-16 foi o mais frequente associado em percentuais importantes à NIC 3 e câncer invasor. O segundo foi o HPV-31 em infecções múltiplas.

Os dois tipos de HPV mais prevalentes foram HPV-16 e HPV-31, frequentemente associados a lesões de alto grau histológico, principalmente quando em infecção dupla 16/31.

PALAVRAS-CHAVE: Neoplasia intraepitelial cervical. Câncer do colo do útero. HPV. PCR.

PREVALENCE, GENOTYPIC, PROFILE AND RISK FACTORS FOR PAPILOMAVIRUS INFECTIONS IN
WOMEN REFERRED FOR COLPOSCOPY**ABSTRACT**

Infection with Human Papillomavirus (HPV) is one of the most common STDs across the world's population , however , most infected women will be successful in eliminating the virus and therefore not develop the disease may present regression of lesions or stabilization in non- invasive stages of cervical neoplasia.

The purpose of the study was to evaluate the prevalence of high-risk HPV and their genotypes in single or multiple infections, correlating with the degree of malignancy.

This was a cross sectional study in women referred for colposcopy for abnormal Pap smear. All underwent second conventional cytology smears, a testing for HPV in endocervical brushed by polymerase chain reaction (PCR) and colposcopy. Women who exhibited abnormalities to colposcopy were biopsied.

Invasive cervical cancer was diagnosed in women aged below 50 years. HPV tests were positive in 81.5% of cases in single and multiple infections. HPV types were more prevalent in the sequence were, the types 16, 31,58,18,33. HPV - 16 was the most frequent associated in important percentage of CIN 3 and invasive cancer. The second most frequently detected HPV 31 in multiple infections.

The two most prevalent HPV types were 16 and 31 often associated with high histological grade lesions, especially when in dual infection 16/31.

KEY WORDS: Cervical intraepithelial neoplasia. Invasive cervical cancer. HPV. PCR.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais frequentes em toda população mundial (BOSCH et al., 2008). Apesar disso, a maioria das mulheres infectadas será bem sucedida na eliminação do vírus e, conseqüentemente, não desenvolverá a doença, podendo apresentar regressão das lesões ou estabilização em estágios não invasivos (NOBBENHUIS et al., 1999).

As neoplasias intraepiteliais e invasoras do colo do útero são mediadas pela infecção persistente pelo HPV. Certos tipos virais são admitidos como fator causal, porém não são suficientes para o desenvolvimento do câncer cervical e de suas lesões precursoras. São necessários cofatores como idade, estado nutricional, tabagismo, infecção por *Chlamydia trachomatis*, polimorfismo genético, uso de anticoncepcionais orais e supressão imunológica (zur HAUSEN, 2002; RODRIGUES et al, 2010; TOTA et al, 2011).

Entre os tipos de HPV que infectam o trato ano-genital, há os denominados de alto risco (AR) pela propensão das células infectadas progredirem a invasão. São os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (MUÑOZ et al, 2003; de VILLIERS, 2004).

Atualmente, após décadas de prevenção secundária com citologia, colposcopia e histologia de fragmentos de biópsia, diagnosticando e tratando lesões precursoras, através de programas governamentais, a incidência permanece elevada, principalmente em países em desenvolvimento (GUSTAFSSON et al, 1997; PARKIN e BRAY, 2006).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer para 2014, são esperados 15.540 novos casos, com risco de 15 casos/100.000 mulheres. Mesmo diante desta projeção, não temos o teste de detecção do HPV como ferramenta, junto com a citologia, nos programas de rastreamento na rede pública. As dificuldades com a cobertura ainda são grandes, mantendo-se abaixo do patamar satisfatório que possa causar impacto na redução da incidência do câncer do colo (INCA, 2013)

Há a perspectiva de que a partir de março de 2014, a vacina quadrivalente que contempla os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18 será incorporada ao calendário vacinal na rede pública, para adolescentes com faixa etária entre 11 a 13 anos (INCA, 2013), a qual poderá

mudar o cenário das lesões e a prevalência dos genótipos do HPV haja vista a diversidade de vírus de baixo e alto risco.

Dada a importância e magnitude dessa infecção, o objetivo desta pesquisa foi verificar a prevalência de HPV de alto risco e seus respectivos genótipos, em infecções únicas ou múltiplas. Para isso, foi desenvolvido um estudo analítico, transversal realizado em mulheres, potencialmente infectadas, referenciadas para colposcopia com citologia prévia alterada, correlacionando com o grau da neoplasia, além de avaliar os cofatores envolvidos, analisando as características amostrais e comportamentais da região Nordeste do Brasil.

A identificação dos tipos virais envolvidos e dos fatores de risco mais significativos, em região de elevada incidência de câncer do colo do útero, como o local onde foi realizado o estudo, poderá contribuir para contextualizar os programas de prevenção primária através da adoção de vacinas profiláticas e de estratégias de rastreamento ajustados ao perfil epidemiológico desta população.

MÉTODO

Grupo estudado e coleta das amostras

O estudo foi realizado com 104 mulheres referenciadas para o Setor de Colposcopia e Patologia Cervical do Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, durante o período de janeiro a setembro de 2013. Foram excluídas: gestantes, portadoras do vírus HIV e mulheres em uso de medicamentos imunossupressores.

Este estudo foi previamente apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) em 18/12/2012, CAAE nº 09307612.8.0000.5208(**Anexo A**).

O processo de coleta de dados iniciou com a assinatura das participantes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice A**), passando-se ao registro em formulário próprio dos dados referentes a: idade, número de gestações, coitarca e o número parceiros, como também o uso de anticoncepcional hormonal e tabagismo(**Apêndice B**).

O exame ginecológico teve início com a coleta de material da ectocervice com espátula de Ayres e da endocervice, com escova ginecológica para esfregaço citológico convencional. A escova de coleta endocervical após ser espalhada na lâmina, não foi descartada, sendo colocada em tubo criogênico de 2 ml com solução preservadora de DNA (PBS pH 7.4). Em seguida, procedeu-se a colposcopia, usando ácido acético a 3%, e o teste de Schiller com solução de lugol a 4%. As áreas com anormalidades colposcópicas foram biopsiadas com pinça de Gaylor-Medina de 0.5cm de diâmetro, tomando-se múltiplos fragmentos colocados em formol a 10% tamponado.

A colposcopia foi descrita segundo Nomenclatura Colposcópica da *Internacional Federation for Cervical Pathology and Colposcopy-IFCPC*, 2011 (BORNSTEIN et al. 2011). Para descrição dos esfregaços citológicos foi utilizada a Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Conduas Preconizadas (INCA, 2006) e, para diagnóstico histológico foram utilizados os critérios descritos por Richart (RICHART, 1973).

