



**SOFIA MARLENE
MOREIRA SILVA DE
GOUVEIA**

**DETECÇÃO DE DNA DE HPV ONCOGÉNICO POR
CAPTURA HÍBRIDA EM CITOLOGIAS NORMAIS**



**SOFIA MARLENE
MOREIRA SILVA DE
GOUVEIA**

**DETECÇÃO DE DNA DE HPV ONCOGÉNICO POR
CAPTURA HÍBRIDA EM CITOLOGIAS NORMAIS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof.^a Doutora Maria de Lurdes Pereira

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente

Prof.^a Doutora Maria de São José Garcia Alexandre Nascimento da Fonseca

Professora Catedrática da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientadora

Prof.^a Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Carlos, meu marido e “melhor técnico do mundo!”, pela ajuda profissional, pela imensa paciência, pelo amor, pelo apoio absoluto e pelos momentos que deixamos de passar juntos mas que certamente serão compensados no futuro.

À Professora Doutora Adelaide, pela simpatia, interesse, críticas construtivas e constante disponibilidade.

Ao Doutor Macedo Dias, pela inteira disponibilização dos recursos do seu laboratório, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos meus pais, por se esforçarem para que eu tivesse a melhor educação possível e por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos.

À minha maninha linda, pelo seu imenso apoio.

À D. Fátima e ao Sr. Gouveia, por me tratarem belissimamente e por estarem incansavelmente disponíveis para tudo.

Às minhas amigas, por acreditarem nas minhas capacidades e pela sua amizade.

A todos, o meu muito obrigada!

palavras-chave

Vírus do Papiloma Humano, cancro do colo do útero, captura híbrida

resumo

O cancro do colo do útero tem uma incidência mundial de cerca de meio milhão de casos por ano. A infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é a principal causa do cancro do colo do útero e das neoplasias cervicais intraepiteliais (CIN) em todo o mundo. Consequentemente, é de todo o interesse efectuar o teste de HPV para rastrear o cancro do colo do útero. Foi recentemente desenvolvida a segunda geração de captura híbrida (HC2) que é um ensaio não radioactivo, relativamente rápido, com alta especificidade e sensibilidade, permitindo a detecção de 18 tipos de HPV, de alto e baixo risco oncogénico. Através de HC2 de alto risco oncogénico, avaliámos 3.262 mulheres com resultado de citologia líquida negativo para lesão intraepitelial e neoplasia maligna (NILM), segundo o Sistema de *Bethesda*. Destes, 2.192 casos (67,2%) não apresentavam alterações citológicas, 759 (23,3%) apresentavam alterações reactivas devido a processos inflamatórios inespecíficos e 311 (9,5%) apresentavam infecções por microrganismos. Do número total de casos estudados, 479 (14,7%) foram positivos para HPV de alto risco. Devido ao alto custo da captura híbrida de DNA de HPV, a sua utilização para rastreio de cancro do colo do útero não é acessível em países em vias de desenvolvimento. É, contudo, um instrumento útil quando combinado com a citologia, diagnosticando infecção de alto risco em células aparentemente normais. A utilização desta técnica pode ajudar a diminuir a incidência de cancro do colo do útero.

keywords

Human papillomavirus, cervical cancer, hybrid capture

abstract

Cervical cancer has a worldwide incidence of about half a million cases per year. The infection by human papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) worldwide. Consequently, it's useful to do HPV testing to screen for cervical cancer. It was recently developed the second generation of hybrid capture test (HC2) which is non-radioactive, relatively rapid, with high sensitivity and specificity, allowing the detection of 18 HPV high and low oncogenic types. Through HC2, of high oncogenic risk, we evaluated 3.262 women with cytology result of negative for intraepithelial lesion and malignancy (NILM), according to the Bethesda System. Of these, 2.192 cases (67,2%) hadn't any cytological changes, 759 (23,3%) had reactive changes due to nonspecific inflammatory processes and 311 (9,5%) were infected by microrganisms. Of the total number of studied cases, 479 (14,7%) where positive for the high-risk HPV. Due to the high cost of the hybrid capture, its use for cervical screening is not available in developing countries. However, it is an useful appliance when combined with cytology, diagnosing high-risk infections in apparently normal cells. The use of this technique could help reduce the incidence of cervical cancer.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
<hr/>	
1.1 CANCRO DO COLO DO ÚTERO	13
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL	13
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA EM PORTUGAL	16
1.2 INFECÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)	22
1.2.1 TIPOS DE HPV	24
1.2.2 EPIDEMIOLOGIA DO HPV	26
1.2.3 FACTORES DE RISCO	28
1.2.4 CARACTERIZAÇÃO DO HPV	32
1.2.5 MECANISMOS DE INFECÇÃO EPITELIAL E CARCINOGENÉSE	35
1.2.6 DIAGNÓSTICO	39
1.2.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO	42
1.2.8 PREVENÇÃO	44
1.2.9 TRATAMENTO	46
2. OBJECTIVOS	47
<hr/>	
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
<hr/>	
3.1 AMOSTRAS	53
3.2 TESTE DE DNA-HPV PELO MÉTODO DE CAPTURA HÍBRIDA	53
4. RESULTADOS	57
<hr/>	
5. DISCUSSÃO	65
<hr/>	
6. CONCLUSÃO	71
<hr/>	
BIBLIOGRAFIA	75
<hr/>	

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURA 1:	Taxa de incidência de cancro do colo do útero por 100.000 habitantes	13
FIGURA 2:	Incidência mundial de todos os cancros, em mulheres de todas as idades	15
FIGURA 3:	Incidência de todos os cancros, em países em vias de desenvolvimento, para todas as mulheres de todas as idades.....	15
FIGURA 4:	Incidência de todos os cancros, em países industrializados, para todas as mulheres de todas as idades	15
FIGURA 5:	Incidência do cancro do colo do útero em Portugal, comparativamente com outros cancros, em mulheres de todas as idades, por 100.000 mulheres	16
FIGURA 6:	Incidência do cancro do colo do útero no sul da Europa, em todas as idades, por 100.000 mulheres	17
FIGURA 7:	Incidência do cancro do colo do útero em Portugal, comparativamente com outros cancros, em mulheres dos 15 aos 44 anos de idade, por 100.000 mulheres	18
FIGURA 8:	Incidência de cancro do colo do útero em Portugal, sul da Europa e resto do mundo, por idade específica, por 100.000 mulheres	19
FIGURA 9:	Mortalidade por cancro do colo do útero, em Portugal, comparada com outros cancros, em todas as idades, por 100.000 mulheres	20
FIGURA 10:	Mortalidade por cancro do colo do útero no sul da Europa, em todas as idades, por 100.000 mulheres	21
FIGURA 11:	Percentagens estimadas de HPV presentes em diferentes locais anatómicos	24
FIGURA 12:	Prevalência de HPV 16 e 18 em mulheres com e sem cancro do colo do útero, por região mundial	27
FIGURA 13:	Modelo tridimensional do Vírus do Papiloma Humano	33
FIGURA 14:	Representação do genoma do HPV 16: Genes precoces (<i>E1, E2, E4, E5, E6 e E7</i>), genes tardios (<i>L1 e L2</i>) e região regulatória (LCR).	34
FIGURA 15:	Infecção pelo HPV e a sua replicação nas células epiteliais do colo do útero	36

FIGURA 16:	Acção das oncoproteínas E6 e E7 e relação com o ciclo celular. As proteínas E6 e E7 ligam-se às proteínas celulares <i>p53</i> e <i>pRb</i> respectivamente, alterando as suas funções e as vias de regulação do ciclo celular	38
FIGURA 17:	Procedimentos da captura híbrida que utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal	54
QUADRO 1:	Classificação dos tipos de HPV pelo seu tropismo e oncogenicidade.	25
QUADRO 2:	Relação entre os genes do Papiloma Vírus Humano e as suas funções	37
QUADRO 3:	Sistema de <i>Bethesda</i> actual	41
TABELA 1:	Taxa de mortalidade por idade específica em Portugal, sul da Europa e resto do mundo, por 100.000 mulheres	22
TABELA 2:	Associação entre o tipo de diagnóstico citológico associado ao NILM e casos de captura híbrida positivos	60
TABELA 3:	Percentagem de casos de captura híbrida positivos de acordo com o diagnóstico citológico	61
TABELA 4:	Percentagem de casos de captura híbrida negativos de acordo com o diagnóstico citológico	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ASC-H	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se podendo excluir HSIL
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CIN	Neoplasia Cervical Intraepitelial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HC2	Captura Híbrida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSIL	Lesões Intraepiteliais de Alto Grau
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre o Cancro
ICO	<i>Institut Català d'Oncologia</i>
KIR	<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
LCR	<i>Long Control Region</i> ou região regulatória
LSIL	Lesões Intraepiteliais de Baixo Grau
NILM	Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frames</i> ou fases abertas de leitura
p53	Proteína 53
pb	Pares de bases
PCR	Reacção de polimerização em cadeia
pRb	Proteína do retinoblastoma
RLU	Unidades de Luz Relativas
RNA	Ácido Ribonucleico
STM	<i>Specimen Transport Medium</i>
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> ou região regulatória
VIN	Neoplasia Intraepitelial Vulvar
VLP	<i>Virus like particles</i>

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CANCRO DO COLO DO ÚTERO

1.1.1 Epidemiologia Mundial

O cancro do colo do útero tem uma incidência de cerca de meio milhão de casos por ano [24,39,41,55], sendo uma das neoplasias malignas de maior incidência e mortalidade entre as mulheres de todo o mundo. Este cancro apresenta uma distribuição geográfica variável (Fig. 1) e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e vários autores [3,7,24,50,54,56], é a segunda causa de neoplasia maligna e de morte em mulheres no mundo inteiro (Fig. 2), sendo a sua incidência nos países em vias de desenvolvimento (América Latina, África, China e Índia) maior, ocupando o segundo lugar nestes países (Fig. 3) [7,50,54] e o sétimo lugar em países industrializados (Europa Ocidental e América do Norte) [37].

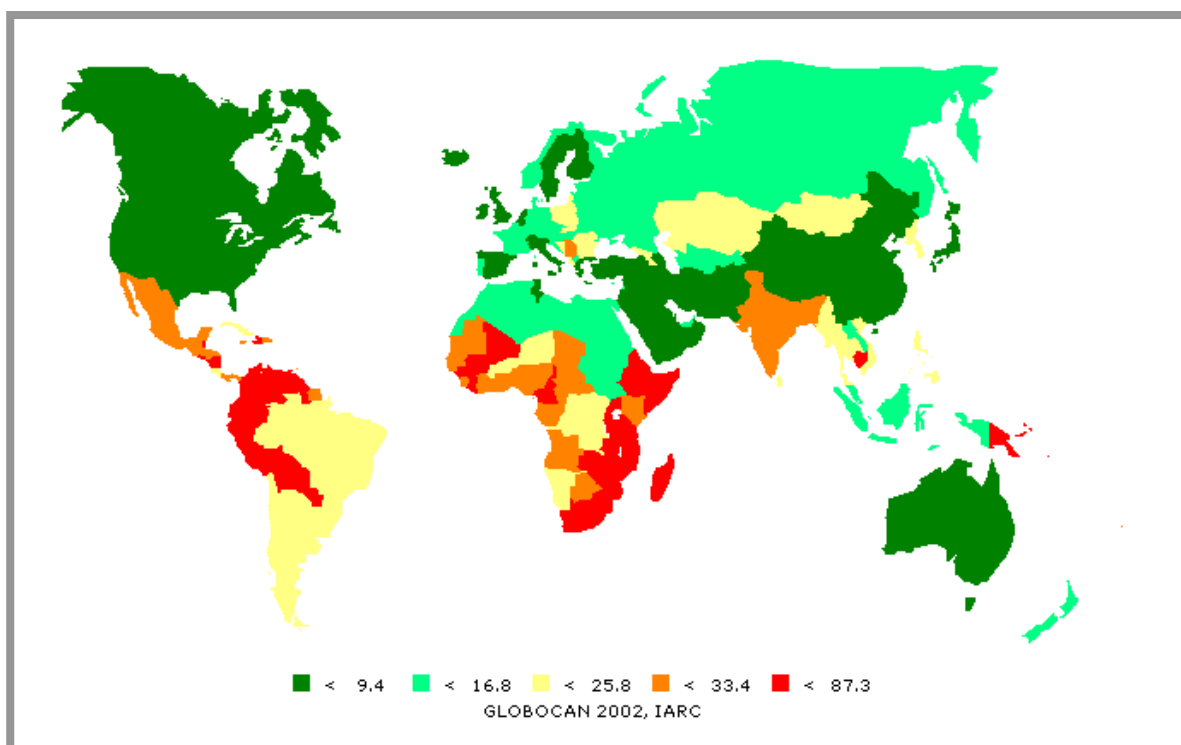


Figura 1: Taxa de incidência de cancro do colo do útero por 100.000 habitantes. (Adaptada de <http://www-dep.iarc.fr/> Acedida em 13/04/2009)

Em países industrializados, o uso exaustivo do esfregaço de Papanicolaou como método de rastreio para lesões precursoras do colo do útero tem resultado na redução da incidência do cancro do colo do útero [5,34,50]. Nos países em vias de desenvolvimento, os esfregaços de Papanicolaou foram implementados com maior limitação [51,54] pelo que a incidência do cancro do colo do útero é mais alta [7,24,39]. Estima-se que, quase um quinto de novos casos de cancro do colo do útero ocorram na Índia, onde a grande maioria dos casos são identificados numa fase avançada, num estadio da doença inoperável, sendo um grave problema de saúde pública nesse continente [3]. Curiosamente, entre os principais cancros humanos, o cancro do colo do útero é potencialmente o mais evitável [47], pois o colo do útero é facilmente acessível e existem estratégias comprovadas que permitem um bom diagnóstico e tratamento precoce [3]. A partir da base de dados “*Globocan*” e da Agência Internacional para Pesquisa sobre o Cancro (IARC) de 2002 presente no relatório “HPV e Cancro do Colo do Útero” da Organização Mundial de Saúde e do *Institut Català d’Oncologia* (ICO) de 2007 [59], a incidência mundial foi de 493.243 casos e ocorreram 273.505 óbitos por cancro do colo do útero [59], tendo 80% desses casos ocorrido em países em vias de desenvolvimento. Este dado leva-nos a depreender que uma prevalência tão elevada em países em vias de desenvolvimento se deve ao facto do acesso aos programas de rastreio ser limitado nesses mesmos países [7], factor que se combina com características de alto risco tais como pobreza, má nutrição [17,49,57] e alta paridade. Com base nos dados da *Globocan* e da IARC de 2002, podemos comparar a incidência mundial de todos os cancros, em mulheres de todas as idades, observando que o cancro do colo do útero fica atrás do cancro da mama, o qual é o mais mortal entre as mulheres (Fig. 2).

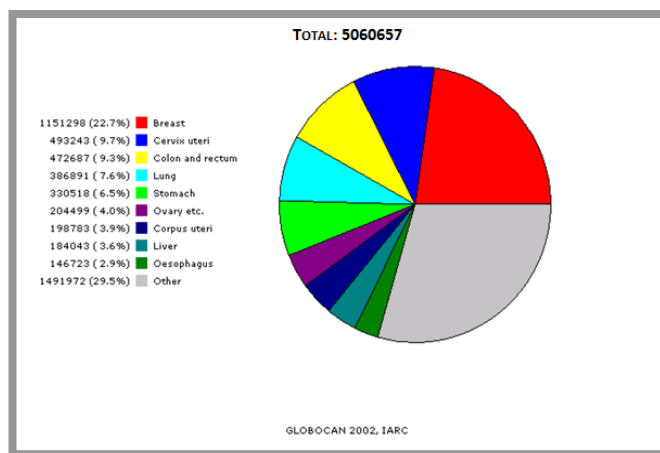
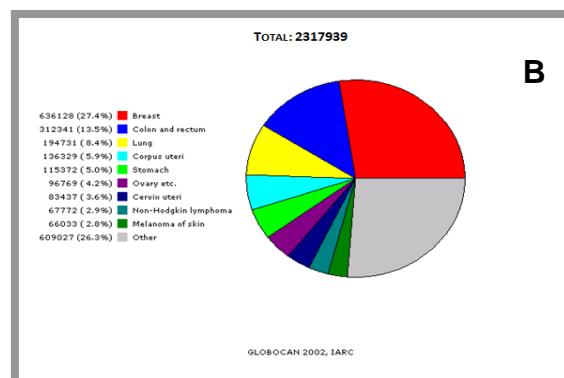
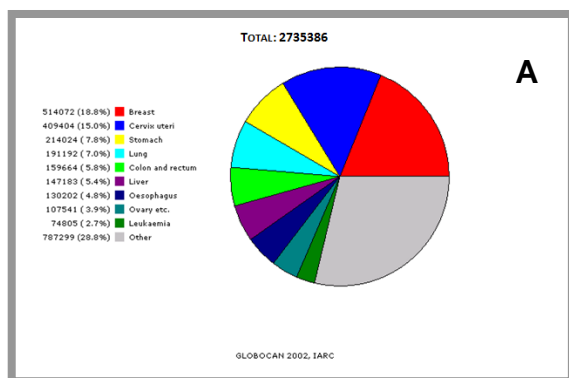


Figura 2: Incidência mundial de todos os cancros, em mulheres de todas as idades. (Adaptado de <http://www-dep.iarc.fr/> Acedida em 14/04/2009)



Figuras 3 e 4: Incidência de todos os cancros, em países em vias de desenvolvimento (A) e industrializados (B), para todas as mulheres de todas as idades. (Adaptados de <http://www-dep.iarc.fr/> Acedida em 14/04/2009)

1.1.2 Epidemiologia em Portugal

Segundo o relatório sobre “HPV e Cancro do Colo do Útero” da OMS e ICO de 2007 com dados provenientes da IARC e “Globocan” de 2002 [59], sobre Portugal, os dados existentes, por 100.000 mulheres, apontam para uma incidência de 956 casos, comparativamente com o sul da Europa, onde ocorreram 10.641 novos casos.

