



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE/DEPMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL
MESTRADO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

Análise de Micronúcleos em Células Esfoliadas do Colo Uterino de Mulheres Portadoras de DST's e outros Fatores de Risco para o Desenvolvimento- de Câncer Cervical

FABIO GABRIEL DA SILVA

**PORTO VELHO/RO
2010**

FABIO GABRIEL DA SILVA

Análise de Micronúcleos em Células Esfoliadas do Colo Uterino de Mulheres Portadoras de DST's e outros de Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Câncer Cervical.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia – UNIR - NUSAU, para obtenção do título de mestre em biologia.

Área de concentração: Citogenética

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Luz Dias

**PORTO VELHO/RO
2010**

Análise de Micronúcleos em Células Esfoliadas do Colo Uterino de Mulheres Portadoras de DST's e outros Fatores de Risco para o Desenvolvimento de Câncer Cervical.

FABIO GABRIEL DA SILVA

BANCA EXAMINADORA

Dra. Francisca da Luz Dias

Dra. Maria Manuela Fonseca Moura

Dr. Cleberson de Freitas Fernandes

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em ____/____/____.

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Midian Rosa, que foi pai e mãe de nossas filhas na minha ausência. Mulher forte e muito importante na minha vida, responsável pela realização deste sonho. As minhas filhas Emilly e Elyse, pelas lágrimas que muitas vezes deixei de enxugar.

Com todo meu amor...

A minha mãe (Tânia Amélia) e a minha avó (Amélia Ana), por me ensinarem que o estudo e o conhecimento são as maiores riquezas de um homem. Por acreditarem em mim de forma incondicional. Amo-as com toda força do meu ser.

A minha orientadora que foi a peça fundamental na realização deste sonho.
Obrigadooo!

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por ser o autor e consumidor da minha fé.

À minha queridíssima orientadora professora Dra. Francisca da Luz Dias, por ter acreditado em mim, e por juntos termos sofrido no período das coletas. Obrigado pela oportunidade, confiança, amizade, cumplicidade, incentivos e cuidados. A senhora foi um presente de Deus em minha vida. Minha eterna gratidão.

A professora Dra. Maria Manuela por ter aberto as portas do CIBEBI, e pelas sugestões pertinentes ao meu trabalho, obrigado.

Ao amigo Cruz por estar sempre disponível a me levar na rodoviária sempre que precisei, sei que te devo uma página de agradecimentos.

A diretora da IEE Paulo Saldanha, professora Lindauria Barroso, por ter me liberado para fazer as disciplinas do mestrado, meu muito obrigado.

Ao casal Marines e Jorge Flaris, por terem me acolhido em sua casa, muito obrigado.

A minha Sogra Eliane Rosa, por estar conosco aqui em Rondônia, nos ajudando com a educação das minhas filhas, obrigado.

Ao doutorando Jéferson Castro pela ajuda constante, obrigado.

A dona Terezinha, que tem sido uma mãe pra mim, meus sinceros agradecimentos.

As alunas do curso de Biomedicina da FIMCA (Géssica, Fabiane e Gisa), vocês foram essenciais na contagem dos micronúcleos, minha eterna gratidão.

À todos os professores da Pós-graduação/UNIR que colaboraram na minha formação, meus agradecimentos.

Aos meus colegas de turma, em especial a Elis Paula uma irmã que eu escolhi pra minha vida, Alexandre Godoy outro amigo que se tornou um irmãozão e a Sônia Lima amiga incondicional que guardarei no lado esquerdo do peito, amo vocês.

As Faculdades Integradas Aparício Carvalho-FIMCA, pelo apoio e pela disponibilidade do laboratório e dos reagentes para realização da parte experimental do trabalho.

Ao Giovanni, secretário do curso de Pós-graduação, sempre amigo e prestativo, valeu.

A coordenação da PGBIOEXP/UNIR pelo apoio e oportunidade de desenvolver este trabalho, obrigado.

Aos profissionais de saúde que me ajudaram na coleta do material, em particular a Dra. Sandra Inês e a Enfermeira Ester, do posto de Saúde Areal da Floresta, meu muito obrigado.