Deteção e genotipagem do HPV

A deteção do DNA do HPV foi realizada pela técnica da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) convencional, através da amplificação do gene codificador da proteína L1, utilizando os *primers* de consenso e degenerados MY09/MY11 para ampla faixa dos diferentes tipos de HPV na região do gene viral L1 (Karlsen *et al.*, 1996). Todas as amostras foram amplificadas na presença de controlos positivo (plasmídeo do HPV-16 clonado) e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose na concentração de 2% corados com brometo de etídio.

A tipificação do DNA do HPV foi realizada por amplificação de DNA através de reação de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos específicos para os HPV 16, 18, 31, 33 e 58, os quais anelam no oncogene E6, em um volume final de 25µl, contendo 12.5µl de Master Mix (GoTaq Green PCR Marter Mix, Promega), 1.5µl de cada *primer* (10 pM/µl), 5.5µl de água sem nuclease (Nuclease-Free Water, Promega) e 4µl de DNA (50 ng/µl) de cada amostra. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 57°C para HPV-16, 53°C para HPV-18, 55°C para HPV-31, 58°C para HPV-33 e 59°C para HPV-58, todos por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 5 minutos. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controlos positivo e negativo (água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5% corados com brometo de etídio.

Análise estatística

Para análise estatística de associação da infeção pelo HPV com os fatores de risco, utilizaram-se o *Odds Ratio* (OR) com intervalo de Confiança (IC) ao nível de significância de $p \leq 0,05$. Para o ajuste do efeito de cada um a das variáveis empregou-se o modelo de regressão logística com significância expressa pelo valor de p .

RESULTADOS

Características da amostra

Participaram deste estudo 104 mulheres com idade média igual a $36.08 \pm 11,62$ anos. De forma geral, a idade variou entre 18 e 82 anos, com predomínio nas faixas de ≥ 20 a 29 anos e 30 a 39 anos, representando 33.7% e 35.5%, respectivamente, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Distribuição segundo a faixa etária

Faixa etária	n	%
≤ 20 a 29	35	33.65
30 a 39	37	35.58
40 a 49	22	21.15
50 a 59	3	2.89
60 a 69	5	4.81
≥ 70	2	1.92

O início da atividade sexual variou entre 10 e 30 anos, com média de idade de 16.90 ± 3.84 anos, sendo que para 85 mulheres (81.7%) ocorreu na faixa dos 10 aos 19 anos e nas outras 19 (18.27) entre 20 e 30 anos. Quanto ao número de parceiros sexuais, 22 (21.2%) referiram um único parceiro, 24 (23.1%) afirmaram ter dois e 58 (55.8%) tiveram três ou mais parceiros.

O uso de anticoncepcionais hormonais foi referido por 28 participantes em 104 (26.92%), e, 15 (14.4%) afirmaram ser fumantes.

Resultados da citologia

Foram analisadas as citologias de todas as participantes conforme apresentado na **Tabela 2**. Para 29 casos (27.9%) o resultado foi negativo, havendo discordância com a citologia de rastreio que motivou o encaminhamento para colposcopia. O intervalo médio entre as primeira e segunda citologia foi de quatro meses.

Tabela 2 - Resultados da segunda citologia

Citologia	n	%
Negativa	29	27.88
ASC-US	10	9.62
ASC-H	2	1.92
ACG	1	0.96
LIEBG	14	13.46
LIEAG	35	33.66
CEI	10	9.62
Adenocarcinoma in situ	1	0.96
Adenocarcinoma	0	0.00
Insatisfatória	2	1.92
TOTAL	104	100

ASC-US: atipia de células escamosas de significado indeterminado; ASC-H: atipia de células escamosas não podendo afastar alto grau; AGG: atipia de células glandulares; LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau; CEI: carcinoma invasor.

Resultados da histologia

De todas as participantes (104), 93 apresentavam achados colposcópicos anormais, sendo submetidas à biopsia. Os resultados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Resultados da histologia

Histologia	N	%
Benigno	16	17.20
NIC 1	30	32.26
NIC 2	13	13.98
NIC 3	20	21.51
CEI	12	12.90
Adenocarcinoma	2	2.5
TOTAL	93	100

A média de idade relacionada com os resultados histológicos está representada o **Gráfico 1**.

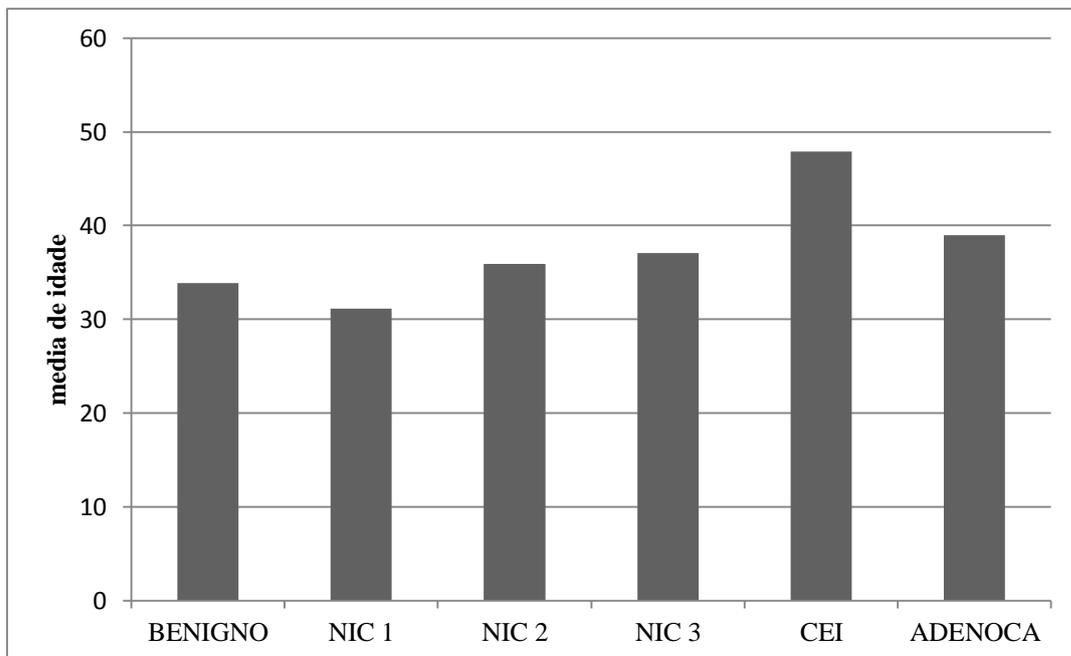


Gráfico 1 - Média de idade em relação aos resultados da histologia

Análise da prevalência e distribuição da infecção por HPV

A detecção de DNA viral foi realizada inicialmente a partir de *primers* genéricos MY09/MY11 (amplificação da região L1 do genoma viral de 445 bp) a partir de 97 amostras. Em sete amostras, a quantidade de DNA extraído não foi suficiente para realização da técnica de PCR. O teste foi positivo em 79 amostras (81.44%) (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Distribuição das amostras analisadas quanto à detecção viral

HPV	n	%
Positivo	79	81.44
Negativo	18	18.56
TOTAL	97	100

Para a análise de genotipagem foram utilizados *primers* específicos para cinco tipos de HPV de alto risco: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-58.