Comparativamente com outros cancros, em mulheres de todas as idades, em Portugal, o cancro do colo do útero é o quarto cancro com maior incidência [59] (Fig. 5). O cancro da mama é o mais frequente e mortal, ocupando o primeiro lugar.

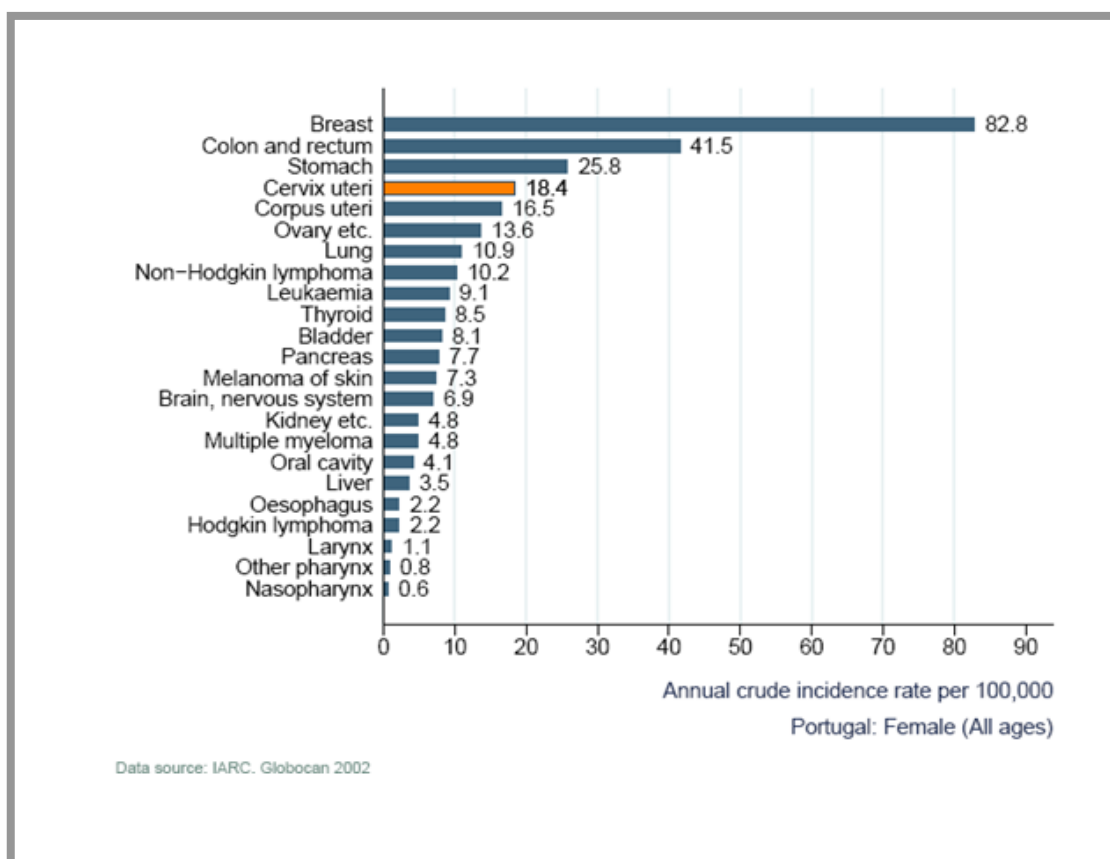


Figura 5: Incidência do cancro do colo do útero em Portugal, comparativamente com outros cancros, em mulheres de todas as idades, por 100.000 mulheres [59].

Comparando com países do sul da Europa, Portugal, é o sétimo país com maior incidência de cancro do colo do útero [59], ficando atrás de alguns países como Montenegro, Sérvia, Albânia, Bósnia e Herzegovina, Eslovénia e Macedónia (Fig. 6).

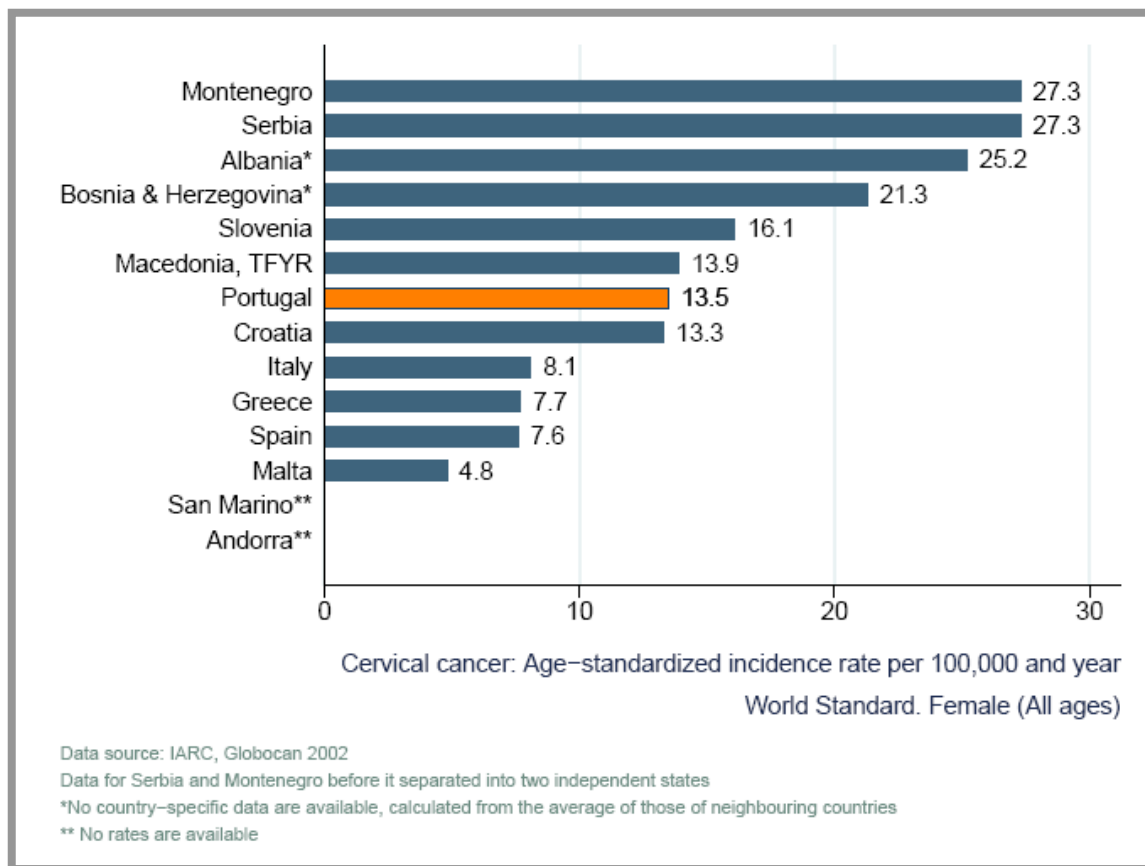


Figura 6: Incidência do cancro do colo do útero no sul da Europa, em todas as idades, por 100.000 mulheres [59].

Relativamente à incidência do cancro do colo do útero em mulheres entre os 15 e os 44 anos de idade, comparativamente com outros cancros, o cancro do colo do útero ocupa o segundo lugar em Portugal [59] (Fig. 7).

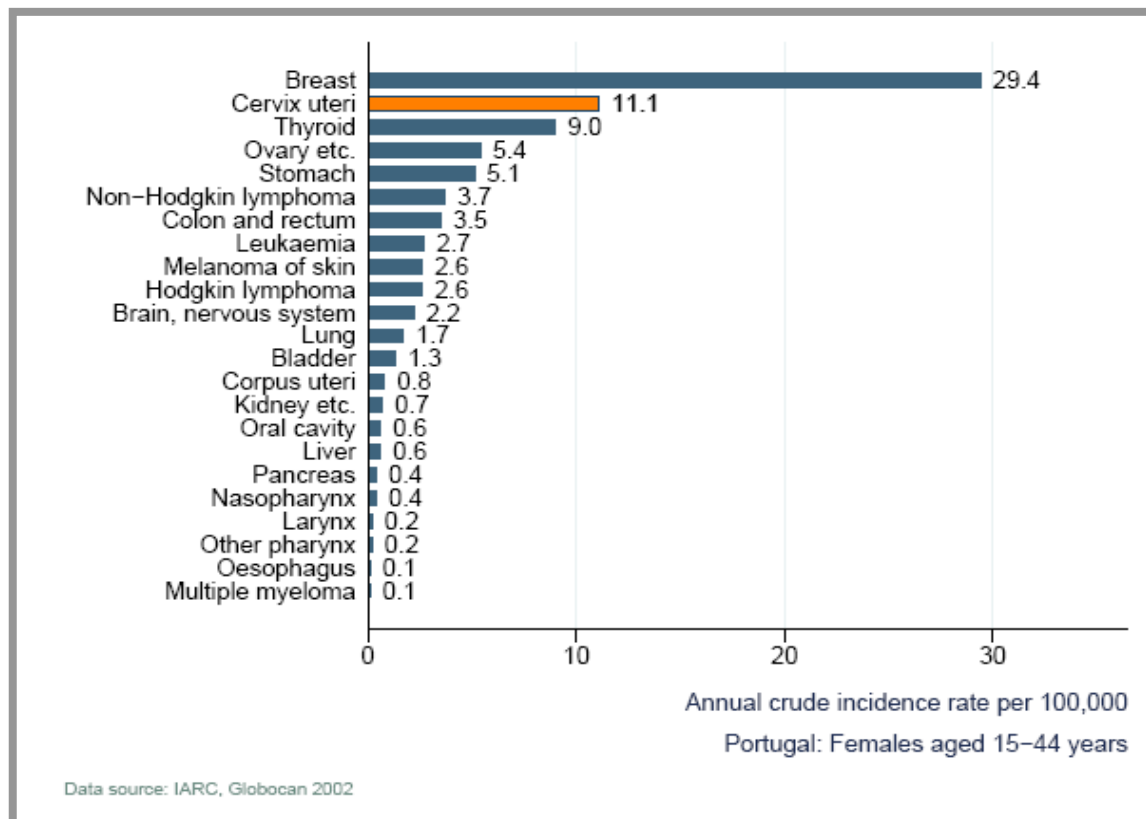


Figura 7: Incidência do cancro do colo do útero em Portugal, comparativamente com outros cancros, em mulheres dos 15 aos 44 anos de idade, por 100.000 mulheres [59].

Ao analisarmos a Figura 8, a qual compara a taxa de incidência de cancro do colo do útero em Portugal, sul da Europa e resto do mundo, por idade específica, verificámos que entre os 15 e os 44 anos de idade, Portugal, o sul da Europa e o resto do mundo têm uma taxa de 10% de novos casos. Esta taxa aumenta quando se considera a faixa etária entre os 45 e os 54 anos de idade: Portugal 38%, sul da Europa 22% e resto do mundo 46%. Quando se trata da faixa etária entre os 55 e os 64 anos, Portugal tem uma taxa de incidência de 31%, o sul da Europa de 22% e o resto do mundo de 50%. À medida que vamos progredindo na faixa etária mais de 65 anos, a incidência diminui, apresentando valores em Portugal de 29%, no sul da Europa 21% e 40% no resto do mundo [59]. A

elevada taxa de incidência entre os 45 e os 64 anos de idade pode indicar certas mudanças no comportamento sexual [37,55], que resultam em novas exposições ou reactivação de infecções pelo HPV latentes, adquiridas em idades mais jovens [37,43].

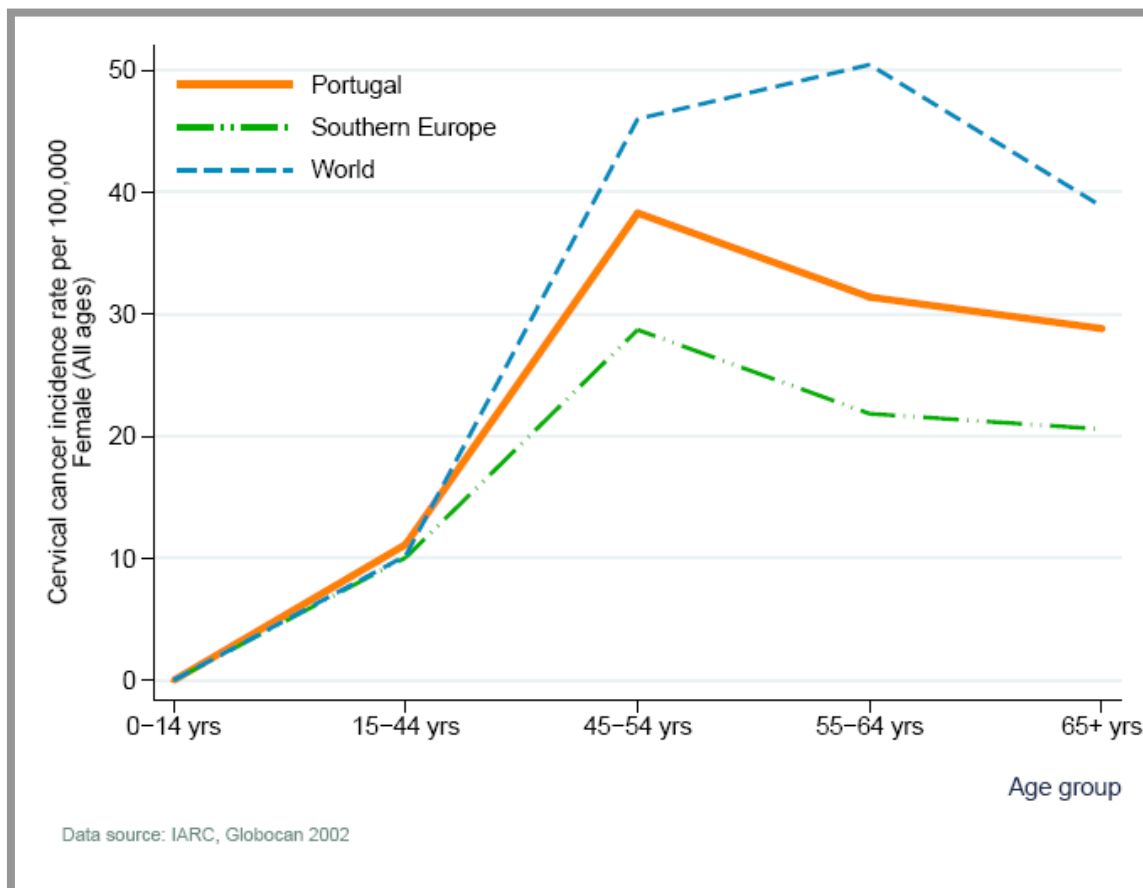


Figura 8: Incidência de cancro do colo do útero em Portugal, sul da Europa e resto do mundo, por idade específica, por 100.000 mulheres [59].

O relatório sobre HPV e Cancro do Colo do útero da WHO e do ICO de 2007 demonstra que, por 100.000 mulheres, em Portugal ocorreram 378 mortes. No sul da Europa ocorreram 4.131 e no resto do mundo esse número foi de 273.505 [59]. Analisando a Figura 9, que compara a mortalidade de casos de diferentes cancros em Portugal, por 100.000 mulheres, verificamos que o cancro do colo do útero é a sexta maior causa de mortes para mulheres de todas as idades [59].

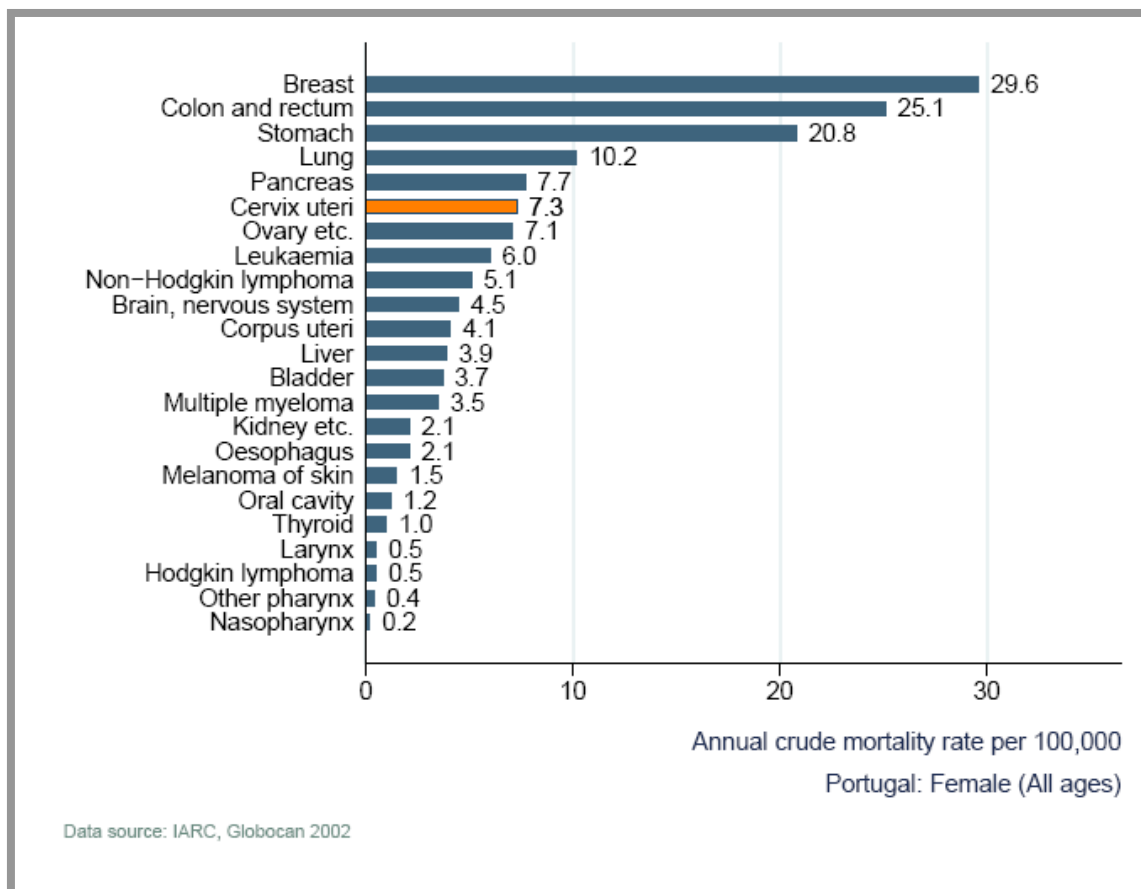


Figura 9: Mortalidade por cancro do colo do útero, em Portugal, comparada com outros cancros, em todas as idades, por 100.000 mulheres [59].

Analisando a taxa de mortalidade causada pelo cancro do colo do útero nos países do sul da Europa, verificamos que, num leque de 14 países, Portugal ocupa o oitavo lugar, com uma taxa de 4,5/100.000 mulheres [59] (Fig. 10).

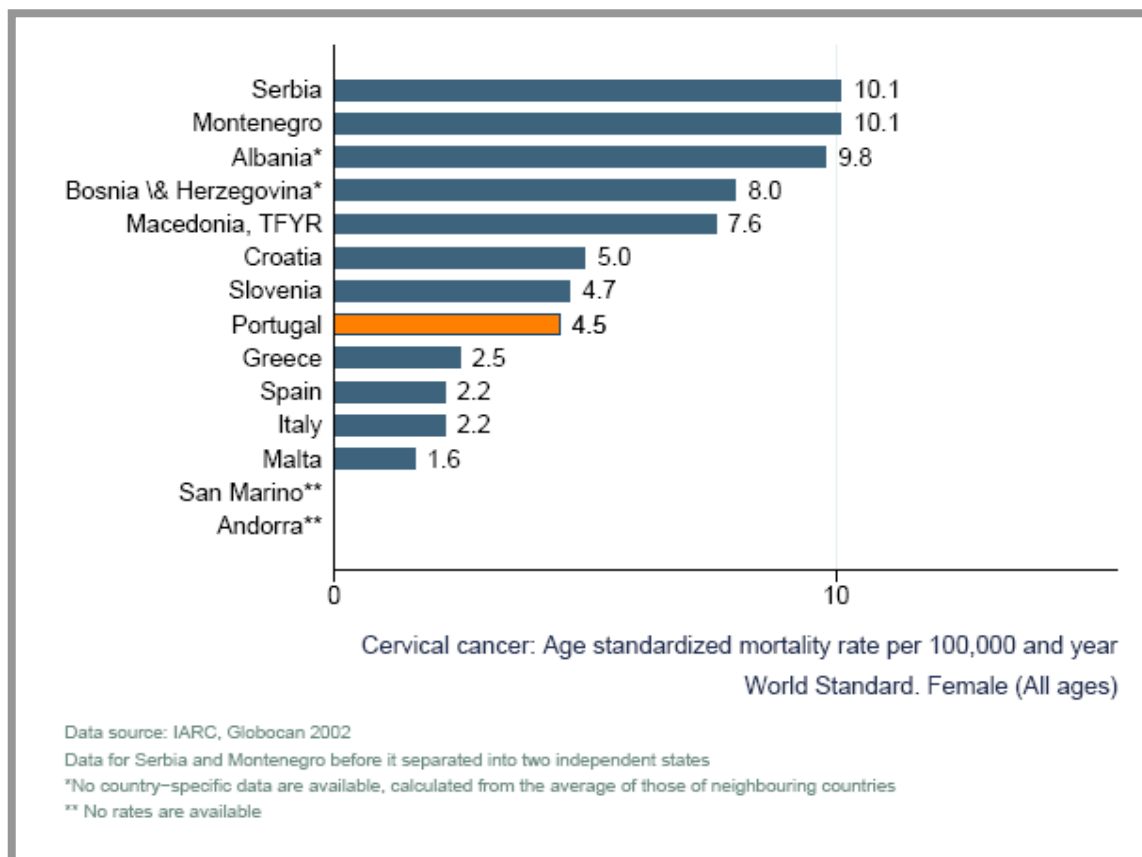


Figura 10: Mortalidade por cancro do colo do útero no sul da Europa, em todas as idades, por 100.000 mulheres [59].

Relativamente às taxas de mortalidade por idade específica em Portugal, sul da Europa e resto do mundo [59], em Portugal e no sul da Europa, a taxa é maior na faixa etária de mais de 65 anos (20% e 15% respectivamente), enquanto que no resto do mundo a taxa é maior dos 55 aos 64 anos de idade (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de mortalidade por idade específica em Portugal, sul da Europa e resto do mundo, por 100.000 mulheres [59].

	15 - 44 anos	45 - 54 anos	55 - 64 anos	+ 65 anos
Portugal	3%	10%	12%	20%
Sul Europa	2%	8%	9%	15%
Mundo	5%	23%	42%	31%

1.2 INFECCÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

Inúmeros estudos e pesquisas tiveram início em 1977, altura em que alguns autores observaram a relação entre a infecção pelo HPV e a carcinogénese genital, continuando até aos dias de hoje [43]. Quase todos os casos de cancro do colo do útero são atribuíveis ao HPV. A infecção pelo HPV aparece em diferentes locais tanto nos homens como nas mulheres [24].

O HPV e, mais concretamente, a infecção por certos tipos de HPV, é reconhecido por ser o agente etiológico do cancro do colo do útero e da Neoplasia Cervical Intraepitelial (CIN), sendo por isso um factor causal e necessário para o cancro do colo do útero [24,37,54]. O HPV é o vírus mais prevalente envolvido em doenças sexualmente transmissíveis em todo o mundo [24,50,52,54,57], sendo um importante desafio de saúde pública [52]. Apesar da maioria dos adultos sexualmente activos serem infectados com HPV pelo menos uma vez nas suas vidas [54], são as mulheres sexualmente activas com menos de 25 anos que constantemente têm as maiores taxas de infecção. Este facto pode indicar que a mucosa do colo do útero estaria mais susceptível a um possível agente em mulheres com idade jovem do que em mulheres mais velhas [39]. O HPV inicia o seu ciclo de infecção no momento em que penetra as camadas de tecido epitelial mais profundas, especialmente na junção escamo-colunar, a qual varia ao longo da idade consoante estímulos hormonais, estando mais susceptível a infecções por microrganismos em idades jovens. Nestas idades, a junção escamo-colunar é frequente situar-se fora do canal cervical, formando a ectopia [6]. O HPV também pode penetrar em regiões com micro lesões que podem ocorrer durante a actividade sexual.

O HPV é uma infecção muito comum, apesar da maior parte dos indivíduos infectados eliminar o vírus através do seu sistema imunitário [17,23,49,56], sem nunca desenvolver manifestações clínicas. Assim, são poucos os indivíduos infectados com o HPV a progredir para cancro do colo do útero invasor. Um factor bem estabelecido que explica parcialmente o risco diferencial de cancro do colo do útero é o tipo de HPV, sendo que mulheres com tipo de HPV de baixo risco oncogénico tem menos probabilidade de progredir para neoplasia, enquanto que mulheres com tipo de HPV de alto risco oncogénico são mais propensas a desenvolver cancro do colo do útero [3].

Habitualmente, a infecção por HPV aparece em jovens no início da actividade sexual [57], sendo um fenómeno transitório em cerca de 80% dos casos [17,23,49,54,56]. Ainda não está perfeitamente explicado o porquê das infecções pelo HPV se resolverem em certos casos e noutros progredirem para neoplasia intraepitelial. Pensa-se que a razão para o diferente comportamento pode ser explicado através dos factores de risco a que o cancro do colo do útero está associado [54]. Entretanto, um pequeno número de casos de infecções persiste, provavelmente por falha de mecanismos imunológicos, o que pode provocar alteração no epitélio do colo do útero e posterior transformação maligna [44]. O grupo de mulheres que apresenta infecção persistente por tipos de HPV de alto risco são consideradas o verdadeiro grupo de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero [44].

Dado que a maioria das infecções pelo HPV ocorre pouco após o início da actividade sexual e são transitórias, as mulheres com cerca de 30 anos que são HPV positivas incluem aquelas que são portadoras persistentes, bem como aquelas com novas infecções [17,31,44,57].

Existe forte evidência clínica e experimental de que o HPV tem papel central no desenvolvimento e crescimento do cancro do colo do útero. Contudo, é sabido que a carcinogénese é um processo de múltiplas etapas [46]. Alterações no equilíbrio citogenético ocorrem no momento da transformação do epitélio do colo do útero normal em cancro [46].

Numerosos estudos apoiam a hipótese de que a infecção por HPV está associada ao desenvolvimento de alterações malignas e pré-malignas do trato genital inferior. O HPV pode também estar associado a lesões anais, vaginais, vulvares, penianas, orofaríngeas, laríngeas e esofágicas, sendo o HPV responsável por 5,2% de todos os cancros no mundo inteiro. A Figura 11 mostra as percentagens estimadas de HPV presentes em cada um destes locais anatómicos [57].

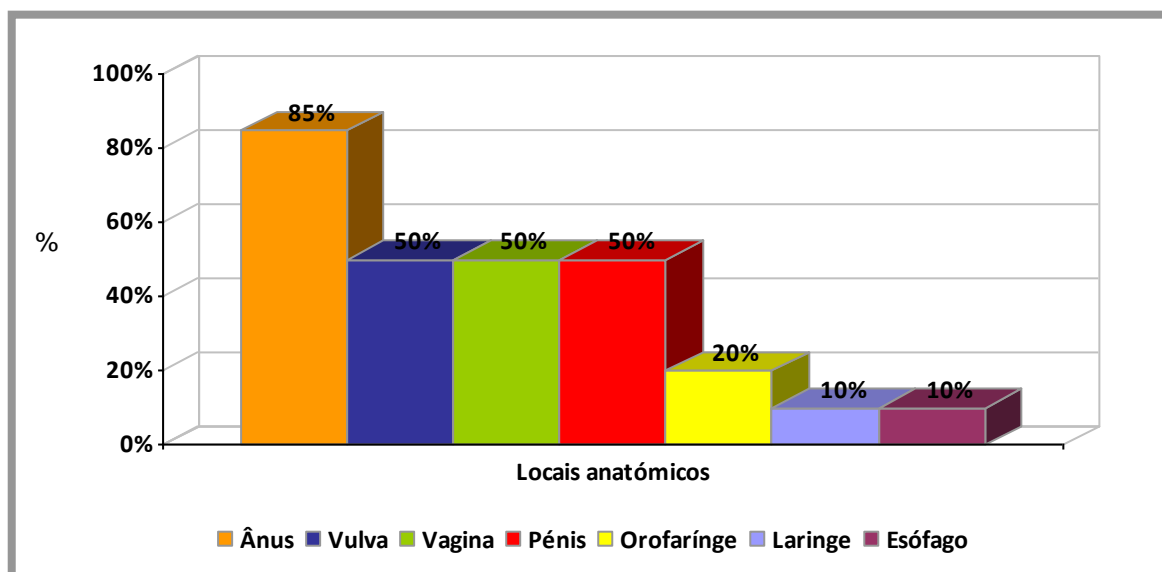


Figura 11: Percentagens estimadas de HPV presentes em diferentes locais anatómicos [57].

A relação entre o cancro do colo do útero e a infecção por HPV está bem documentada, sendo o ácido desoxirribonucleico (DNA) de HPV de alto risco detectado na maioria das amostras (92,9% a 99,7%) de cancro do colo do útero invasor [54]. O HPV ataca as células basais no epitélio escamoso estratificado e as células metaplásicas da junção escamo colunar do colo do útero. Além disso, o HPV pode infectar o epitélio glandular do endocolo, resultando em neoplasias glandulares, como o adenocarcinoma *in situ* (AIS) ou invasor.

1.2.1 Tipos de HPV

Os tipos de HPV podem ser classificados consoante o seu tropismo, ou seja, a afinidade para infectar diferentes zonas do corpo ou consoante o seu risco de causar neoplasia do colo do útero, tendo em conta o potencial oncogénico para o desenvolvimento de lesões pré neoplásicas ou neoplásicas [31] (Quadro 1).

Mais de 200 tipos diferentes de HPV foram caracterizados até ao momento [24], sendo 40 destes capazes de infectar as células do revestimento epitelial do tracto anogenital e outras áreas da mucosa [10,54,57].

Em 1995, a IARC classificou os tipos de HPV 16 e 18 como carcinogénicos para seres humanos e os tipos de HPV 31 e 33 como provavelmente carcinogénicos. Esta classificação foi feita com base nos dados publicados até 1994. Em 2005, a lista dos tipos de HPV carcinogénicos foi expandida pela IARC para incluir 13 tipos de HPV mucosos e anogenitais e dois outros tipos de HPV que infectam a pele (HPV 5 e 8). Além disso, os HPV 6 e 11 foram classificados como possivelmente carcinogénicos [10,49,57].

Quadro 1: Classificação dos tipos de HPV pelo seu tropismo e oncogenicidade [31].

Classificação	Categoria	Genótipo de HPV
Tropismo	Cutâneo trópicos	1 e 2
		5 e 8
	Mucoso trópicos	6, 11 e 42
		16, 18, 31 e 45
Risco Oncogénico	Baixo Risco	6, 11, 28, 42, 44, 54, 70 e 73
	Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68

Os tipos de HPV de baixo risco oncogénico (sendo os mais comuns o 6 e o 11), estão associados à maioria das lesões benignas que afectam a área anogenital, tais como condilomas e lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) [39,55], enquanto que os tipos de HPV de alto risco oncogénico (sendo os mais comuns o 16 e o 18), estão associados a neoplasias do colo do útero e lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL). Os tipos de HPV 16 e 18 estão presentes em cerca de 70% de todos os cancros do colo do útero [31,54]. O tipo 16 é o tipo mais oncogénico, seguido do tipo 18 [24].

Durante um período de 10 anos, infecções de HPV prevalentes e assintomáticas em mulheres foram seguidas, tendo-se verificado que as infecções por HPV 16 e 18

apresentavam maior probabilidade de progredir para lesões intraepiteliais de alto grau ou carcinoma invasor, com uma taxa mais rápida relativamente aos outros tipos de HPV [24].

Hoory e colaboradores [24] estudaram 20 tipos de HPV e concluíram que quatro tipos de HPV (16,18,31 e 45) causavam 80% dos cancros com HPV positivo. Por outro lado, tipos de HPV de baixo risco (6 e 11) foram encontrados em apenas dois dos casos com cancro do colo do útero. A principal conclusão deste estudo foi que 99,9% dos cancros cervicais contêm HPV.

O HPV 16 é o tipo predominante de cancro do colo do útero invasor [39] e está relacionado com cerca de 50% dos casos de cancro do colo do útero a nível mundial [4,31,41,55]. A variação geográfica do tipo viral ocorre nas diferentes regiões do mundo [10,44], não estando a sua distribuição somente relacionada com os programas de rastreio [31] mas também com a exposição aos factores risco, nomeadamente comportamento sexual [24,37].

Infecções de alto risco podem causar lesões cervicais pré-cancerígenas que são detectadas pela pesquisa citológica de rotina como o teste de Papanicolaou. Se estas lesões são mal diagnosticadas, elas podem evoluir para cancro do colo do útero invasor dentro de poucos meses até vários anos (dependendo da gravidade da lesão) [57].

1.2.2 Epidemiologia do HPV

Em termos internacionais [31,54], é referido que há maior incidência de HPV oncogénico antes dos 25 anos de idade e uma incidência maior de HPV de baixo risco acima dos 55 anos de idade [14]. No que diz respeito à prevalência de HPV em termos mundiais, está relatado um pico de prevalência desta infecção em mulheres com menos de 25 anos de idade, verificando-se um decréscimo consistente após esta idade [22]. A prevalência estimada na população feminina pode variar entre 2 a 44% em todo o mundo (entre 14 e 90%, nos EUA) [31,54].