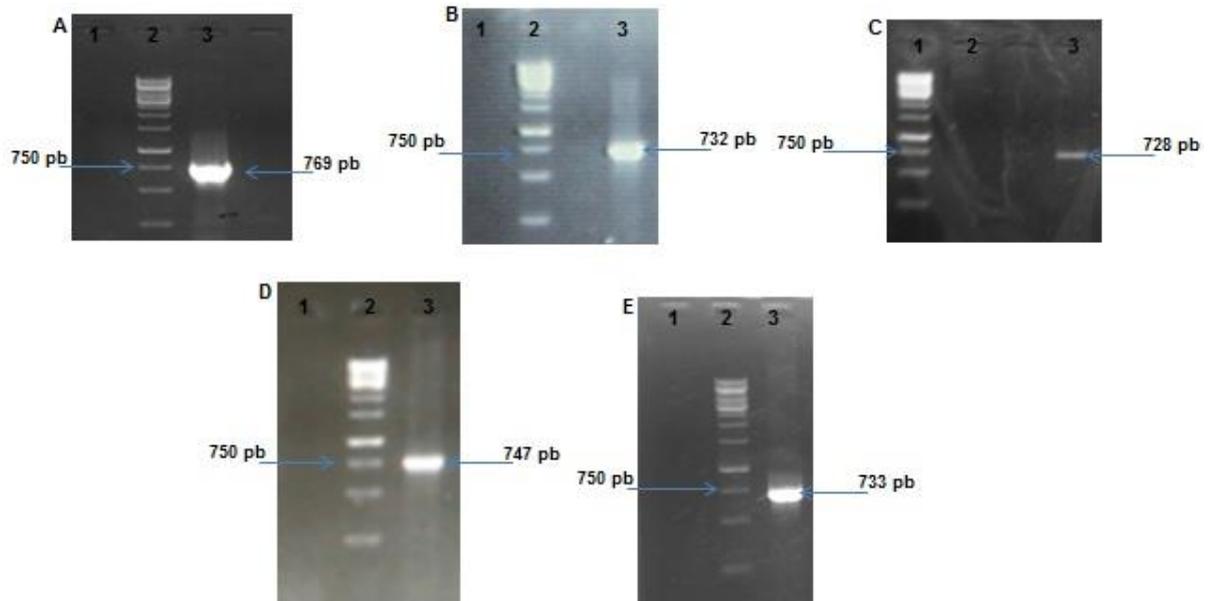


Figura 1 - Gel representativo demonstrando a tipificação viral com o uso de *primers* específicos para E6 dos HPVs 16, 18, 31, 33 e 58. Géis de agarose 1.5% corados com brometo de etídio. **(A) E6 HPV-16:** 1- controle negativo da reação; 2- marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder – Thermo Scientific); 3- fragmento amplificado. **(B) E6 HPV-18:** 1- controle negativo da reação; 2- marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder – Thermo Scientific); 3- fragmento amplificado. **(C) E6 HPV-31:** 1- marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder – Thermo Scientific); 2- controle negativo da reação; 3- fragmento amplificado. **(D) E6 HPV-33:** 1- controle negativo da reação; 2- marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder – Thermo Scientific); 3- fragmento amplificado. **(E) E6 HPV-58:** 1- controle negativo da reação; 2- marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder – Thermo Scientific); 3- fragmento amplificado.

Conforme demonstrado no **Gráfico 2**, a prevalência dos genótipos encontrados nos 79 testes positivos foi: HPV-16 em 55 testes (69.6%); HPV-31 em 40 testes (50.5%); HPV-58 em 20 (25.3%); o HPV-18 esteve presente em oito (10.1%) e o HPV-33 em cinco testes (6.3%).

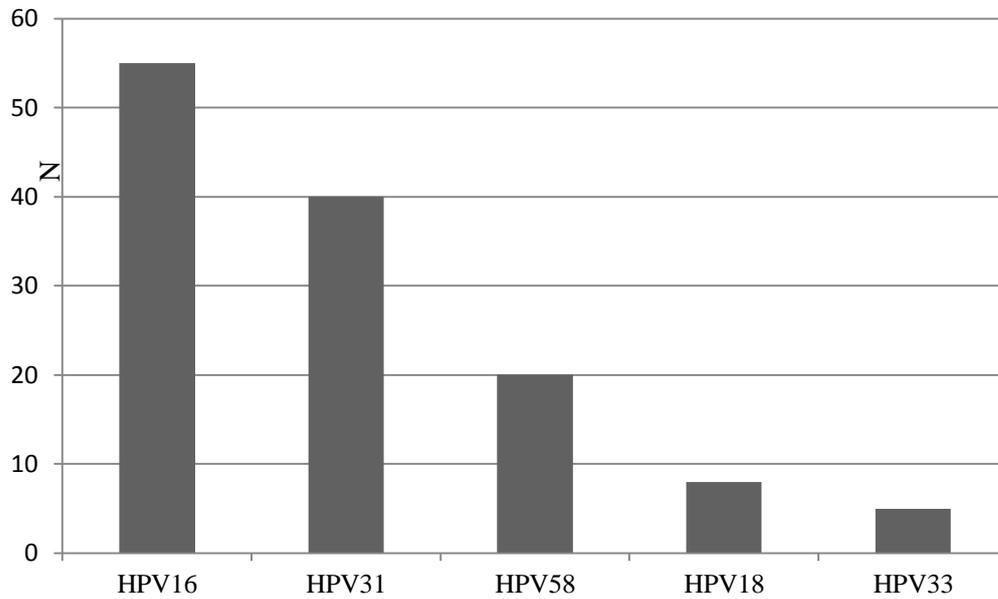


Gráfico 2 - Distribuição dos genótipos nos testes positivos

As **Tabelas 5 e 6** mostram os resultados obtidos pelo cálculo dos percentuais, da análise comparativa dos exames citológicos e histológicos com a detecção do HPV-AR (HPV de alto risco) e dos genótipos pesquisados.