Muñoz e colaboradores, em 2003 [38], descreveram o tipo de HPV 16 como sendo o mais prevalente em todo o mundo. Os genótipos 16, 18, 45 e 31 são responsáveis por cerca de 80% dos carcinomas epiteliais das células escamosas (exocolo), enquanto os genótipos 16, 18, 45, 59 e 33 são responsáveis por mais de 90%

dos adenocarcinomas (endocolo) do colo do útero. Mundialmente, o HPV 16 é a causa de cerca de 54% dos cancros cervicais invasores e o HPV 18 é a causa de cerca de 17% [31]. Embora os tipos de HPV 16 e 18 ocorram mundialmente, a sua frequência é distribuída de forma desigual pelos diferentes continentes (Fig. 12).

Dados sobre a prevalência do HPV em homens estão menos disponíveis apesar de um estudo recente revelar que jovens entre os 18 e os 23 anos demonstraram prevalência de 25,8% [24].

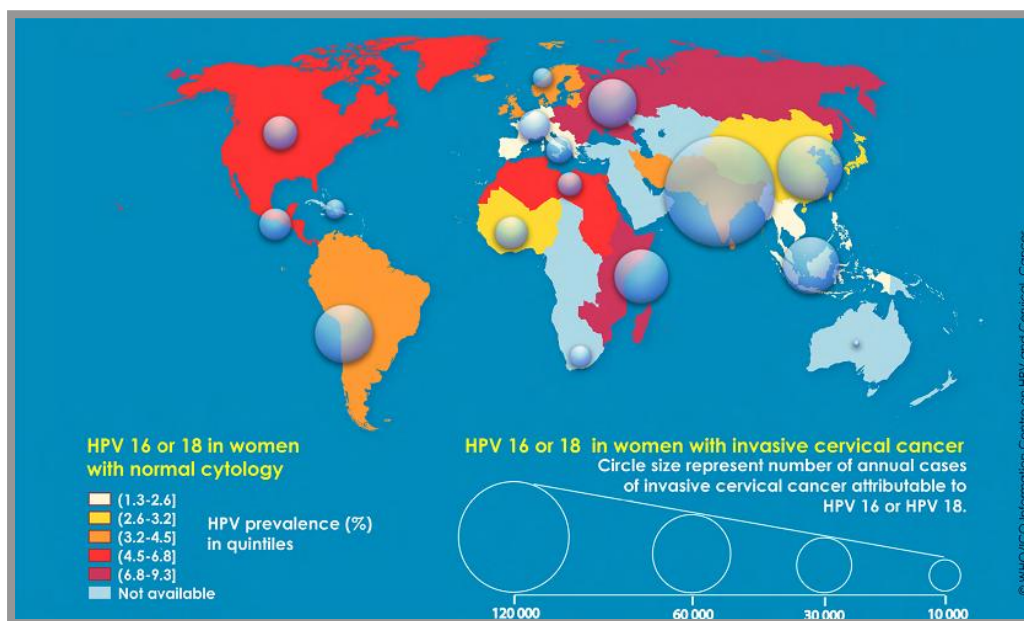


Figura 12: Prevalência de HPV 16 e 18 em mulheres com e sem cancro do colo do útero, por região mundial. (Adaptada de <http://www.who.int/hpvcentre/statistics/en/> Acedida em 14/04/2009)

De acordo com um documento emitido pela Direcção Geral de Saúde Portuguesa em Maio de 2008, intitulado “Vacinação contra infecções por Vírus do Papiloma Humano (HPV)” [14], não se dispõe de muitos dados relativamente à caracterização epidemiológica dos tipos de HPV que surgem na população feminina portuguesa, visto que a informação existente diz apenas respeito a casos de displasia ou de cancro invasivo. Assume-se que em Portugal, os genótipos sejam semelhantes aos encontrados nos restantes países da União Europeia, havendo alguns estudos a decorrer nesse

sentido. Desta forma, os genótipos 16 e 18 são os mais prevalentes e responsáveis por cerca de 70 a 75% de casos de cancro do colo do útero, tendo os genótipos 31 e 45, sido encontrados em cerca de 6% das mulheres portuguesas com cancro do colo do útero [14].

A compreensão da epidemiologia da infecção genital por HPV é um passo relevante para o desenvolvimento de estratégias para acções preventivas desta infecção e, conseqüentemente, redução do número de casos de cancro do colo do útero [44].

1.2.3 Factores de risco

A associação de diferentes genótipos do HPV com o cancro do colo do útero é bem conhecida. A infecção pelos tipos de alto risco do HPV é condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do cancro do colo do útero [24,37,50,54]. Outros factores podem influenciar o desenvolvimento desta doença. Entre eles destacam-se:

- Idade de início da vida sexual - Pode aumentar o risco de infecção [2,5,18,47,57] pelo HPV na medida em que pode ser um marcador de outros comportamentos sexuais. Por exemplo, jovens que têm relações sexuais em idade muito jovem podem estar associados a um maior número de parceiros sexuais durante a vida ou com propensão a ter novos parceiros sexuais com mais frequência. A maior ectopia do colo do útero durante a adolescência, por os tecidos do colo do útero serem mais susceptíveis à acção de agentes carcinogénicos [40,57], durante esta fase de vida, pode aumentar também o risco de infecção por HPV .

- Paridade - Foi estabelecido que as mulheres com duas ou mais crianças têm um risco 80% maior em relação às nulíparas de apresentar lesão intraepitelial; quatro crianças equivalem a três vezes esse risco; após sete a doze crianças o risco poderá aumentar em cinco vezes. Embora não haja uma explicação definitiva para este fenómeno, acredita-se que a imunossupressão da gravidez ou a sua influência hormonal aumentem a susceptibilidade à infecção pelo HPV [2,5,11,18,26,39,44,47,49,57], mas este assunto, é ainda contraditório [50].

- Idade do primeiro parto – A idade com que as mulheres têm o primeiro parto, influencia o risco de infecção por HPV [24,39]. Segundo Bosch e colaboradores [6] a

presença de um ou mais partos antes dos 22 anos de idade quadruplica o risco de cancro do colo uterino.

- Partos vaginais - Mulheres que tiveram partos vaginais têm um risco cerca de 70% maior de desenvolver lesões intraepiteliais, em comparação com aquelas que só tiveram partos por cesariana. A razão para essa associação é o trauma repetido do colo no momento do nascimento. De acordo com Serrano e colaboradores [50], não há prova suficiente sobre este aspecto, sendo ainda um ponto controverso.

- Número de parceiros sexuais – Vários estudos em mulheres têm demonstrado uma forte associação entre o número de parceiros sexuais durante a vida e aquisição de HPV genital [2,4,5,6,18,31,37,39,44,47,57]. Rawls e colaboradores em 1986 [45], mencionaram que o factor de risco mais consistente para a infecção pelo HPV é o aumento do número de parceiros sexuais. Esta exposição é basicamente relacionada com a probabilidade de exposição ao HPV [50]. Por exemplo, as mulheres solteiras, viúvas ou separadas são mais susceptíveis de se tornarem infectadas com HPV porque têm mais parceiros sexuais, sendo eles permanentes ou ocasionais. Nos trabalhos de Winer e colaboradores [60] de 2003, foi mostrado que um curto intervalo de tempo entre o conhecimento de um novo parceiro e o início nas relações sexuais também aumenta o risco de infecção por HPV.

Características do parceiro sexual – A história sexual dos companheiros pode ser tão importante como a história da mulher [31,44,47,50]. Assim, foi sugerido por Paul e colaboradores [42] em 1982, que a conduta sexual da sociedade como um todo, sobretudo os hábitos sexuais dos homens, é de extrema importância visto que o cancro do colo do útero é causado por um agente infeccioso transmitido sexualmente. Assim sendo, a suposição que a infecção peniana pelo HPV é de extrema importância na exposição das mulheres, ganha consistência, sendo tal facto associado a um maior risco de cancro do colo do útero, embora não tenha sido tão extensivamente estudada como a infecção em mulheres [31]. A prevalência de HPV nos homens parece variar substancialmente por país [31]. Foi proposto [52] que a infecção pelo HPV pode levar ao aparecimento de cancro do pénis, sendo o seu desenvolvimento um processo multifactorial semelhante ao encontrado em células epiteliais do carcinoma do colo do útero. A existência de parceiros sexuais que têm relações sexuais frequentes com prostitutas, também contribui para que as respectivas companheiras apresentem um maior risco de desenvolver cancro do colo do útero [5,44]. Em geral, a prevalência da infecção diminui em homens circuncidados sendo o risco de cancro do colo do útero

menor em mulheres com parceiros circuncidados [5,24]. A transmissão de HPV pode ocorrer também através da actividade sexual sem penetração. Num estudo efectuado em 2003 por Winer e colaboradores [60], foi detectado HPV de baixo risco em dedos de indivíduos com verrugas genitais. Apesar disso, a baixa prevalência de HPV em mulheres virgens sugere que este facto não é muito comum [60]. A detecção de HPV em homens é feita através da peniscopia, exame onde é possível detectar lesões microscópicas no pénis que podem ser tratadas, evitando a sua progressão e contágio. É de salientar que os homens também devem ser alvos da educação preventiva, visto que desempenham o papel de transmissores do vírus para as mulheres [53]. A maioria dos estudos incluiu apenas mulheres, estando-se agora a começar a entender um pouco mais sobre a epidemiologia de infecções pelo HPV em homens [57].

- Doenças sexualmente transmissíveis (DST) - Tem sido demonstrada a relação do cancro do colo uterino com doenças sexualmente transmissíveis [2,4,5,6,24,31,36,49,57] tais como sífilis, gonorreia [57], e infecções por *Chlamydia trachomatis* e herpes simplex tipo 2 [5]. A infecção por estes agentes é provável que conduza a inflamação do colo do útero, o que pode facilitar a infecção pelo HPV, podendo esta tornar-se persistente [57]. A infecção por *Trichomonas vaginalis* está directamente relacionada com o HPV [2,19,28,30,61]. Além disso, a co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) facilita o desenvolvimento de cancro do colo do útero [5,31], com um risco aumentado de cancro entre as mulheres infectadas pelo HIV até 3,2 vezes o risco das mulheres não infectadas pelo HIV [50].

- Contraceptivos orais - No relatório de 1985 da OMS foi reportado que o uso da pílula por tempo prolongado pode levar a um aumento de risco do cancro do colo do útero. A OMS explica esta relação através do efeito progestativo da pílula poder suprimir o processo de maturação normal do epitélio do colo do útero, o qual se poderá tornar mais susceptível a agentes sexualmente transmissíveis que poderão causar cancro do colo do útero [2,5,6,17,24,31,37,39,44,47,50,57].

- Outros métodos de contracepção – A protecção de DST's através do uso do diafragma, preservativo e espermicidas, é considerado importante [4]. Em 1991 foi realizado um estudo por Neto [39] que mostrou que para casais utilizadores de métodos de barreira, as propriedades antivirais do espermicida e da barreira mecânica podem ser responsáveis pelo baixo risco de displasia e cancro do colo do útero. Os preservativos, embora eficazes em prevenir a propagação de muitas outras infecções sexualmente transmissíveis, não impedem a infecção pelo HPV [39], contrariamente ao que acontece

com o HIV. O HIV tem cerca de 120 nanómetros de diâmetro, não conseguindo passar através do látex, enquanto que o HPV tem cerca de 55 nanómetros. Embora não protejam contra a infecção do colo do útero, podem oferecer alguma protecção contra as doenças associadas ao HPV.

- Hereditariedade – Alguns estudos [17,24,49,57] mostram uma contribuição hereditária para o aumento do risco do cancro do colo do útero. Embora nem todos os estudos tenham encontrado resultados positivos para esta associação, parece que alelos específicos de determinados genes de resposta imunitária estão associadas com a protecção de susceptibilidade com a infecção por HPV [24]. Esses alelos são de antígeno leucocitário humano (HLA) classe I, que são reconhecidos através de seus receptores chamados *killer cell Immunoglobulin-like receptor* (KIR). Os genes HLA, cujos produtos são proteínas, estão envolvidas na apresentação de antígenos para células T, desempenham um papel na regulação da resposta imune [24].

- Tabaco – Em 1986, foram sugeridos por Brinton e colaboradores [8] dois mecanismos biológicos que podem correlacionar o acto de fumar com o cancro do colo do útero: o efeito carcinogénico de substâncias provenientes do cigarro segregadas no muco do colo do útero, nomeadamente a nicotina e a cotinina (substância que é encontrada na saliva e através da qual se pode medir a quantidade de nicotina absorvida pelo fumador), e os possíveis efeitos imunossupressivos do tabaco. Em 1991, foi referido por Neto [39] que o tabagismo está associado a um decréscimo significativo nas células de *Langerhans*. Este autor encontrou uma relação entre o número de cigarros fumados diariamente e o número de células de *Langerhans* encontradas, ou seja, quanto maior o número de cigarros fumados diariamente, menor a população de células de *Langerhans* encontradas o que indicia diminuição da capacidade imunitária. Outros estudos apontam que o tabagismo pode contribuir para danos genéticos adicionais para as células epiteliais no início de eventos desencadeados pela infecção pelo HPV, por exemplo: interferências com os percursos do gene celular da proteína 53 (*p53*) e da proteína do retinoblastoma (*pRb*) através da expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* [2,3,4,6,17,18,26,31,44,57]. Tais danos adicionais podem acelerar a progressão para malignidade.

- Idade – A diminuição do risco de infecção pelo HPV com o aumento da idade, a partir dos 65 anos, parece ser independente de mudanças no comportamento sexual, sugerindo um papel importante da resposta imune [31,57]. No entanto, um segundo pico em idades tardias, entre os 55 e os 64 anos, também é uma característica comum dos

estudos epidemiológicos, sugerindo uma relação entre mudanças nos hábitos sexuais e reactivação de infecções latentes [37,44].

▪ Outros factores de risco – Está bem documentada a probabilidade de existência de ligação entre um agente sexualmente transmissível e as variáveis sócio culturais [18,39,47], tais como a raça, nível educacional e situação económica [2,6]. Nos EUA existe uma diferença significativa no número de novos casos que aparecem todos os anos entre mulheres de diferentes etnias. As mulheres de raça negra apresentam o dobro da incidência de HPV que as mulheres caucasianas [24,39,54,57]. Outros estudos mostram efeito protector em relação ao risco de infecção persistente por HPV associado com o consumo de frutas, verduras e dietéticos ou níveis circulantes de vitamina C, E, beta e alfa-caroteno, licopeno, luteína/zeaxantina e criptoxantina [57]. Indivíduos que estão psicologicamente (como na gravidez) ou medicamente (como na toma de esteróides) imunossuprimidos, estão sujeitos a um risco maior de infecções pelo HPV. Quando um indivíduo não está mais num estado imunossuprimido, o vírus pode tornar-se latente, como é comum observar-se num pós-parto, ou até o completo desaparecimento da infecção [17].

Todos estes co-factores podem, possivelmente, aumentar o risco de infecções genitais, diminuindo a imunidade sistémica local, estimulando o crescimento de tecido infectado por HPV ou induzindo mutações no tecido infectado.

1.2.4 Caracterização do HPV

Os Vírus do Papiloma Humano são membros da família *Papovaviridae* que formam uma família de mais de 200 génotipos [24,26,41], podendo ser divididos em tipos cutâneos ou da mucosa [46].

Os papiloma vírus são um género de vírus agrupados juntamente pela sua homogeneidade e tumorigenicidade de DNA, que afecta os vertebrados. O HPV é um vírus relativamente pequeno, com cerca de 55 nm de diâmetro, sendo o material genético uma molécula de DNA circular de cadeia dupla. O HPV possui uma cápside proteica de simetria icosaédrica e a sua replicação é nuclear (Fig. 13) [9,33].

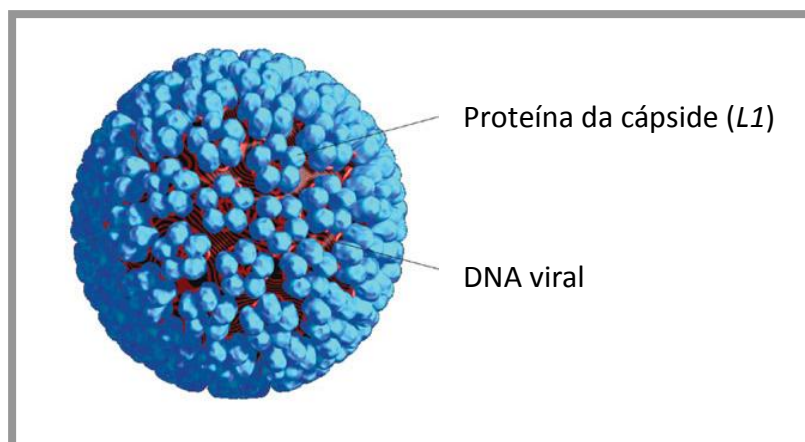


Figura 13: Modelo tridimensional do Vírus do Papiloma Humano. (Adaptada de: http://www.prn.org/index.php/provider_resources/prn_art/human_papillomavirus_virus_hpv_3_d_model/ Acedida em 15/04/2009)

O HPV é um vírus de DNA com um pequeno genoma de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) [4,41], sendo constituído por 8 a 9 fases de leitura (*open reading frames* - ORFs). O genoma viral pode ser dividido em três regiões: região regulatória (*Long Control Region* – LCR ou *Upstream Regulatory Region* - URR); uma região precoce (*early* - E) e uma região tardia (*late* - L), dependendo de quando são expressas. O mapa do genoma do HPV 16 pode ser considerado como protótipo de todos os genótipos do HPV (Fig. 14) [25,49].

A região regulatória, não codificante, de aproximadamente 1000 pb contém sequências que regulam a expressão dos genes virais, designadamente o promotor, abrangendo locais de ligação para DNA e ácido ribonucleico (RNA) polimerases e outros factores que potenciam ou reprimem a expressão viral dos genes [9,21,33,46].

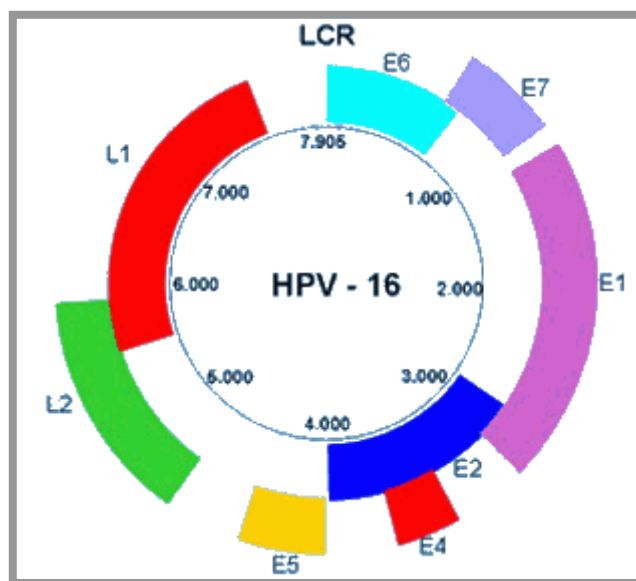


Figura 14: Representação do genoma do HPV 16: Genes precoces (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*) genes tardios (*L1* e *L2*) e região regulatória (LCR). (Adaptada de http://www.sppv.org/info_ciencia.html Acedida em 26/04/2009)

Os genes precoces (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*) são expressos nas células das camadas inferiores do epitélio do colo do útero e codificam as proteínas necessárias para a replicação e transcrição do genoma viral [46,49,50]. Os genes tardios (*L1* e *L2*) codificam proteínas estruturais, com capacidade para se auto-agregarem, de modo a formar a cápside do vírus [9,21,33,46]. Os produtos dos genes precoces *E6* e *E7* actuam como oncoproteínas. Estes produtos são expressos em todos os tumores, inactivando os produtos celulares dos genes supressores tumorais *p53* e *pRb* e provocando a proliferação celular descontrolada.

Assim sendo, o HPV surgiu como principal suspeito ao ser encontrado em cerca de 90% dos cancros cervicais [54] e por possuir oncogenes (*E6* e *E7*) com potencial de transformação [46].

1.2.5 Mecanismos de infecção epitelial e carcinogénese

O cancro do colo do útero começa como uma lesão intraepitelial ou displásica, afectando principalmente a união do epitélio escamoso e colunar do exocolo e do endocolo, respectivamente [24]. Assim sendo, a maioria dos cancros do colo do útero ocorre na zona de transformação, região onde o epitélio colunar do endocolo encontra o epitélio escamoso estratificado do exocolo [24]. Nesta região, as células estão em constante proliferação, fazendo com que este local seja mais acessível a vírus [24,50,52].

Segundo a Sociedade Portuguesa de Papilomavírus, “a infecção do epitélio genital ocorre quando as partículas virais atingem as células basais do epitélio pavimentoso do colo do útero (Fig. 15). O HPV atinge a camada basal através de microtraumatismos no epitélio que podem surgir durante a relação sexual. Após a entrada do vírus, o modo de interacção dos genes do vírus com as células do hospedeiro distingue os dois tipos de reacção à infecção provocada por este microrganismo. As infecções epiteliais são características dos HPV de baixo risco, resultando de uma multiplicação “explosiva” do vírus no interior das células epiteliais do hospedeiro. A replicação viral depende dos processos de transcrição e tradução das células do hospedeiro. A replicação é então iniciada pelas proteínas virais *E1* e *E2* expressas pelos genes homónimos e que se ligam ao DNA do HPV para promover a sua replicação, após a qual se inicia a expressão das proteínas estruturais *L1* e *L2* para que ocorra formação da cápside viral (Quadro 2). Assim que termina a replicação do DNA, ocorre o processo de inserção nas novas cápsides, formando-se novas partículas virais. Finalmente ocorre lise celular e infecção de novas células, o que provoca o aparecimento de verrugas características desta infecção. A integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro leva à linearização do genoma do vírus entre os genes *E1* e *L1*, e inactivação do gene *E2* por corte ou deleção aquando da integração. Este gene, *E2*, codifica uma proteína homónima responsável pela regulação da expressão dos genes *E6* e *E7*, pelo que a sua perda induz a expressão “descontrolada” dos genes *E6* e *E7*, produzindo alterações fenotípicas na célula. Os genes virais *E6* e *E7* codificam proteínas responsáveis pelo potencial oncogénico do vírus. Assim, as proteínas *E6* e *E7* dos principais tipos de HPV oncogénicos formam complexos com as proteínas celulares *p53* e *pRb* (respectivamente), levando à sua degradação pela via proteolítica dependente da ubiquitina, inactivando a sua função como controladoras do ciclo celular (Fig. 16). Quando ocorre uma lesão no DNA celular, as proteínas *p53* e *pRb* “travam” o ciclo celular

permitindo à célula activar os mecanismos de reparação do DNA. A inactivação destas proteínas celulares (*p53* e *pRb*) pelas proteínas virais impede os processos de reparação do DNA, dando origem a instabilidade genética, acumulação de mutações e em última instância ao desenvolvimento de neoplasia. Este mecanismo tem sido várias vezes descrito como crucial para a transformação e proliferação destes cancros” (in http://www.sppv.org/info_ciencia.html Acedida em 13/04/2009).

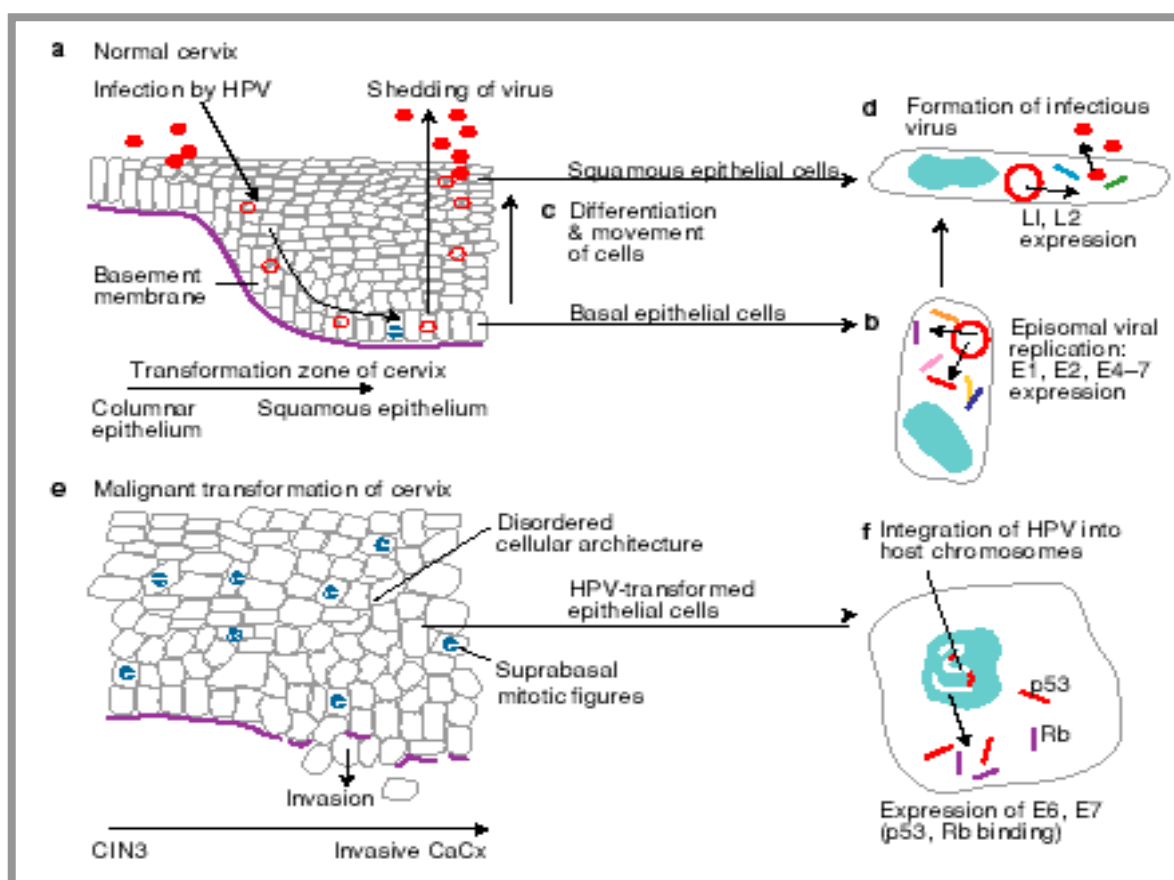


Figura 15: Infecção pelo HPV e a sua replicação nas células epiteliais do colo do útero. (Adaptada de http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM1_05/S1462399498000210sup015.htm Acedida em 06/07/2009)

Quadro 2: Relação entre os genes do Papiloma Vírus Humano e as suas funções [46].

Expressão Genética	Genes	Função
Precoce	E1	Actividade de DNA helicase, ligação de ATP DNA dependente, actividade de ATPase. Papel na replicação e na repressão da replicação.
	E2	Regulador da transcrição e replicação viral, controle da região de expressão precoce, necessária para replicação viral eficiente junto com <i>E1</i> .
	E3	Sem função conhecida (presente apenas numa minoria de papiloma vírus).
	E4	Expresso primariamente em epitélio em diferenciação, associado ao citoesqueleto de queratina de células epiteliais em cultura. Papel na liberação de vírus.
	E5	Actividade de transformação em HPV16 <i>in vitro</i> . Possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , mas pode ter um papel na iniciação da carcinogénese.
	E6	Papel no processo de transformação juntamente com <i>E7</i> . Propriedades de activação transcricional. <i>E6</i> dos HPVs de alto risco inactiva <i>p53</i> através de degradação rápida através da via da ubiquitina. Juntamente com <i>E7</i> propicia um ambiente celular para a replicação viral.
	E7	Induz síntese de DNA em células em repouso. <i>E7</i> liga-se à proteína do retinoblastoma (<i>pRb</i>), resultando na sua inactivação funcional permitindo progressão funcional para a fase S do ciclo celular. Proteína <i>E7</i> dos tipos de HPV de baixo risco 6 e 11 liga-se menos eficientemente do que a proteína <i>E7</i> dos tipos de HPV de alto risco 16 e 18.
	E8	Sem função conhecida (presente apenas numa minoria dos papiloma vírus).
Tardia	L1	Codifica proteína principal da cápside.
	L2	Codifica proteína secundária da cápside.

O grau de expressão de *E6* e *E7* é altamente correlacionado com o tipo de lesão do colo do útero: em lesões de baixo grau, *E6* e *E7* estão expressos em níveis baixos em células basais e níveis mais elevados em camadas superiores do epitélio, enquanto que em lesões de alto grau *E6* e *E7* estão expressas em níveis elevados em todo o epitélio. Em lesões de baixo grau, o HPV apresenta forma epissomal enquanto que em lesões de

grau superior e cancro, o DNA do HPV é integrado no cromossoma da célula hospedeira [4].

A patogénese desta doença pode ser investigada em detalhe, graças aos avanços em biologia celular, molecular e imunologia. Esses avanços têm revelado o papel do papilomavírus humano no desenvolvimento de lesões pré-malignas e cancro do colo do útero e tiveram importantes implicações na metodologia de rastreio, diagnóstico e tratamento dessa doença.

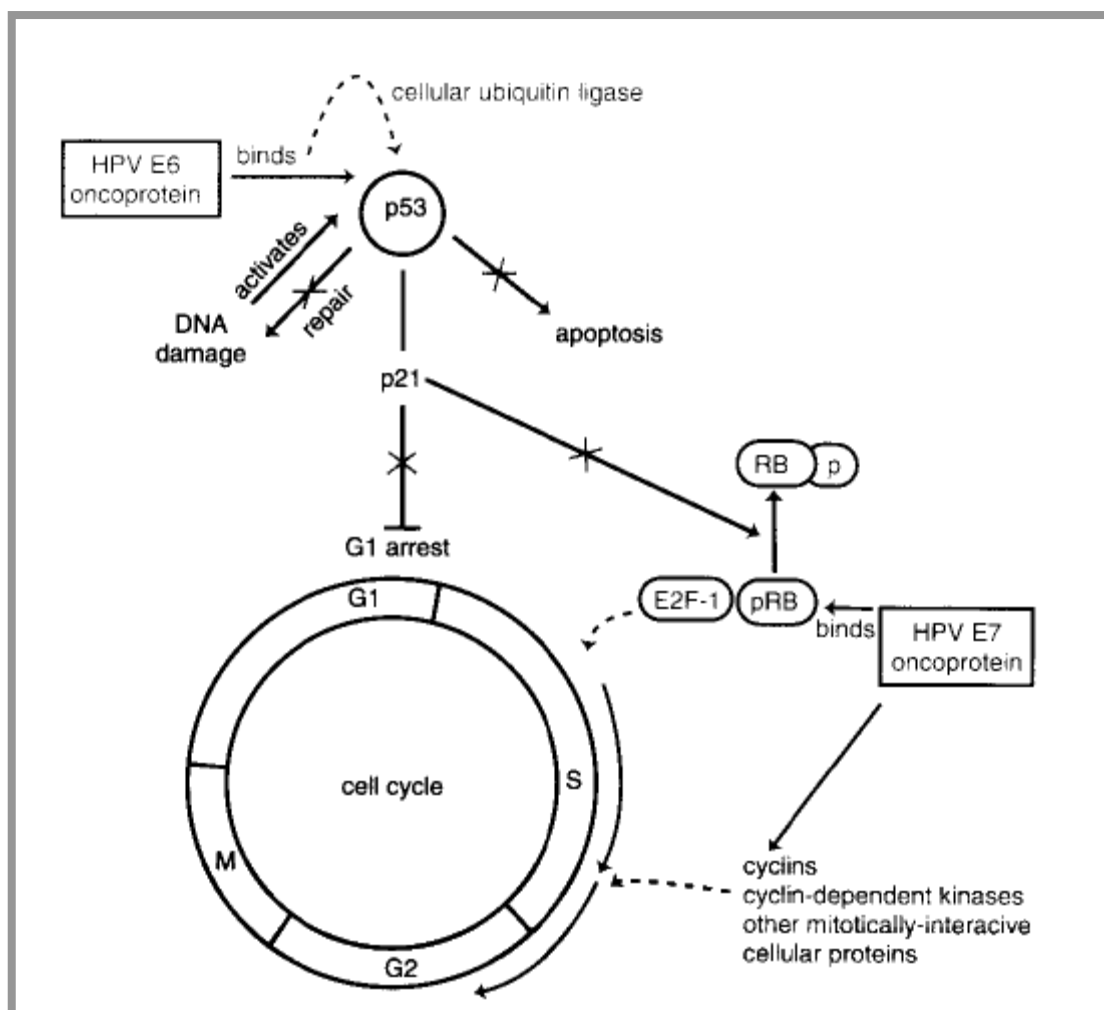


Figura 16: Acção das oncoproteínas E6 e E7 e relação com o ciclo celular. As proteínas E6 e E7 ligam-se às proteínas celulares *p53* e *pRb* respectivamente, alterando as suas funções e as vias de regulação do ciclo celular [9].