Foi observada positividade para HPV-AR em 77 (81.0%) dos 95 casos com citologias satisfatórias.

O HPV-16 foi o mais prevalente em todos os graus de anormalidade citológica, tendo maior percentual (65.6%) na lesão de alto (LIEAG). O segundo mais prevalente foi o HPV-31, que mostrou a mesma prevalência que o HPV-16 (50.0%) na lesão de baixo grau (LIEBG) e percentuais bem mais baixos (34.4%) do que o HPV-16 na LIEAG (65.6%).

Não houve diferenças importantes entre a infecção única ou múltipla em relação aos graus de anormalidade na citologia. Entretanto, nos casos em que a citologia foi negativa, observou-se que a infecção única esteve mais presente (44.4%) do que a infecção múltipla (33.3%) (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Associação da citologia com a presença de HPV-AR e genótipos pesquisados

	CITOLOGIA													
	Negativo		ASCUS		LIEBG		ASC-H		LIEAG		ACG/AIS		CEI	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Total	27	100	10	100	12	100	2	100	32	100	2	100	10	100
HPV-AR positivo	21	77.78	9	90.00	9	75.00	2	100.00	9	90.63	2	100.00	5	50.00
HPV - 16	13	48.15	5	50.00	6	50.00	2	100.00	21	65.63	1	50.00	5	50.00
HPV - 18	1	3.70	0	0.00	1	8.33	0	0.00	4	12.50	2	100.00	0	0.00
HPV - 31	13	48.15	5	50.00	6	50.00	0	0.00	11	34.38	1	50.00	2	20.00
HPV - 33	1	3.70	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	12.50	0	0.00	0	0.00
HPV - 58	4	14.81	3	30.00	2	16.67	0	0.00	9	28.13	0	0.00	0	0.00
Infecção Única	12	44.44	4	40.00	2	16.67	2	100.00	14	43.75	0	0.00	3	30.00
Infecção Múltipla	9	33.33	5	50.00	7	58.33	0	0.00	15	46.88	2	100.00	2	20.00

Na **Tabela 6** é possível verificar a avaliação dos 86 casos que realizaram biopsias, observando-se os seguintes resultados: Negativo (n=16), NIC 1 (n=26), NIC 2 (n=11); NIC 3 (n=19) e carcinoma invasor (n=14).

O HPV-16 foi o mais prevalente em todas as lesões, apresentando percentuais mais altos na NIC 3 (73.7%) e no câncer invasor (64.3%). Na sequência, aparece o HPV-31, sendo que esse tipo apresentou maior percentual nos casos de NIC 1 (61.5%) do que nos graus mais graves.

O HPV-18 e o HPV-33 mostraram os menores percentuais, verificando-se, entretanto, o HPV-18 presente em mais casos de NIC 2 (18.2%) e NIC 3 (15.8%) do que em NIC 1 (3.8%). Nos casos em que o exame histopatológico mostrou achados benignos, o HPV-18 não esteve presente. Por outro lado, o HPV-33 só esteve presente nos casos de NIC 2 (18.2%) e NIC 3 (10.5%).

O HPV-58 foi observado associado a resultados benignos e ao câncer invasor em percentuais baixos (6.25% e 7.4% respectivamente). Em NIC 1 esteve presente em 23.1%, em NIC 2 representou 27.3% e em NIC 3 apresentou percentual de 31.6%.

Tabela 6 - Associação da histologia com a presença de HPV-AR

	HISTOLOGIA									
	Benigno		NIC1		NIC2		NIC3		Câncer Invasor	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Total	16	100	26	100	11	100	19	100	14	100
HPV – AR positivo	7	43.75	24	92.31	9	81.82	18	94.74	10	71.43
HPV - 16	5	31.25	15	57.69	5	45.45	14	73.68	9	64.29
HPV - 18	0	0.00	1	3.85	2	18.18	3	15.79	1	7.14
HPV - 31	2	12.50	16	61.54	3	27.27	7	36.84	5	35.71
HPV - 33	0	0.00	0	0.00	2	18.18	2	10.53	0	0.00
HPV - 58	1	6.25	6	23.08	3	27.27	6	31.58	1	7.14
Infecção Única	6	37.50	11	4.30	4	36.36	7	36.84	5	35.71
Infecção Múltipla	1	6.25	13	50.00	5	45.45	11	57.89	5	35.71

Na análise dos 79 resultados positivos observamos que em 38 casos (48%) houve positividade para um único genótipo. A infecção múltipla apareceu em 41 casos (52%).

Na infecção única, o HPV-16 esteve mais presente (63.2%), Na sequência estiveram: HPV-31 (21.1%), o HPV-58 (10,5%) e o HPV-33 (5.7%). O HPV-18 não apareceu em nenhum caso de infecção única.

Nas infecções múltiplas a associação mais frequente foi entre os tipos 16/31(48.8%) seguida por 16/58 e 31/58 (9.8%). As associações 16/18, 31/18, 33/58 apresentaram os mesmos percentuais (4.9%). A coinfeção menos encontrada foi dos tipos 18/58 (2.4%). Na associação de três genótipos, o grupo 16/31/58 foi o mais observado (12.2%).

A **Tabela 7** demonstra uma associação dos resultados da histologia com os genótipos pesquisados em relação às infecções únicas ou múltiplas.

Foi observado que o HPV-16 é o mais prevalente e mostra percentuais maiores em infecção múltipla na NIC 3 (42.1%), aparecendo também com percentuais altos em infecção única (31.6%). No carcinoma invasor, o HPV-16 aparece em infecção única (35.7%) e infecção múltipla (28.6%).

O HPV-31 mostra os maiores percentuais de infecção múltipla tanto em NIC 1 (46.2%) como em NIC 3 (36.8%) e câncer invasor (37.7%). Por outro lado, o HPV-18 só apareceu em infecção múltipla e, embora ocupe a quarta posição de prevalência neste estudo, esteve presente em 18.2% na NIC 2 e 15.8% na NIC 3. Finalmente, o HPV-33 é o menos frequente nesta análise, mostrando-se apenas em infecção única, relacionada à NIC 2 (18.2%) e, em infecção múltipla, relacionado com NIC 3 (10.5%).

Fatores de Risco

A associação entre os fatores de risco e a infecção por HPV, analisadas pelo cálculo do *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% está representada na **Tabela 8**. Apesar de não ter sido evidenciada associação estatisticamente significativa, o número de parceiros sexuais foi o fator de maior risco relacionado com a infecção pelo HPV, no grupo estudado.