1.2.6 Diagnóstico

O cancro do colo do útero pode ser facilmente diagnosticado numa das suas pré fases, porque o colo do útero é facilmente acessível para inspecção e amostragem; e ainda mais importante: anomalias cervicais pré invasivas persistem por vários anos e podem ser eficazmente tratadas antes que progridam para cancro invasor. A colheita citológica representa o método *standard* do rastreio do cancro do colo uterino em todo o mundo e o seu uso tem contribuído para um acentuado decréscimo na sua incidência e nas suas taxas de mortalidade [47]. Este método, desenvolvido nos anos trinta, é o mais amplamente utilizado e adequado para o teste de despistagem de lesões do colo do útero. O diagnóstico da doença, através do esfregaço das células epiteliais do colo do útero, é geralmente obtido por análise microscópica de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou. Este tem sido o método de escolha desde a década de 1950; este método revelou-se valioso para o rastreio em massa e permite a detecção precoce de lesões para as mesmas serem tratadas de forma eficaz [50]. No entanto, o teste de Papanicolaou, tem algumas limitações, sendo a mais importante, a interpretação subjectiva dos resultados. Na prática clínica, há grande preocupação com a variabilidade na terminologia utilizada para relatar os resultados da citologia, facto que levou à mudança da proposta original de Papanicolaou. Numa tentativa de unificar e esclarecer a variabilidade das terminologias, foi desenvolvido em 1988 o Sistema de *Bethesda*, que teve duas sucessivas revisões para melhorar a informação, sendo a terminologia actualmente recomendada para o relatório dos resultados da citologia do colo do útero, o qual considera a informação relativa ao HPV, como parte dos critérios citológicos para definir o grau da lesão. Além disso, o Sistema de *Bethesda* criou uma nova categoria de lesão *borderline*: células escamosas atípicas de significado indeterminado (AS-CUS) (Quadro 3). Estas mudanças resultaram num aumento das lesões intraepiteliais de baixo grau, que combinados com AS-CUS, dão um total de cerca de 30% dos esfregaços [49]. No seguimento, a maioria dessas anomalias voltam ao normal e, em alguns casos constituem lesões de baixo grau persistentes ou lesões intraepiteliais de alto grau. A taxa de falsos negativos na citologia varia entre 20% a 30%, e mulheres que tenham tido resultados falsos negativos podem vir a desenvolver cancro do colo do útero. Por isso, métodos complementares que poderiam melhorar o diagnóstico de cancro do colo do útero têm sido estudados ao longo das últimas duas décadas. Para superar esta desvantagem do teste de Papanicolaou, alguns autores [3] têm sugerido métodos de

triagem secundários como a colposcopia e o teste de DNA de HPV [17]. A colposcopia é usada como método secundário de triagem, mas também pode não detectar a infecção pelo vírus e só iria sobrecarregar as infra-estruturas existentes [5]. Se a infecção pelo HPV é um precursor da neoplasia do colo do útero, deveria ser utilizado o teste de HPV como um método adicional na despistagem de cancro do colo do útero. Por outro lado, uma vez que as mulheres com ou sem pré lesões, e infectadas com tipos de HPV de alto risco 16 e 18 mostram uma maior taxa de progressão para malignidade, a detecção desta infecção oncogénica e subclínica pelo HPV pode desempenhar um papel importante no controlo da lesão intraepitelial e progressão para cancro invasor. A detecção molecular do HPV apresenta uma abordagem diferente do paciente e análise de gestão, permitindo identificação da infecção por HPV em pacientes de risco para a doença [3]. Desta forma, a estratégia de detecção de tipos de HPV de alto risco juntamente com a citologia de rotina pode ser clinicamente útil e pode identificar mulheres com maior risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero apesar dos resultados negativos na citologia. Segundo o painel da conclusão consenso da IARC e OMS, é perfeitamente justificável o uso do teste de HPV como um adjunto no rastreamento do cancro do colo uterino. Estudos recentes na população de alto risco têm mostrado que acrescentando o teste de HPV no rastreio com citologia do colo do útero, aumenta a sensibilidade na detecção lesões de alto grau e cancro do colo do útero [49]. É, portanto, sugerido que, enquanto que o exame citológico de Papanicolaou deve continuar a ser o método de rotina para detecção de lesões cervicais, o teste de DNA de HPV deve ser utilizado como um adjunto à citologia para rastreio do cancro do colo do útero ou das suas lesões precursoras em especial [5].

Quadro 3: Sistema de Bethesda actual (Adaptado de <http://screening.iarc.fr/atlasclassifbethesda.php?lang=4> Acedido em 14/04/2009)

Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna (NILM)	<u>NILM</u>	Sem qualquer alteração	
	<u>Microrganismos</u>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	
		Fungos compatíveis com <i>Candida</i> spp	
		Desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana	
		Bactérias consistentes com <i>Actinomyces</i> spp	
	<u>Outros achados não neoplásicos</u>	Alterações celulares reactivas, relacionadas com:	- Inflamação - Radiação - Dispositivo Intra-uterino (DIU)
		Células glandulares pós histerectomia	
Atrofia			
Anomalia das células epiteliais	<u>Células escamosas</u>	Células atípicas: - De significado indeterminado (ASC-US) - Não se podendo excluir HSIL (ASC-H)	
		Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL)	
		Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)	
		Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) : Suspeita de invasão	
	Carcinoma invasor		
	<u>Células glandulares</u>	Células endocervicais, favorecendo neoplasia	
		Células endometriais, favorecendo neoplasia	
Adenocarcinoma <i>in situ</i> Adenocarcinoma			
Outra	Células endometriais em mulheres com mais de 40 anos de idade.		

A detecção de tipos de HPV de alto risco pode reduzir o número de falsos negativos da citologia e o teste de HPV poderá ser utilizado para guiar a gestão destas lesões de baixo grau, incluindo também lesões *borderline*, tais como AS-CUS [3]. Sendo o exame de prevenção de cancro ginecológico uma estratégia para redução dos altos índices de mortalidade por cancro de colo uterino, vagina e vulva causados pelo HPV, a sua pesquisa deve ser priorizada pelas políticas de saúde pública nos serviços de referência dos diferentes países [3]. A detecção do HPV na última década demonstrou um aumento de cerca de 500% [43], o que pode ter sido conseguido através de avanços e descobertas dos aspectos citológicos e histológicos e pela reinterpretação das imagens da colposcopia e da peniscopia. Mais ainda, com a importante ajuda dos métodos da biologia molecular, tornou-se possível detectar o tipo do vírus encontrado em tecidos, secreções e fluídos [43]. Falta, no entanto, esclarecer se a condição de risco aumentado de desenvolver cancro do colo do útero implica maior exposição ao HPV ou dificuldades de acesso a serviços de detecção precoce [5].

1.2.7 Métodos de Detecção

Um dos métodos mais usados para a detecção de HPV em amostras citológicas do colo do útero é a captura híbrida (HC2) que é o único teste que conta com a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico.

Existem outros testes disponíveis para detectar o HPV, que permitem determinar o(s) genótipo(s) de HPV existente(s) na lesão, nomeadamente o *PreTect® HPV- Proofer* (*NorChip AS, Norway*) e o Teste de Genotipagem HPV – *PapilloCheck®* (*Greiner Bio-One GmbH, Germany*). O *PreTect® HPV-Proofer* detecta mRNA dos oncogenes *E6* e *E7* dos cinco tipos de HPV mais oncogénicos: 16, 18, 31, 33 e 45. É usado só em casos seleccionados para detecção do factor de risco oncogénico, sendo crucial para diagnosticar o cancro do colo do útero [10]. O Teste de Genotipagem – *PapilloCheck®* é um teste baseado na reacção de polimerização em cadeia (PCR) com a mais recente tecnologia de *microarrays* (DNA-Chip), de origem alemã que permite identificar 24 diferentes tipos de HPV. É útil na determinação do prognóstico, pois a exclusão da presença dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45, permite atenuar o prognóstico de uma infecção por HPV. Não sendo um exame de rotina, a tipificação dos genótipos de HPV é realizada

somente em casos seleccionados, sendo requisitada a pesquisa de DNA de HPV na citologia do colo do útero para caracterização dos tipos de HPV envolvidos.

Ultimamente, desenvolveu-se a segunda geração do teste de captura híbrida que é um método de hibridação não radioactivo, relativamente rápido, concebido para detectar 18 tipos de HPV divididos em grupos de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68) e baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44). A detecção de grupos de baixo risco não é, contudo, tão vantajosa como a detecção de grupos de alto risco, não sendo efectuada por rotina.

A captura híbrida apresenta como vantagem o facto de se poder usar o material colhido para citologia líquida. Devido ao alto custo, o teste de captura híbrida não pode ser recomendado para rotina no rastreio do colo do útero em países pobres [52]. No entanto, verificou-se ser uma ferramenta útil, quando combinado com a citologia [12], levando à descoberta de infecções de alto risco em tecidos aparentemente normais e revelar infecções silenciosas que podem ser responsáveis pela manutenção do HPV na população em geral [52]. Os resultados de estudos de detecção de HPV com captura híbrida apontam para a necessidade de uma estreita e cuidadosa gestão dos pacientes, permitindo assim reduzir tratamentos excessivos e fazer a análise de ambos os parceiros sexuais. A análise do teste de captura híbrida é quantitativa, sendo os resultados expressos em Unidades de Luz Relativas (RLU). A quimioluminescência obtida nas amostras é comparada com a dos controlos positivos (RLU/PC), permitindo assim avaliar a carga viral [52]. Quando comparado com os outros kits de testes de HPV disponíveis, nomeadamente com o *PreTect® HPV- Proofer* e o *PapilloCheck®*, apresenta como vantagem a possibilidade de determinar a carga viral que pode ser correlacionada com a natureza da patologia do colo do útero [1,24,27,52]. Vários pesquisadores defendem a hipótese de que a alta carga viral de HPV de alto risco tem uma importante relação com lesões intraepiteliais escamosas e com a sua maior gravidade [24,27,35,52]. O teste de captura híbrida ao dar uma estimativa de carga viral global, possibilita uma melhor avaliação da gravidade da infecção, servindo para decidir melhor sobre o tratamento a aplicar. Mulheres com carga viral baixa são mais propensas a eliminar espontaneamente o vírus, enquanto mulheres com altos níveis dos vírus dificilmente poderão eliminar o vírus. Contudo, esta técnica discrimina só os tipos de alto risco sem informar sobre qual o genótipo viral específico. A captura híbrida permite identificar grupos de HPV de alto e baixo risco, enquanto que o PCR permite a identificação de tipos virais específicos. A captura híbrida é uma técnica que pode ser facilmente aplicada em laboratório, uma vez

que não exige instalações especiais e pessoal com ampla experiência em técnicas moleculares. Por agora, a técnica não permite conhecer o tipo específico de HPV, o que, no futuro pode ser um factor limitante, se for confirmada a mais rápida progressão de infecções pelos HPVs 16 e 18. Os métodos de PCR baseados na amplificação de DNA de HPV possuem um alta sensibilidade para a detecção viral em amostras cérvico vaginais [57]. No entanto, estes testes revelam o problema da possível contaminação com o produto amplificado, pelo que, deveriam ser realizados em laboratórios especializados. Por outro lado, os métodos comercializados de amplificação do sinal, ou seja, a captura híbrida de DNA de HPV, são teoricamente menos sensíveis, mas têm um menor risco de contaminação e são, portanto, mais fáceis de introduzir nos laboratórios de diagnóstico. Técnicas baseadas em PCR podem detectar o tipo específico e múltiplas infecções, o que permite acompanhamento especial da persistência da infecção. A reacção de polimerização em cadeia é actualmente o método mais sensível para a detecção de HPV e o único método disponível para identificação do tipo de vírus.

A implementação da detecção de ácidos nucleicos para HPV promete aumentar a sensibilidade e a relação de custo-eficácia dos programas de despiste do cancro do colo do útero, uma vez que permite detectar lesões de alto risco mais precocemente e reduzir a necessidade de colposcopia e de tratamentos desnecessários.

1.2.8 Prevenção

Por as infecções pelo HPV serem sexualmente transmissíveis, esforços na prevenção da infecção pelo HPV podem prevenir o aparecimento de outras doenças sexualmente transmissíveis, como por exemplo o HIV.

O programa “ABC” (*“Abstinence, Be faithfull and use Condom”*), ou seja, abstinência sexual, ser fiel e utilizar preservativo foi uma abordagem de prevenção do HIV bem sucedida no Uganda, em finais dos anos 1980 e 1990. A abordagem ABC poderia ter algum sucesso na prevenção da infecção pelo HPV, pois evitando a actividade sexual previne-se a maioria das infecções pelo HPV sexualmente transmitidas e impedindo, ao mesmo tempo, a aquisição de outras doenças sexualmente transmissíveis [31]. Dada a forte associação entre aumento do número de parceiros sexuais e infecção pelo HPV, sendo fiel a um parceiro provavelmente diminuir-se-ia a probabilidade de contrair uma infecção por HPV, apesar desta probabilidade ser mitigada

se o parceiro sexual não for monogâmico. Ainda assim, a prevalência e incidência de infecção por HPV, provavelmente iria diminuir. Os efeitos de prevenção de HPV através do uso do preservativo ainda não são bem claros. Um estudo recente sobre a eficácia da utilização do preservativo na prevenção da infecção pelo HPV mostrou que não existem evidências consistentes de que o seu uso reduz o risco de aquisição de uma infecção por HPV, apesar dos preservativos parecerem proteger contra as verrugas genitais, lesões intraepiteliais de alto grau e contra o cancro do colo do útero invasor [31].

O reconhecimento de que a infecção pelo HPV é a principal causa de neoplasia do colo do útero tem criado novas frentes na prevenção primária e no tratamento da doença secundária. Através da prevenção e controle de infecção genital por HPV, pode conseguir-se uma prevenção primária do cancro do colo do útero. A prevenção da infecção genital HPV pode ser alcançada com estratégias de promoção de saúde de forma a mudar o comportamento sexual sendo assim também controladas as outras DST de importância para a saúde pública [49].

A vacinação actualmente é já uma realidade, mas o rastreio através do método de Papanicolaou não deve, de todo, ser abolido [54]. Actualmente, as vacinas protegem apenas contra 2 dos 15 tipos de HPV de alto risco, sendo eles o HPV 16 e o HPV 18 [31]. Os 13 tipos de HPV não abrangidos pela vacinação provocam cerca de 30% dos cancros cervicais e um número de neoplasias anogenitais. Para além disso, vai levar alguns anos até que todas as mulheres de risco estejam protegidas pela vacinação. E mulheres já infectadas não estão protegidas dos tipos de HPV que já as infectaram [54].

Os programas de vacinação devem ser implementados como parte de um programa de cobertura mundial, pois, de outra forma, se a vacinação é só oferecida àqueles que têm acesso aos programas de rastreio, então os programas de vacinação serão dispendiosos mas não eficientes [54].

A vacinação contra o HPV terá grande valor nos países em vias de desenvolvimento, onde ocorre 80% dos novos casos anuais de cancro do colo do útero e onde os programas de rastreio por citologia têm sido ineficazes [50].

De acordo com o documento emitido pela Direcção Geral de Saúde Portuguesa em Maio de 2008, intitulado “Vacinação contra infecções por Vírus do Papiloma Humano (HPV)” [14], “desde Dezembro de 2006 é comercializada em Portugal a vacina tetravalente *Gardasil*®, fazendo esta parte do Plano Nacional de Vacinação, desenvolvida contra os HPV 16 e 18 (responsáveis por 70 a 75% de casos de cancro do colo do útero) e contra os HPV 6 e 11 (responsáveis por cerca de 90% de casos de verrugas genitais).

Desde Outubro de 2007 é também comercializada em Portugal a vacina bivalente *Cervarix*®, que confere imunidade para os HPV 16 e 18 (responsáveis por 70 a 75% de casos de cancro do colo do útero). As duas vacinas são constituídas por partículas semelhantes aos vírus (*virus like particles* - VLP), não infecciosas, produzidas por tecnologia de DNA recombinante e destinam-se à prevenção das infecções por HPV, incluindo as infecções persistentes, as lesões intraepiteliais de baixo grau, as lesões precursoras do cancro ou HSIL e o cancro do colo do útero. Adicionalmente, a vacina tetravalente protege também contra o aparecimento de condilomas e de neoplasias vulvares intraepiteliais (VIN). Não é conhecida a duração do período de protecção induzido pelas vacinas. É apenas conhecido o período abrangido pelos estudos realizados pelos fabricantes das vacinas (5,5 anos). Para as duas vacinas, está recomendado um esquema vacinal de 3 doses por via intramuscular e para nenhuma delas está, actualmente, estabelecida a necessidade de reforços.”

Um bom programa de vacinação contra o HPV, juntamente com o programa de rastreio, apresenta maior probabilidade de diminuir a morbilidade e mortalidade associadas com neoplasia do colo do útero, verrugas genitais e outras neoplasias associadas com o HPV.

1.2.9 Tratamento

Uma vez diagnosticada por citologia, colposcopia e biópsia dirigida pela colposcopia, as opções de tratamento para lesões de baixo grau variam amplamente no mundo, podendo ir desde a simples observação até terapias excisionais. Pacientes com lesões persistentes de baixo grau devem ser tratados principalmente com o uso da terapia ablativa ambulatoria [49].

As orientações para a manipulação de lesões de alto grau estão bem estabelecidas. Recomenda-se curetagem do endocolo se não existirem lesões visíveis no exocolo. Em pacientes com lesões de alto grau confirmadas por biópsia, deve ser realizada conização ou excluir a neoplasia invasora com electroconização. Em mulheres com cancro invasor são necessários testes adicionais para estabelecer a fase de doença. O tratamento depende essencialmente da extensão da lesão mas também de outros factores como a idade e o desejo de preservar a fertilidade [49].

2. OBJETIVOS

2. OBJECTIVOS

O objectivo geral deste trabalho consistiu na avaliação da eficácia do método para detectar HPV de alto risco oncogénico. Para tal foi usado o método de detecção de captura híbrida em mulheres com citologia negativas para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna. Assim foi:

- seleccionado um número de casos de citologias NILM,
- analisado através de captura híbrida os casos de citologia ginecológica com resultado NILM, de modo a verificar a existência de associação entre os resultados de HPV oncogénico positivo, casos de citologia normal e cancro do colo do útero,
- estudada a correlação da prevalência da infecção de HPV de alto risco oncogénico nos casos positivos em citologias NILM,
- estudada a correlação entre os casos HPV oncogénico positivos e carga viral,
- verificada a importância da pesquisa da infecção de HPV nas citologias NILM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Neste trabalho foram utilizadas 3262 amostras de indivíduos do sexo feminino, obtidas a partir de citologias em meio líquido (*ThinPrep*[®]) que deram entrada no Laboratório de Anatomia Patológica J. A. Macedo Dias, S.A. provenientes de várias consultas, quer de planeamento familiar, quer de ginecologia, de todo o país, e que foram classificados com diagnóstico de citologia NILM, segundo o Sistema de *Bethesda*.

3.2 TESTE DE DNA-HPV PELO MÉTODO DE CAPTURA HÍBRIDA

A Captura Híbrida[®] (*Digene Inc., Gaithersborough MD, USA*) é um sofisticado teste quantitativo de hibridação molecular, para pesquisa de vírus e bactérias (Vírus do Papiloma Humano, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*). O teste de DNA-HPV pelo método da captura híbrida consiste numa hibridação de anticorpos amplificados realizada em microplaca e utilizando detecção quimioluminescente. O material para análise passa por cinco procedimentos: desnaturação, hibridação, captura dos híbridos, reacção dos híbridos com o conjugado e amplificação do sinal (Fig. 17).

As amostras contendo o DNA alvo são hibridadas com uma sonda *cocktail* específica (*Digene*[®] Ref. 5196-1230). A sonda contém RNA de HPVs de alto risco: 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. “São utilizados híbridos RNA:DNA para evitar hibridação não específica, uma vez que o uso de sondas RNA de cadeia simples evita reacções cruzadas indesejáveis” (*in* http://www.kcm.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=43 Acedida em 06/07/2009). A alta estabilidade térmica dos híbridos RNA:DNA favorece condições de alta estringência, aumentando assim a especificidade da reacção, ou seja, a probabilidade da sonda hibridar apenas com o DNA alvo.

Os híbridos RNA:DNA resultantes são capturados na superfície de uma microplaca de poços revestidos com anticorpos específicos para híbridos RNA:DNA. Os híbridos imobilizados reagem com anticorpos específicos conjugados com fosfatase alcalina, para híbridos de RNA:DNA, e são detectados com um substrato

quimioluminescente. Várias moléculas de fosfatase alcalina são conjugadas com cada anticorpo. Múltiplos anticorpos conjugados ligam-se a cada híbrido capturado, resultando num sinal de amplificação substancial. Assim que o substrato é clivado pela enzima fosfatase alcalina, é emitida luz que é medida em unidades de luz relativas no luminómetro DML 2000[®]. A intensidade de luz emitida indica a presença ou ausência do DNA alvo na amostra. A medida RLU maior ou igual ao valor *cutoff* indica a presença da sequência específica de DNA-HPV na amostra. Um RLU menor que o valor do *cutoff* indica ausência da sequência de DNA-HPV específico ou que os níveis de DNA-HPV estão abaixo do limite de detecção do ensaio.

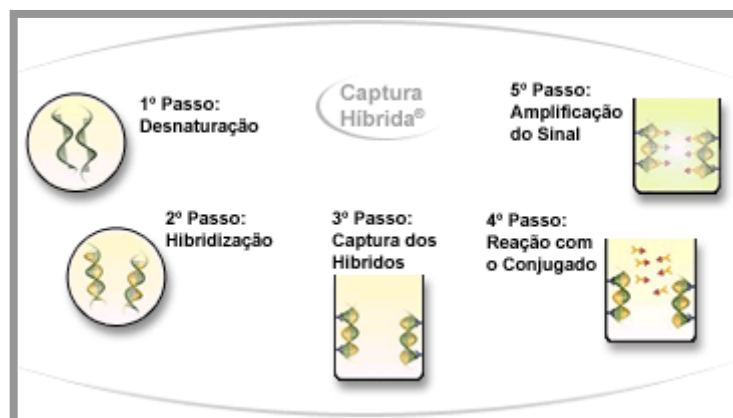


Figura 17: Procedimentos da captura híbrida que utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal. (Adaptado de http://www.digene.com.br/menu/captura_hibrida/texto_captura_hpv.asp#)

A leitura é totalmente automatizada, sendo os valores lidos pelo luminómetro transmitidos a um computador, dotado de *software* específico, que analisa os RLUs medidos e faz os cálculos de validação do ensaio e a quantificação dos controlos positivos, negativos e amostras. É de salientar que o *software* executa o relatório final do teste e a sua impressão, não havendo margem de erro nos cálculos.

O procedimento das amostras para análise de HPV por HC2 consistiu em:

- Colheitas do Material Biológico – As citologias do colo uterino foram previamente colhidas e armazenadas em meio líquido *PreservCyt* (*Cytec Corporation*®).
- Fase de desnaturação das amostras – Pipetou-se 4 mL de amostra de citologia líquida para um tubo de centrífuga ao qual foi adicionado 400 µL de meio de conversão (*Digene*® Ref. 5127-1220). Os tubos foram vortexados de seguida durante 20 segundos a 1800 rotações por minuto (rpm) e posteriormente centrifugados 10 minutos a 2600 rpm. Após centrifugação, foi decantado o sobrenadante e foram adicionados 150 µL de desnaturante (120 µL *Specimen Transport Medium* (STM) + 60 µL desnaturante) à amostra. O desnaturante contém hidróxido de sódio que quebra a cadeia dupla de DNA. As amostras foram vortexadas durante 10 segundos a 1800 rpm e incubadas a 65°C ± 2°C durante 45 minutos. Nesta altura, as amostras podem ser guardadas até 6 meses a -20 °C.
- Fase de desnaturação dos controlos – Adicionou-se 500 µL de solução desnaturante ao controlo positivo (1pg/mL de DNA-HPV 16 clonado em STM) e 1000 µL de solução desnaturante ao controlo negativo (transportador de DNA em STM). As amostras e os controlos foram vortexados durante 10 segundos a 1800 rpm e incubados durante 45 minutos a 65 °C ± 2°C.
- Fase de hibridação – Pipetou-se 25 µL de sonda *cocktail* de RNA-HPV de alto risco para os tubos de hibridação. Pipetou-se 75 µL de cada um dos controlos e das amostras para os respectivos tubos de hibridação, conforme o mapa de ensaio e taparam-se os mesmos com película aderente. Agitou-se 3 minutos a 1100 rpm no agitador rotacional. Nesta fase, os controlos ficam com uma tonalidade amarela e as amostras com uma tonalidade rosa, o que significa que houve mistura dos controlos com a sonda e das amostras com a sonda. Incubou-se em banho-maria a 65°C ± 2°C durante 1 hora.
- Fase de captura dos híbridos – Em seguida, transferiu-se os 100 µL dos controlos e das amostras para os respectivos poços da microplaca. Cobriu-se com película aderente e agitou-se no agitador rotacional a 1100 rpm durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, rejeitou-se, com um único movimento, o conteúdo dos poços e mantendo a microplaca para baixo, bateu-se 4 vezes em papel absorvente para retirar o excesso das amostras/controlos.

- Fase de reacção dos híbridos com o conjugado – Pipetou-se para cada poço 75 µL de Reagente 1 (contém conjugado da enzima fosfatase alcalina). Cobriu-se com película aderente e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, virou-se a microplaca, num movimento único contra papel absorvente, 2 minutos, de forma ao seu conteúdo ser todo absorvido. Bateu-se 4 vezes em papel absorvente e em seguida fez-se lavagem do excesso das amostras não capturadas com tampão de lavagem, fazendo-se 3 ciclos de lavagem em forma de serpentina. Retirou-se o excesso de tampão de lavagem batendo firmemente 4 vezes em papel absorvente.

- Fase de amplificação do sinal - Pipetaram-se 75 µL de Reagente 2 (substrato quimioluminescente), cobriu-se com película aderente e incubou-se 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se a película aderente, colocou-se a microplaca no luminómetro e procedeu-se à leitura dos RLUs. No final de cada ensaio foi feita automaticamente a média dos RLUs dos controlos positivos e negativos, dando o respectivo *cutoff*, validando o ensaio.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

O Laboratório de Anatomia Patológica J. A. Macedo Dias, S.A. no Porto, no ano de 2007 analisou 14.938 exames de citologias em meio líquido. Cerca de 30% desses exames, ou seja 4.486, foram encaminhados para realização de teste de HPV pelo método de captura híbrida.

Neste trabalho, começou-se por detectar a presença de HPV de alto risco (tipos 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) em amostras de 3.262 mulheres com citologias NILM, de acordo com o Sistema de *Bethesda*. Os 3.262 diagnósticos foram agrupados de acordo com o diagnóstico específico de negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna:

- NILM sem alterações
- Processo inflamatório inespecífico
- Presença de microrganismos:
 - Vaginose bacteriana
 - *Candida* spp
 - *Actinomyces* spp
 - *Trichomonas vaginalis*

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das citologias NILM com resultado positivo para a captura híbrida. Dos 2.192 casos NILM sem alterações, 267 (12,2%) foram positivos para o HPV. Relativamente aos processos inflamatórios inespecíficos (n= 759) 20,7% (157 casos) foram positivos para captura híbrida de DNA de HPV. Dos casos de infecção por microrganismos, 11,5% (55 casos) foram positivos para captura híbrida de HPV: 13,9% (25 casos) apresentavam vaginose; 21,4% (18 casos) infecção por *Candida* spp; 7,4% (2 casos) infecção por *Actinomyces* spp e 50% (10 casos) infecção por *Trichomonas vaginalis*.

A prevalência das citologias NILM com HC2 positivo foi de 14,7%.

Tabela 2: Resultados de diagnóstico citológico NILM com resultado de captura híbrida positivos.

Tipo de diagnóstico associado ao NILM	Nº	Nº HC2 Positivos	Frequência HC2 Positivos(%)	
NILM sem alterações	2.192	267	12,2	
Processo inflamatório inespecífico	759	157	20,7	
Presença de Microrganismos	Vaginose bacteriana	180	25	13,9
	Candida spp	84	18	21,4
	Actinomyces spp	27	2	7,4
	Trichomonas vaginalis	20	10	50,0
Total	3.262	479		

NILM – Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna

HC2 – Captura híbrida 2

Do total de casos com resultado positivo para captura híbrida (Tabela 3) 55,7% dos casos foram classificados como NILM sem alterações, 32,8% apresentavam processos inflamatórios inespecíficos, 11,5% apresentavam infecções por microrganismos: 5,2% casos de vaginose bacteriana, 3,8% casos de infecção por *Candida spp*, 0,4% casos de infecção por *Actinomyces spp* e 2,1% casos de infecção por *Trichomonas vaginalis*.

Para os casos de captura híbrida negativos (n=2.783), 1925 (69,2%) casos eram NILM sem alterações, 602 (21,6%) apresentavam processo inflamatório inespecífico, 256 infecções por microrganismos: 155 (5,6%) vaginose bacteriana, 66 (2,4%) *Candida* spp, 25 (0,9%) *Actinomyces* spp e 10 (0,4%) casos de infecção por *Trichomonas vaginalis*.

Tabela 3: Distribuição dos casos de captura híbrida positivos e negativos de acordo com o diagnóstico citológico.

Tipo de diagnóstico associado ao NILM	n HC2 Positivos	Frequência (%)	n HC2 Negativos	Frequência (%)
NILM sem alterações	267	55,7	1.925	69,17
Processo inflamatório inespecífico	157	32,8	602	21,63
Presença de Microrganismos				
Vaginose bacteriana	25	5,2	155	5,57
<i>Candida</i> spp	18	3,8	66	2,37
<i>Actinomyces</i> spp	2	0,4	25	0,90
<i>Trichomonas vaginalis</i>	10	2,1	10	0,36
Total	479	100	2.783	100

NILM – Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna

HC2 – Captura híbrida 2

A tabela 4 refere-se à distribuição dos casos de captura híbrida positivos relacionados com a carga viral de alto risco, relativos ao 1º trimestre de 2007.

Baseado no artigo científico de 2006 “Determination of HPV DNA viral load by hybrid capture assay and its association with cytological findings” da autoria de Tozetti e colaboradores [56], os valores da carga viral foram agrupados nos intervalos de 1 a <10 RLU/CO, 10 a <100 RLU/CO, 100 a <1.000 RLU/CO e ≥ 1.000 RLU/CO, sendo RLU/CO o valor da carga viral.

O maior número de resultados com RLU de 1 a <10 foi obtido nas citologias NILM sem alterações, seguido do processo inflamatório inespecífico (16 casos), presença de infecção por *Candida spp* (9 casos), vaginose bacteriana (5 casos) e presença de infecção por *Actinomyces spp* e *Trichomonas vaginalis* (1 caso cada).

No intervalo de 10 a <100 RLU/CO obtivemos 25 casos de NILM sem alterações, 9 casos de processo inflamatório inespecífico, 1 caso de vaginose bacteriana, presença de infecção por *Actinomyces spp* e infecção por *Trichomonas vaginalis*. No intervalo de 100 a <1.000 RLU/CO obtivemos um total de 13 casos, sendo o maior número obtido em casos NILM sem alterações (9 casos).

Em relação ao intervalo em que o RLU é ≥ 1.000 RLU/CO, obtivemos 4 casos de NILM sem alterações, 1 caso de vaginose bacteriana e 2 casos de presença de infecção por *Trichomonas vaginalis*.

Tabela 4: Distribuição dos casos de captura híbrida positivos relacionados com a carga viral de alto risco relativos ao 1º trimestre de 2007.

Tipo de diagnóstico associado ao NILM	Carga viral de alto risco				Total	
	1 a <10 RLU/CO	10 a < 100 RLU/CO	100 a < 1.000 RLU/CO	≥ 1.000 RLU/CO		
NILM sem alterações	51	25	9	4	89	
Processo inflamatório inespecífico	16	9	2	0	27	
Presença de Microrganismos	Vaginose bacteriana	5	1	0	1	7
	Candida spp	9	0	2	0	11
	Actinomyces spp	1	1	0	0	2
	Trichomonas vaginalis	1	1	0	2	4
Total	83	37	13	7	140	

NILM – Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna

RLU/CO – Valor da carga viral

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A ligação causal entre a infecção pelo vírus do papiloma humano e o cancro do colo do útero foi demonstrada no início dos anos 80 por um virologista alemão de nome Harald zur Hausen [9].

O estudo epidemiológico da infecção pelo HPV durante os últimos 15 anos centrou-se na demonstração de que a infecção pelo HPV é causa necessária mas não suficiente do cancro do colo do útero [5] e como tal, o vírus é abordado principalmente como um intermediário na carcinogénese do cancro do colo do útero. A compreensão do HPV como um factor etiológico para vários cancros, tais como o cancro do colo do útero ou outros cancros anogenitais levou à tipagem do DNA de HPV e diagnóstico de doenças associadas ao HPV. Este conhecimento facilitou também o desenvolvimento de vacinas preventivas e terapêuticas de HPV, bem como outras intervenções terapêuticas [24].

Relativamente aos métodos de diagnóstico, o método de Papanicolaou é o método de rastreio por excelência [16], contribuindo para a redução da incidência de cancro do colo do útero [34]. De entre os métodos moleculares de detecção de HPV, a captura híbrida de DNA de HPV revelou-se um método confiável, preciso e reprodutível na detecção de HPV oncogénico. O uso de testes de diagnóstico para DNA de HPV em combinação com a citologia tem sido recomendada por alguns autores porque aumenta o desempenho de ambos os testes [52,56]. A detecção do HPV está reconhecida como instrumento útil para a diminuição da incidência e mortalidade do cancro do colo do útero. Numerosos grupos avaliam a possibilidade de se usar técnicas de biologia molecular distintas para a detecção de HPV como ferramenta de rastreio primário do cancro do colo do útero e para seguimento de doentes com ASC-US e com lesões intraepiteliais de baixo grau.

A detecção de DNA de HPV é relevante no rastreio de pacientes com citologias normais porque se forem detectados tipos de HPV de alto risco pode haver uma maior probabilidade de um paciente desenvolver cancro do colo do útero no futuro. Neste estudo, a prevalência de citologias NILM com captura híbrida positiva foi de 14,7%, ou seja, em 3262 casos NILM, 479 foram positivos para captura híbrida. Isto indica que apesar da citologia ser negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna, há infecção pelo HPV, que pode não ser eliminado pelo sistema imunitário, podendo evoluir para lesão intraepitelial “oculta” uma vez que a citologia pode não apresentar alterações

citológicas. A prevalência de casos HPV positivos em citologias NILM foi semelhante à encontrada noutro estudo já publicado [47].

A maior causa de falsos negativos para HPV nas citologias usadas neste estudo está associada a citologias NILM sem alterações seguida das citologias de processos inflamatórios inespecíficos e das citologias com presença de microrganismos. Dos 479 casos positivos na captura híbrida de citologias normais, 55,7% eram NILM sem alterações, 32,8% tinham processo inflamatório inespecífico e 11,5% tinham infecção por bactérias, fungos e protozoários.

A elevada percentagem de falsos negativos em citologias normais sugere que numa fase inicial da doença, os vírus não provocam lesões ou estas não são visíveis por microscopia ou então a carga viral pode ainda não ser suficiente para provocar alterações celulares. Realmente, a detecção de vírus de alto risco em citologias NILM é menos frequente quando a carga viral é mais baixa (1 a <10 RLU/CO) para todos os tipos de diagnóstico associados ao NILM.