Tabela 8 - Associação de fatores de risco e infecção pelo HPV-AR

Variáveis	Infecção por HPV	Total	%	OR(IC 95%)	P
Idade					
≤ 30	28	33	84.85	0.9(0.5-1.8)	1
>30	49	62	79.04		
Coitarca					
10-19	62	79	78.49	0.9(0.5-1.8)	1
20-30	15	16	93.75		
Número de Parceiros					
1	16	19	84.21	0.8(0.3-0.8)	0.39
2	16	22	72.73		
≥ 3	45	54	83.33		
Número de gestações					
1 -2	40	46	86.96	0.8(0.4-1.5)	0.77
≥ 3	37	49	75.51		
Anticoncepcional hormonal					
sim	21	24	87.50	0.94(0.4-1.8)	1
não	56	71	78.87		
tabagismo					
sim	10	13	76.92	1.0(0.4-2.6)	1
não	67	82	81.71		

Uma análise de regressão linear para os cofatores: idade, coitarca, número de parceiros sexuais, tempo de atividade sexual (considerado como o intervalo de tempo em anos entre a idade da primeira relação e a idade na ocasião do diagnóstico), número de gestações, o uso de anticoncepcional hormonal e o tabagismo mostrou significância para determinados tipos de HPV em relação à idade ($p=0.01$) para os tipos 16, 31 e 58; em relação ao tempo de atividade sexual ($p=0.01$) e ao número de gestações para os tipos 16, 18, 31 e 58, conforme descrito na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Fatores de risco em relação ao tipo de HPV-AR

Variável	Tipo do HPV	P
Idade	16, 31, 58	0.01
Coitarca		NS
Número de parceiros sexuais		NS
Tempo de atividade sexual	16,18,31,58	0.01
Número de gestações	16,18,31,58	0.05
Anticoncepcional Hormonal		NS
Tabagismo		NS

NS-não significativo

DISCUSSÃO

O câncer cervical é precedido por uma longa fase de doença pré-invasora denominada de neoplasia intraepitelial cervical sendo, por isso, possível de ser detectada e prevenida (OSTÖR, 1993).

A prevenção do câncer do colo uterino através do diagnóstico e do tratamento das lesões precursoras, entendida com prevenção secundária, tem sido uma estratégia bem sucedida em países desenvolvidos (GUSTAFSSON et al. 2000).

No Brasil, dificuldades na execução dos programas de rastreio, através da citologia, e no cumprimento do fluxograma preconizado pelo Ministério da Saúde (INCA 2006), tem resultado na manutenção da alta incidência do câncer cervical no país.

Neste estudo, realizado em unidade de referência para colposcopia no município de Recife, Pernambuco - Brasil, no período de janeiro a setembro de 2013, com mulheres referenciadas por citologia de rastreio anormal, ocorreram 14 casos de câncer invasor (13.5%).

O protocolo do Serviço de Ginecologia da UFPE inclui uma segunda citologia de confirmação na ocasião da colposcopia, tendo sido encontrada uma discordância entre a primeira e a segunda citologia de 29 casos (27.9%). Este alto percentual de discordância pode estar relacionado à baixa reprodutibilidade da citologia entre observadores, sobretudo para graus mais baixos de anormalidades epiteliais como ASC-US e LIEBG (BIGRAS et al, 2013).

A baixa sensibilidade e reprodutibilidade do método em graus mais leves soma-se à deficiência na coleta, na fixação e no transporte das amostras nas unidades de assistência básica de saúde, nem sempre realizada por profissional bem treinado e experiente. O tempo de intervalo entre os dois exames variou entre 1 e 13 meses, com média de 4.6 meses, demonstrando retardo na rede de referência. O falso negativo da segunda citologia foi de apenas um caso no qual a primeira foi de LIEAG e a biopsia de mostrou NIC 2.

O teste para detecção de HPV foi positivo em 21 destes casos em que a segunda citologia foi negativa, mostrando a possibilidade de que em algum momento, tenha havido

descamação de células infectadas pelo vírus e que estas mulheres deverão ficar dentro de uma programação de vigilância citológica.

Os resultados da histologia dos fragmentos de biopsia mostraram a distribuição das lesões por idade dentro do esperado, concordando com a maioria dos estudos (SILVA et al, 2006; MONSONEGO, 2010), ressaltando a prevalência de câncer invasor abaixo dos 50 anos, semelhante a encontrada em estudo realizado no Rio Grande do Norte (FERNANDES et al, 2010).

O alto índice de testes HPV positivos (81.4%) encontrado concorda com os dados esperados em clínica de colposcopia para onde foram encaminhadas mulheres com citologia prévia anormal. Amplo estudo de meta-análise conduzido por Smith e colaboradores(2007) refere positividade para HPV em 84.9% de mulheres com lesão de alto grau Estudo de caso-controle, realizado no mesmo local da presente pesquisa, demonstrou 82.1% de positividade no grupo com NIC (SILVA et al., 2006).

A alta positividade alcançada pode ser consequência da técnica de PCR utilizada para os testes. A *Polimerase Chain Reaction* – PCR, utilizando *primers* consenso MY9/MY11 que visam a região codificante L1 do vírus pode franquear mais tipos virais. seguida pela PCR com *primers* específicos, que visam à região de E6/E7, que apresenta forte identidade de sequência entre os HPV de alto risco, não sendo deletada em caso de integração do genoma viral (MONSONEGO, 2010).

Foram observados testes negativos em 4 dos 12 casos de carcinoma epidermóide invasor (33.3%). É possível que nestes casos tenha ocorrido a presença de outro tipo de HPV não pesquisado no estudo e que a negatividade encontrada nos testes com os *primers* degenerados MY9/MY11 tenha sido consequente a integração ao genoma celular, estando a região codificante L1 indisponível para o anelamento dos *primers*.

Em relação à técnica empregada na coleta das amostras para a detecção do HPV e genotipagem, utilizando a mesma escova usada para o esfregaço citológico, que seria descartada após confecção da lâmina, mostrou-se satisfatória, uma vez que das 104 coletas apenas 7 (6.7%) não apresentaram quantidade de DNA suficiente para PCR. Na maioria dos países onde é realizado o teste de HPV associado com a citologia se utiliza a citologia em

meio líquido, supondo preservar melhor o material coletado. Este procedimento, no entanto, reflete em aumento do custo financeiro, dificultando sobremaneira sua adoção, principalmente em países em desenvolvimento.

Conforme a maioria dos estudos realizados em todo o mundo até o momento, os HPV-AR mais frequentes, relacionados com câncer do colo, são os tipos 16,18, 45, 31 e 33 (IARC, 2005; BOSCH, 2008). Ressaltando-se que HPV-16 como o tipo mais prevalente nas em todas as regiões geográficas exceto na Indonésia onde o HPV-18 ocupa a primeira posição (SILVA et al, 2006).