Este facto vem confirmar que a vigilância do HPV deve ser regular e que a captura híbrida pode ser muito útil no rastreio do cancro do colo do útero. Os falsos negativos nas citologias dos processos inflamatórios inespecíficos indicam que as alterações reactivas que ocorrem nestes processos podem obscurecer a leitura da citologia. A presença de cerca de 12% de falsos negativos em citologias positivas para a presença de outros microrganismos, nomeadamente protozoários, alguns dos quais transmitidas por via sexual, caso de *Trichomonas vaginalis*, sugere que quando há infecção por estes agentes se pesquise o HPV. A associação entre a presença de HPV e a presença de outros microrganismos tem sido detectada noutros estudos, nomeadamente quando ocorre infecção por *Trichomonas vaginalis* [28,30,36,61]. A infecção por estes microrganismos pode mascarar as lesões provocadas pelo HPV e, por outro lado, pode influenciar o diagnóstico do técnico e médico, pois este ao detectar um microrganismo, pode associar as lesões à sua presença, pondo de parte a hipótese da presença de infecção viral pelo HPV, a não ser que as alterações provocadas pelo vírus sejam evidentes como é o caso da colicitose, alteração patognomónica do HPV.

Convém referir, contudo, que mesmo a captura híbrida pode originar falsos negativos. Neste caso a presença de falsos negativos pode estar relacionada com o facto do material para análise por captura híbrida poder não conter DNA suficiente para ser analisado. Relativamente aos falsos positivos, a probabilidade de ocorrência é mínima,

devendo-se principalmente a contaminação da amostra por outra, contaminação por fosfatase alcalina exógena presente no manuseamento sem luvas, pelo que se deve usar luvas sem pó de talco, sendo falsos positivos por reacções cruzadas com outros microrganismos pouco prováveis, segundo estudos da própria *Digene*[®].

Tal como os estudos moleculares, os estudos epidemiológicos das infecções pelo HPV e das neoplasias do colo do útero têm fornecido muitas das bases do conhecimento actual. Dos estudos epidemiológicos realizados até hoje, tem sido observado que há vários factores de risco associados à infecção pelo HPV, nomeadamente a idade, o método contraceptivo usado, antecedentes patológicos, entre outros. Assim sendo, estas informações são relevantes para o diagnóstico do cancro do colo do útero pelo que devem ser mencionadas, juntamente com outras informações clínicas relevantes, na requisição de pedido do exame. Nos pedidos de exame do teste de Papanicolaou feitos ao Laboratório de Anatomia Patológica J. A. Macedo Dias no Porto, além do nome e sexo, em muitos exames não foram fornecidas outras informações sobre as pacientes, o que dificultou a interpretação dos resultados e, conseqüentemente, o estudo epidemiológico. Teria sido interessante relacionar os resultados das citologias e dos testes de captura híbrida com a idade das pacientes e com outros factores que controlam a incidência do HPV. No entanto, os dados deste trabalho sobre a detecção e prevalência de DNA de HPV em pacientes com citologias NILM, contribui para aumentar o conhecimento da epidemiologia do HPV, e pode fornecer informações acerca da importância do teste de DNA de HPV. É também relevante saber que estas pacientes, apesar de terem citologia negativa para lesões intraepiteliais e neoplasia maligna, e por terem captura híbrida positiva para DNA de HPV, têm um risco aumentado de desenvolver cancro do colo do útero. A presença de marcadores de HPV de alto risco não deve, por si só, ser motivo para alarme, mas antes deverá levar à instigação de uma cuidadosa investigação clínica e repetido teste de HPV para ver a sua persistência, o que constitui um factor de risco significativo para o desenvolvimento de lesões proliferativas e para a sua progressão. Se os métodos baseados em PCR podem ser usados para detectar o tipo específico de HPV em citologias positivas, o método de captura híbrida pode ser usado para confirmar os resultados das citologias normais.

A quantificação da carga viral principalmente para os tipos de HPV de alto risco oncogénico pode ser uma ferramenta útil para o acompanhamento de pacientes com lesões suspeitas [24,56], visto que alguns estudos confirmaram que a carga viral elevada

dos tipos de HPV de alto risco oncogénico poderá ser usada como marcador de progressão de lesões pré-cancerígenas, tendo o índice de valores de carga viral medido pelos RLUs sido proposto para estimar a progressão da doença [56].

Os resultados deste estudo confirmam que a quantificação da carga viral é um bom marcador para avaliar a progressão da doença.

A maior incidência de resultados positivos por captura híbrida em citologias NILM, neste estudo, foi observada para o intervalo com RLU entre 1 <10 em citologias NILM sem alterações o que sugere que estes casos podem corresponder àqueles que regridem naturalmente. Contudo, como já foi referido, estes casos podem corresponder a uma fase inicial da doença pelo que devem ser seguidos por citologia.

Por outro lado, verificou-se que com o aumento da carga viral o risco do HPV não ser detectado no exame citológico diminui.

Os resultados da carga viral neste estudo, confirmam também que as infecções por *Trichomonas vaginalis* estão muito ligadas à infecção por HPV. No intervalo de carga viral ≥ 1.000 RLU/CO foi observado o maior número de infecção por *Trichomonas vaginalis*.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A infecção por tipos de HPV de alto risco está directamente relacionada com o desenvolvimento de cancro do colo do útero [21]. Os estudos epidemiológicos que levaram à associação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de cancro do colo do útero contribuíram para uma melhor percepção do processo oncogénico, melhores programas de rastreio e a expansão de estratégias de prevenção através da vacinação.

A implementação de novas técnicas de detecção do HPV, caso da captura híbrida, pode também melhorar o rastreio do cancro do colo do útero. Os resultados deste estudo mostraram que a prevalência de citologias NILM com captura híbrida positiva foi elevada, cerca de 15%.

A determinação da carga viral através desta técnica permite ainda identificar melhor doentes com risco aumentado de desenvolver lesões graves. Embora seja uma técnica cara, a captura híbrida se aplicada estrategicamente pode ser vantajosa em termos de custo-benefício.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Aedo, S., Melo, A., Garcia, P., Guzmán, P., Capurro, I. and Roa, J.C. (2007) Detección y tipificación de vírus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Revista Médica de Chile*. **135**: 167-173.
2. Albring, L., Brentano, J.E. e Vargas, V.R.A. (2006) O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. **38**: 87-90.
3. Arora, R., Kumar, A., Prusty, B.K., Kailash, U., Batra, S. and Das, B.C. (2005) Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types 16 and 18 in healthy women with cytologically negative Pap smear. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **121**: 104–109.
4. Ault, K.A. (2006) Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Hindawi Publishing Corporation Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. **2006**: 1-5.
5. Bosch, F.X. (2003) Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Pública de México*. **45**: 326-339.
6. Bosch, F.X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C.J.L.M. and Shah, K.V. (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. **55**: 244-265.
7. Bosch, F.X., Manos, M.M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K.V. (1995) Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *Journal of the National Cancer Institute*. **87**: 796-802.

8. Brinton, L.A., Schairer, C., Haenszel, W., Stolly, P., Lehman, H.F., Levine, R. and Savitz, D.A. (1986) Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *Journal of the American Medical Association*. **255**: 3265-3269.
9. Burd, E.M. (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**: 1-17.
10. Cañadas, M.P., Lloveras, B., Lorincz, A., Ejarque, M., Font, R., Bosch, X. and Sanjosé, S. (2006) Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Publica de México*. **48**: 373-378.
11. Capra, G., Giovannelli, L., Bellavia, C., Migliore, M.C., Caleca, M.P., Perino, A. and Ammatuna, P. (2008) HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. *Virus Research*. **133**: 195–200.
12. Carvalho, M.O.O., Almeida, R.W., Leite, Fátima, M.S., Fellows, I.B., Teixeira, M.H., Oliveira, L.H.S. and Cavalcanti, S.M.B. (2003) Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture Assay. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **7**: 121-125.
13. Clifford, G.M., Gallus, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P.J.F., Vaccarella, S., Anh, P.T.H., Ferreccio, C., Hieu, N.T., Matos, E., Molano, M., Rajkumar, R., Ronco, G., Sanjosé, S., Shin, H.R., Sukvirach, S., Thomas J.O., Tunsakul, S., Meijer, C.J.L.M., Franceschi, S. and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2005) Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled Analysis. *The Lancet*. **366**: 991-998.
14. Comissão Técnica de Vacinação – Direcção *Geral de Saúde* (2008) Vacinação contra infecções por Vírus do Papiloma Humano (HPV). Lisboa.
15. Cox, J.T. (1995) Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. **9**: 1-37.

16. Dores, G.B., Taromaru, E.K., Bonomi, C.G., Filho, A.L., Gilli, N.P., Matsubara, S. and Focchi, J. (2005) Determinação da Infecção do Papilomavírus humano por Captura Híbrida II: Correlação com achados morfológicos. *DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. **17**: 255-258.
17. Flores, Y., Bishai, D., Lazcano, E., Shah, K., Lörintz, A., Hernández, M. and Salmerón, J. (2003) Improving cervical cancer screening in Mexico: Results from the Morelos HPV Study. *Salud Publica de México*. **45**: 388-398.
18. Flores, Y.N., Bishai, D.M., Shah, K.V., Lazcano-Ponce, E., Lörintz, A., Hernández, M., Ferris, D. and Salmerón, J. (2008) Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in México. *Salud Pública de México*. **50**: 49-58.
19. Gram, I.T., Macaluso, M., Churchill, J. and Stalsberg, H. (1992) Trichomonas vaginalis (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes & Control*. **3**: 231-236.
20. Hausen, H. (1996) Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1288**: [8]5-[21]8.
21. Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: From Basic studies to clinical application. *Nature Publishing Group*. **2**: 342-350.
22. Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M.E., Hutchinson, M., Morales, J., Balmaceda, I., Greenberg, M.D., Alfaro, M., Burk, R.D., Wacholder, S., Plummer, M. and Schiffman, M. (2000) Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia in Rural Costa Rica. *Journal of the National Cancer Institute*. **92**: 464-474.
23. Ho, G.Y.F., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J. and Burk, R.D. (2008) Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection In Young Women. *The New England Journal of Medicine*. **338**: 423-428.

24. Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P. and Wu, T.-C. (2008) Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. *Journal of the Formosan Medical Association*. **107**: 198-217.
25. Hubbard, R.A. (2003) Human Papillomavirus Testing Methods. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. **127**: 940-945.
26. Jung, W., Chun, Taehoon, C., Sul, D., Hwang, K.W., Kang, H., Lee, D.J. and Han, I. (2004) Strategies Against Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *The Journal of Microbiology*. **42**: 255-266.
27. Júnior, J.E., Giraldo, P.C., Cavalcante, D.I.M., Gonçalves, A.K. e Eleutério, R.M.N. (2007) Associação entre a carga viral de HPV de alto risco, expressão de P16^{INK4A} e lesões intra-epiteliais escamosas do colo uterino. *Revista da Associação Médica Brasileira*. **53**: 530-535.
28. Kanno, M.B., Nguyen, R.H., Lee, E.M., Zenilman, J.M. and Erbeling, E.J. (2005) The prevalence of abnormal cervical cytology in a sexually transmitted diseases clinic. *International Journal of STD & AIDS*. **16**: 549-552.
29. Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M, Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G. and Schiffman, M. (2005) The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *Journal of the National Cancer Institute*. **97**: 1072-1079.
30. Kharsany, A.B.M., Hoose, A.A., Moodley, J., Bagaratee, J and Gouws, E. (1993) The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Medical*. **69**: 357-360.
31. Koutsky, L.A. and Baseman, J.G. (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*. **32S**: S16-S24.
32. Liaw, K., Glass, A.G., Manos, M.M., Greer, C.E., Scott, D.R., Sherman, M., Burk, R.D., Kurman, R.J., Wacholder, S., Rush, B.B., Cadell, D.M., Lawler, P., Tabor, D.

- and Schiffman, M. (1999) Detection of Human Papillomavirus DNA in Cytologically Normal Women and Subsequent Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *Journal of the National Cancer Institute*. **91**: 954-960.
33. Longworth, M.S. and Laimins, L.A. (2004) Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 362–372.
34. Lowy, D.R., Kirnbauer, R. and Schiller, J.T. (1994) Genital human papillomavirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **91**: 2436-2440.
35. Maciag, P.C. e Villa, L.L. (1999) Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **32**: 915-922.
36. Madhu, J., Charu, G. and Mohan, K. (2004) Sexually Transmitted Diseases and Carcinogenesis. *Journal of Obstetrics and Gynecology*. **54**: 73-76.
37. Molano, M., Posso, H., Weiderpass, E., Van den Brule, A.J.C., Ronderos, M., Franceschi, S., Meijer, C.J.L.M., Arslan, A., Munoz, N. and the HPV Study Group (2002) Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *British Journal of Cancer*. **87**: 324-333.
38. Muñoz, N., Bosch, X., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F. and Meijer, C.J.L.M. (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*. **348**: 518-527.
39. Neto, A.A. (1991) Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. *Revista de Saúde Pública*. **25**: 326-333.
40. Nonnenmacher, B., Breitenbach, V., Villa, L.L., Prolla, J.C. e Bozzetti, M.C. (2002). Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Revista de Saúde Pública*. **36**: 95-100.

41. Noronha, V., Mello, W., Villa, L., Brito, A., Macêdo, R., Bisi, F., Mota, R., Sassamoto, K., Monteiro, T. e Linhares, A. (1999) Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **32**: 235-240.
42. Paul, C., Skegg, D.C.G and Corwin, P.A. (1982) Importance of the male factor in cancer of the cervix. *The Lancet*. **1**: 581-583.
43. Queiroz, D.T., Pessoa, S.M.F. e Sousa, R.A. (2005) Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV): Incertezas e desafios. *Acta Paulista de Enfermagem*. **18**: 190-196.
44. Rama, C.H., Roteli-Martins, C.M., Derchain, S.F.M., Longatto-Filho, A., Gontijo, R.C., Sarian, L.O.Z., Syrjänen, K. e Aldrighi, J.M. (2008) Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Revista de Saúde Pública*. **42**: 123-130.
45. Rawls, W.E., Lavery, C., Marrett, L.D., Clarke, E.A., Adam, E., Melnick, J.L., Best, J.M., Kraiselburd, E., Benedet, L.J. and Brenes, M.M. (1986) Comparison of risk factors for cervical cancer in different populations. *International Journal of Cancer*. **37**: 537-546.
46. Rivoire, W.A., Corleta, H.V.E., Brum, I.S. e Capp, E. (2006) Biologia molecular do câncer cervical. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. **6**: 447-451.
47. Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N. and Bosch, F.X. (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. **7**: 453–459.
48. Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Hoover, R.N., Glass, A.G., Cadell, D.M., Rush, B.B., Scott, D.R., Sherman, M.E., Kurman, R.J., Wacholder, S. Stanton, C.K. and Manos, M.M. (1993) Epidemiologic Evidence Showing That Human Papillomavirus Infection Causes Most Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. **85**: 958-964.

49. Serman, F. (2002) Cancer Cervicouterino: Epidemiologia, Historia natural y rol del Vírus Papiloma Humano. Perspectivas en Prevencion y Traramiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecoogía*. **67**: 318-323.
50. Serrano, R.O., Pérez, C.J.U., Martínez, L.A.D., and Romero, Y.R.D. (2004) Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia*. **55**: 146-160.
51. Sherris, J., Herdman, C. and Elias, C. (2001) Cervical cancer in the developing world. *The Western Journal of Medicine*. **175**: 231-233.
52. Silva, F.N., Silva, K.C., Dimetz, T., Oliveira, L.H.S. and Cavalcanti, S.M.B. (2006) Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Genital Tract Determined by Hybrid Capture Assay. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **10**: 331-336.
53. Souto, R., Falhari, J.P.B. and Cruz, A.P.D. (2005) O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **51**: 155-160.
54. Steben, M. and Duarte-Franco, E. (2007) Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*. **107**: 2-5.
55. Torroella-Kouri, M., Morsberger, S., Carrillo, A., Mohar, A., Meneses, A., Ibarra, M., Daniel, R.W., Ghaffari, A.M., Solorza, G. and Shah, K.V. (1997) HPV Prevalence among Mexican Women with Neoplastic and Normal Cervixes. *Gynecologic Oncology*. **70**: 115–120.
56. Tozetti, I.A., Scapulatempo, I.D.L., Levi, J.E. and Ferreira, A.W. (2006) Determination of HPV DNA viral load by hybrid capture assay and its association with cytological findings. *Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **42**: 449-453.
57. Trottier, H. and Franco, E.L. (2006) The epidemiology of genital human pepillomavirus infection. *Vaccine*. **24S1**: S1/4-S1/15.

58. Viikki, M., Pukkala, E. and Hakama, M. (1999) Risk of cervical cancer after a negative Pap smear. *Journal of Medical Screening*. **6**: 103-107.
59. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Portugal. 2007. Disponível em www.who.int/hpvcentre. Acedido em 30/11/2008.
60. Winer, R.L., Lee, S.K., Hughes, J.P., Adam, D.E., Kiviat, N.B. and Koutsky, L.A. (2003) Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *American Journal of Epidemiology*. **157**: 218–226.
61. Zhang, Z.F. and Begg, C.B. (1994) Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology*. **23**: 682-690.