No Brasil, o HPV-16 também é o mais predominante em todas as regiões. Em relação aos outros tipos como o HPV-18, HPV-31 e HPV-33, observam-se variações regionais. O HPV-18 é o segundo tipo mais prevalente na maioria das regiões exceto no Centro-Oeste e no Nordeste. No Centro- Oeste o HPV-33 ocupa a segunda posição entre mulheres adultas (RIBEIRO et al, 2011). Figueiredo Alves e colaboradores, em estudo realizado na cidade de Goiânia em 2013, com adolescentes, mostrou o HPV-51 como segundo tipo.

No Nordeste, mais precisamente no estado de Pernambuco, estudos têm mostrado o HPV-31 como o segundo em prevalência (LORENZATO et al, 2000; SILVA et al, 2006; BALDEZ da SILVA, 2009). Por outro lado, pesquisa desenvolvida no estado do Rio Grande do Norte, indica que o HPV-18 é o segundo lugar (FERNANDES et al, 2010). Desta forma, o presente estudo corrobora com os achados, mostrando a prevalência dos tipos de HPV-AR na seguinte ordem decrescente: HPV-16, HPV-31, HPV-58, HPV-18 e HPV-33.

Ao relacionar os genótipos pesquisados aos graus de severidade da lesão, foi observado que o HPV-16 foi o mais prevalente (65.6%) nas lesões de alto grau, quando associado aos resultados da citologia bem como, quando relacionado aos resultados histológicos de NIC 3 (73.7%) e de câncer invasor (64.3%). Esses achados concordam com outro estudo realizado em clínica de colposcopia, na cidade de Atlanta - Estados Unidos, cujos dados revelam HPV-16 em 59.0% de NIC 3+ (GARGANO et al, 2011) e com pesquisa desenvolvida na Costa Rica, que encontrou 80.0% de NIC 3+ associada ao HPV-16 entre mulheres de 18 a 26 anos (PORRAS et al., 2009).

Neste estudo, o segundo tipo mais prevalente foi o HPV-31 que apresentou prevalência igual ao HPV-16 para lesões de baixo e alto graus.

Na análise da presença de um único genótipo ou mais de um, encontrou-se maior prevalência das infecções múltiplas representando um total de 52.0%. As infecções únicas, discretamente menos frequentes, aparecem em 48.0%.

O HPV-16 foi mais prevalente em infecção única (63.2%), considerando todas as amostras positivas. Por outro lado, quando analisado em relação ao grau histológico da lesão, houve maior frequência de infecção múltipla em NIC 3 (42.10%) e em infecção única no carcinoma invasor (37.7%). Estes resultados são semelhantes aos de Silva e colaboradores (2006), que em estudo de caso-controle encontraram o HPV-16 em 46.9% das amostras do grupo com lesão.

O segundo genótipo mais encontrado em relação ao total de testes positivos, o HPV-31, mostrou maior prevalência em infecção múltipla: 46.2% em NIC 1; 36.8% em NIC 3 e 37.7 % no câncer invasor.

A baixa prevalência do HPV-31 como único genótipo em achados histológicos benignos (6.3%) e em NIC 1 (15.4%), ausente em infecção única em NIC 2, NIC 3 e câncer invasor, sugere que sua importância maior está na associação com outros genótipos, particularmente com o HPV-16.

Ao considerar a combinação HPV-16/31 presente em 48.8% das infectadas, há concordância ou semelhança ao estudo de Baldez da Silva e colaboradores (2009), desenvolvido na cidade do Recife. Os achados em ambos os estudos revelaram que a severidade da lesão aumenta quando existe associação do primeiro mais prevalente, o HPV-16, com o segundo mais prevalente o HPV-31.

Na análise dos fatores de risco, o número de parceiros sexuais, apesar de não ter mostrado associação estatisticamente significativa, demonstra forte tendência com a infecção pelo HPV. Fato que vai ao encontro da maioria dos estudos referentes a este tema (FIGUEIREDO ALVES, 2013).

O tabagismo não foi significativo nesta pesquisa, diferente de outros estudos brasileiros (NAUD et al., 2006; CAMPANER et al, 2007). Provavelmente, o reduzido número de fumantes entre as participantes (14.4%) poderá ser o motivo desta não associação.

Quando analisados os fatores de risco mais relevantes para a aquisição e persistência da infecção como idade, coitarca, número de parceiros, número de gestações, uso de anticoncepcional hormonal e tabagismo, acrescentado o tempo de atividade sexual, relacionando com cada tipo de HPV, a idade, o tempo de atividade sexual e o número de gestações foram significativos para quase todos os tipos de HPV, exceto para o HPV-33. A idade foi um dos fatores de risco destacado no estudo de Gargano e colaboradores (2011) realizado em mulheres referenciadas para a colposcopia.

CONCLUSÕES

A prevalência dos genótipos de HPV de alto risco oncogênico pesquisados mostrou a seguinte ordem decrescente: HPV-16, HPV-32, HPV-58, HPV-18 e HPV-33.

O HPV-16 foi o tipo mais prevalente, estando particularmente envolvido com NIC 3 e câncer invasor em infecção única ou múltipla. O HPV-31 foi o segundo em prevalência, estando em percentuais importantes associado ao HPV-16 em NIC 3 e câncer invasor.

O quarto lugar em incidência foi do HPV-18, não sendo encontrado em nenhum caso de infecção única.

Os cofatores relacionados a lesões cervicais podem estar envolvidos com a aquisição e a persistência da infecção em riscos diferenciados para os diversos tipos oncogênicos de HPV.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo realizado em clínica de colposcopia mostrou a presença de tipos de HPV oncogênicos em mulheres com lesões intraepiteliais de baixo e alto grau e câncer invasor que em sua grande maioria estavam em idade abaixo de 40 anos sinalizando para a necessidade de serem mantidos e implementados os programas de prevenção secundária com citologia, colposcopia e histologia, se possível associado ao teste de HPV ajustado os tipos mais prevalentes na região, mesmo após a adoção da vacina quadrivalente proposta para o Brasil em 2014.

Apesar dos avanços das pesquisas, ainda é difícil para o clínico, diante de uma mulher com lesão cervical, prever a evolução da doença para graus mais avançados. Há necessidade da introdução na prática médica de marcadores de prognóstico suplementares. Desta forma, propomos a complementação do estudo através da utilização de técnicas de Imunohistoquímica nos blocos de parafina das biópsias, para detecção de biomarcadores como a expressão das proteínas virais E6 e E7 e da proteína p16INK4, indicadora de desregulação do ciclo celular, sinalizando alterações que poderão proporcionar melhoras no manejo das mulheres portadoras de lesões cervicais precursoras de câncer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BALDEZ da SILVA et al. HPV 31 and HPV 33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research* .V.8, p. 1437-1443, 2009.
- BIGRAS et al. Interobserver concordance in the assessment of features used for the diagnosis of cervical atypical squamous cells and squamous intraepithelial lesions (ASC-US, ASC-H, LSIL and HSIL). *Cytopathology*, V.24 (1), p. 44-51, 2013.
- BORNSTEIN, J. et al. Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstetrics & Gynecology*, v. 120, p. 166–172, 2011.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v. 55, n. 4, p. 244-65, 2002.
- BOSCH, F. X. et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia, *Vaccine*. v. 265, p. k1– k16, 2008.
- BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, *The EMBO Journal*, v. 3, n. 5, p. 1151-1157, 1984.
- BOUSARGHIN, L. et al. Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells Human Papillomavirus Types 16 , 31 and 58 *Journal of Virology*, v. 77, p. 3846-3850, 2003.
- BRAGANÇA, J. F. Comportamento sexual e idade como fatores de risco para lesões intra-epiteliais e invasoras do colo do útero. *Rev Ciênc Med Campinas*, v. 13, n. 1, p. 13–21, 2004.
- BRASILEIRO FILHO, G. Distúrbios do crescimento e diferenciação celulares. In: _____ (Ed) *Bogliolo Patologia Geral*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p 226-281.
- CAMPANER, A. B. et al. Importância do tabagismo na carcinogênese do colo uterino. *Femina*, v. 35, n 11, p. 713-717, 2007.
- CARVALHO, M. G. D.. Valor preditivo da avaliação do DNA e da expressão dos genes E6/E7 do Papilomavírus humano na evolução da neoplasia intraepitelial cervical de grau 2. *Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas*, 2010.
- DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses, *Virology*, v. 324, n. 1, p.17-27, 2004.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, v. 32 n 1, p. S7-15, 2005.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, v. 110, n. 5, p. 525-41, 2006.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses, *Vaccine*, v. 30 n. 5, p. F55–70, 2012.

DUARTE-FRANCO, E.; FRANCO, E. L. Cancer of the Uterine Cervix. *BMC women's health*, v. 4, n.1, p. S13, 2004.

DÜRST, M. et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 80, n. 12, p. 3812-5, 1983.

FERNANDES, J. V. et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. *BMC research notes*, v. 3, n. 1, p. 96, 2010.

FIGUEIREDO ALVES et al. Prevalence ,genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in immunized female adolescents in Goiania ,Brazil: community-based study. *BMC Public Health*, n.13, p.1041,2013.

FRANCO, E. L. et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 180, n. 5, p. 1415-23, 1999.

GARCÍA-ESPINOSA, B. et al. Genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. *Diagnostic Pathology*, v. 4, p. 31, 2009.

GARGANO et al. Age-Group Differences in Human Papillomavirus Types and Cofactors for Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 among Women Referred to Colposcopy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ,V.21,p.111-121,2011.

GUSTAFSSON et al. International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control*, V. 8, p.755-763, 1997

HERFS, M. et al. A discrete population of squamous columnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 26, p. 10516–21, 2012.

IARC. International Agency for Research on Cancer, Human Papillomaviruses, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon. v.90, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil) Coordenação de Prevenção e Vigilância (2006). Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas: Recomendações para profissionais de saúde. 2 ed –Rio de Janeiro: INCA 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil) Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2013 disponível em http://www2.inca.gov.br/estimativa_cancer_2014

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil) site /home/notícias 2013 ministério da saúde anuncia vacina contra hpv calendario nacional, disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2014/vacina_hpv_10_marco

JEON, S. ; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1995, v. 92, n. February, p. 1654-1658, 1995.

KLAES, R. ; FRIEDRICH, T. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uterine. *Journal of Cancer*, v. 284, n. July 2000, p. 276-284, 2001.

LORENZATO, F. et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 10, n. 2, p. 143-150, 2000

MEISEL, A.; FORTIN, R. ; ROY, M. Condylomatous lesion of the cervix and vagina. I. Cytological patterns. *Acta Cytol*, p. 505-509, 1976.

MONSONEGO, J. et al. Cervical cancer control, priorities and new directions.. *Journal International du Cancer*, v. 108, n. 3, p. 329-33, 2004.

MONSONEGO J. *Infections à papillomavirus, état des connaissances, pratiques et prevention vaccinale*. Paris ,Springer, 2006

MONSONEGO, J. Epidemiologia e história natural. In _____ *Infecções e Doenças Genitais causadas pelo HPV: Diagnóstico e Tratamento*, Rio de Janeiro: Revinter, 2010. p11-30

MOUGIN, C.; NICOLIER, M. ; DECRION-BARTHOD, A.-Z. HPV et cancers : mécanismes de l'oncogenèse. *Revue Francophone des Laboratoires*, v. 2008, n. 405, p. 35-42, 2008.

MÜNGER, K. et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*, v. 63, n. 10, p. 4417-21, 1989.

MÜNGER, K. et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology*, v. 78, n. 21, p. 11451-11460, 2004.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 6, p. 518-27, 2003.

MUÑOZ, N. et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *The Journal of infectious diseases*, v. 190, n. 12, p. 2077–87, 2004.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, v. 24 n.3, p. S3/1–10, 2006

NAUD, P. et al. Factors predicting intermediate endpoints of cervical cancer and exposure to human papillomavirus (HPV) infections in young women screened as potential targets for prophylactic HPV vaccination in south of Brazil. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, v. 124, n. 1, p. 110–118, 2006.

NOBBENHUIS et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. *Lancet*, v.354,p.20-25,1999.

OSTÖR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International Journal of Gynecological Pathology*, v 12, n 2, p.186-192 , 1993

PARKIN,DM; BRAY,F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, v.24, p. 11-25, 2006.

PORRAS et al. Human Papillomavirus Types Age in Cervical Cancer Precursors: Predominance of Human Papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* n.18,p.863-865,2009

PRÊTET , J. L. Biologia: O essencial para o clínico. In: MONSONEGO. *Infecções e Doenças Genitais causadas por HPV: Diagnóstico e Tratamento*, Rio de Janeiro: Revinter, 2010. p 3-9.

RIBEIRO, A. Association Between HPV Types and Species Groups and Cervical Neoplasia From a High-risk Area for Cervical Cancer, Goiânia, Brazil. *International Journal of Gynecological Pathology*, v. 30, n. 3, p. 288-294, 2011.

RICHART ,R.M. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology annual*, v.8, p.301-3028,1973.

RODRÍGUEZ, A. C. et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 102, n. 5, p. 315-24, 2010.

ROUSSEAU, M.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L. A Cumulative Case-Control Study of Risk Factor Profiles for Oncogenic and Nononcogenic Cervical Human Papillomavirus Infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 9, p. 469–476, 2000.

SCHIFFMAN, M. ; KJAER, S. K. Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. *JNCI Monographs*, v. 20852, n. 31,p.14-19, 2003.

SCHLECHT, N. ; KULAGA, S. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, v. 286, n. 24, p. 3106-3114, 2001.

SILVA, T. T. et al.. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* , v. 28, n. 81, p. 285-291, 2006.

SILVA, A.M.T.C.; AMARAL, M.V.T.; CRUZ, A.D. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotecnol Ciênc Desenvol*, v.29, p.48-54. 2003

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer*, v. 121, n. 3, p. 621–32, 2007.

STANLEY M; LOWY D; FRASER I. Prophylatic Vaccines:Underlying mechanisms. *Vaccine*, v.106, s. 3,p.113,2006.

STANLEY M; LOWY D; FRASER I.Immunobiology of Human Papillomavirus Infections and Vaccination Implications for Second Generation Vaccines.*Vaccine*,v.26, s.10, 2008.

TERMINI, L.; VILLA, L. L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 20, n. 2, p. 125-131, 2008.

TOTA et al. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Me.*, V.53,p.12-21,2011.

VILLA LL.et al.,Prophylatic quadrivalente human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentric phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*. n 6,p271-278,2005.

WALBOOMERS, J.M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, v. 189, p.9 – 12, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION,Internacional Agency for Research on Cancer.Globocan. 2008. Lyon, 2008. Disponível em :<http://gledm.obocan.iarc.fr>. Acesso em 11 abril 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews. Cancer*, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infection: a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. v 1288,1996.

APÊNDICES

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa - CEP/CCS/UFPE, em: 18/12/20132. CAEE nº 09307612.8.0000.5208

Você que veio a este ambulatório para fazer os exames de prevenção do câncer do colo do útero, **está sendo convidada a participar voluntariamente de uma pesquisa** para uma dissertação de mestrado em Patologia desta Universidade, com o título: “EXPRESSÃO DAS ONCOPROTEÍNAS VIRAIS E6 e E7 e DE p 16, EM PORTADORAS DE NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS E INVASORAS DO COLO DO ÚTERO”, isto significa dizer que nós queremos ver como este tipo de proteína pode aparecer em mulheres portadoras de doenças no colo de útero. Este estudo é de responsabilidade e está sendo desenvolvido pela pesquisadora: **Mariléa de Lima Guimarães – CRM 4762-PE. Ambulatório de Patologia Cervical e Colposcopia do Hospital das Clínicas da UFPE, Avenida Professor de Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária. Recife-PE CEP: 50.670-420. Fone: (81) 2126-3512. Celular (ligações a cobrar) (81) 9113-1398. e-mail: marileaguimaraes@hotmail.com.**

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

OBJETIVOS: Detectar a presença e verificar os tipos de Papilomavírus Humano, conhecido por você como vírus HPV, no material coletado do colo do útero e avaliar a expressão da atividade destes vírus chamados HPV.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Você fará seu exame ginecológico de prevenção (o preventivo que toda mulher faz por solicitação do seu médico ginecologista) que consiste em tirar material para analisar na lâmina (citologia oncológica), examinar o colo do útero através de uma lente de aumento (colposcopia) e, se necessário, será tirado um pedacinho de uma camada externa do útero para examinar no laboratório (biópsia). Durante este exame, a médica vai coletar o seu material em duas lâminas, sendo uma para a citologia de rotina e outra para saber se você tem o vírus HPV. Além disso, você será encaminhada para o laboratório onde fará coleta de sangue para o teste de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

RISCOS E DESCONFORTOS: Pequenos riscos e desconfortos não podem ser evitados no exame de prevenção, assim, você poderá sentir discreto ardor pelo uso de ácido acético a 3% e iodo na colposcopia. Na ocasião da biópsia poderá haver sensação de cólica menstrual que rapidamente desaparece. Além disto, poderá haver algum desconforto emocional por ser solicitado um teste de AIDS, o que também faz parte do cuidado as pacientes com problemas no colo do útero.

BENEFÍCIOS: Se for encontrada a presença desse vírus do HPV, você terá seu tratamento e acompanhamento mais direcionado ao tipo de vírus encontrado.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Os resultados dos seus exames serão mantidos em segredo, não sendo revelados a ninguém. Como este é um estudo de pesquisa, os dados obtidos poderão ser publicados ou divulgados, mas de forma alguma será revelada a sua identidade. Todos os dados referentes a presente pesquisa serão armazenados no ambulatório de Colposcopia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, em arquivo próprio, com acesso restrito, sob responsabilidade da pesquisadora, durante o período de cinco anos.

Mariléa de Lima Guimarães – CRM 4762

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF/ _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo como voluntária. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Assinatura do participante

Local e Data

Presenciei a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do sujeito em participar.

Nome

Assinatura

Nome

Assinatura

APÊNDICE B**PROTOCOLO DE COLETA****Identificação**

Caso nº _____ Prontuário: _____
 Nome: _____ Idade: _____ anos
 Tabagismo: () não () sim
 () leve ≤ 10 cigarros / dia () moderado = 10 e 20 cigarros / dia
 () intenso ≥ 20 cigarros/ dia () não se aplica
 Anticoncepcional hormonal: () não () sim

Antecedentes ginecológicos

Idade da menarca: _____ anos Idade da coitarca: _____ anos
 Número de gestações: _____ número de partos: _____
 Número de parceiros: 1 _____ 2 _____ 3 ou mais _____

Exame colposcópico

Achados anormais grau 1: () não () sim
 Achados anormais grau 2: () não () sim
 Suspeita de invasão: () não () sim

**Exame citológico**

Citologia que motivou o encaminhamento: _____ nº _____
 Citologia do dia da colposcopia: _____ nº _____

Exame histopatológico

Diagnóstico: _____ nº da lâmina: _____

Genotipagem do HPV

Tipo viral: _____ nº no lab: _____

ANEXOS

ANEXO A**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 e de p16 em portadoras de neoplasias intraepiteliais e invasora do colo do útero

Pesquisador: Marilea de Lima Guimarães

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09307612.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 177.196

Data da Relatoria: 21/12/2012

Apresentação do Projeto:

Indicado no parecer inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado no parecer inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado no parecer inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado no parecer inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado no parecer inicial.

Recomendações:

Anexar ao projeto o documento comprobatório do CNPq, confirmando a informação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 18 de Dezembro de 2012

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)