A todas as mulheres que participaram deste trabalho, autorizando a coleta do seu material para a realização das minhas análises, lhe sou grato para sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	13
1 – INTRODUÇÃO	16
1.1 – Técnica de Micronúcleos	17
1.2 – Micronúcleo como Biomarcador	18
2 – HPV	20
2.1 – Ciclo da Infecção do HPV na Célula	21
2.2 – Relação do HPV com o Câncer de Colo Uterino	22
2.3 – Tipos de HPV	24
2.4 – Método de Prevenção (Vacinas)	25
2.5 – EPIDEMIOLOGIA	25
2.6 – Caracterização das Neoplasias Intra-Epiteliais Cervicais (NICs)	26
2.7 – Caracterização das Anormalidade das Células Escamosas Uterinas	28
2.8 – Suscetibilidade Gênica	30
3 – FATORES ASSOCIADOS À ONCOGÊNESE CERVICAL	31
3.1 – Multiplicidade de Parceiros Sexuais (Promiscuidade)	32
3.2 – Vida Sexual Precoce	32
3.3 – Uso de Anticoncepcional Oral (uso hormonal)	32
3.4 – Tabaco	33
3.5 – Uso de bebidas alcoólicas	34
3.6 – Vaginose Bacteriana	34
4 – OBJETIVOS	39
4.1 – Geral	39
4.2 – Específicos	39
5 – METODOLOGIA	40

5.1 - Seleção da amostra	40
5.2 - Coleta das células	41
5.3 – Material	41
5.4 - Técnica de micronúcleo (STICH et al.,1982)	41
5.5 – Análise dos Micronúcleos (MNs)	42
5.6 – Análise Estatística:	42
6 – RESULTADOS	43
7 – DISCUSSÃO	53
8 – CONCLUSÃO	58
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	72

LISTA DE TABELAS

- TABELA 01-CARACTERIZAÇÃO DAS ANORMALIDADES DAS CÉLULAS ESCAMOSAS EPITELIAIS ATRAVÉS DO SISTEMA BETHESDA. _____ 28**
- TABELA 02- INICIO DA VIDA SEXUAL DAS MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO, FREQUÊNCIA E PERCENTUAL _____ 41**
- TABELA 03. FREQUÊNCIA DE MULHERES FUMANTES, MULHERES COM CÔNJUGES FUMANTES E MULHERES NÃO FUMANTES PARTICIPANTES DO ESTUDO. _____ 42**
- TABELA 04. FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM MULHERES FUMANTES, MULHERES COM CÔNJUGES FUMANTES E MULHERES NÃO FUMANTES PARTICIPANTES DO ESTUDO. _____ 43**
- TABELA 05. NÚMERO, MÉDIA TOTAL DE MN, DESVIO PADRÃO E VALOR DE “P” DOS CONTROLES E FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL _____ 45**
- TABELA 06. NÚMERO, MÉDIA TOTAL DE CÉLULAS COM MN, DESVIO PADRÃO E VALOR DE “P” DOS CONTROLES E FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL _____ 48**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CERVIX NORMAL	29
FIGURA 2. DISPLASIA LEVE	29
FIGURA 3. DISPLASIA MODERADA	29
FIGURA 4. DISPLASIA SEVERA	30
FIGURA 5. CÂNCER INVASIVO	30
FIGURA 6. HISTOGRAMA IDADE DE INICIO DA VIDA SEXUAL DAS MULHERES PARTICIPANTES DO ESTUDO	42
FIGURA 7. FREQUÊNCIA DE MULHERES FUMANTES, MULHERES NÃO FUMANTES E MULHERES COM CÔNJUGES FUMANTES PARTICIPANTES DO ESTUDO.	43
FIGURA 8. FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM MULHERES FUMANTES, MULHERES NÃO FUMANTES E MULHERES COM CÔNJUGES FUMANTES PARTICIPANTES DO ESTUDO.	44
FIGURA 9. MÉDIAS DOS FATORES QUE PREDISPÕE O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO PARTICIPANTES DO ESTUDO.	45
FIGURA 10. CÉLULA ESFOLIADA CERVICAL CONTENDO 2 MICRONÚCLEOS.	47
FIGURA 11. Nº TOTAL DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS EM RELAÇÃO ÀS MULHERES SEM FATORES DE RISCO COM AS MULHERES QUE APRESENTAM FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER CERVICAL.	48
FIGURA 12. FREQUÊNCIA DE MN DOS GRUPOS DE MULHERES SOB FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER CERVICAL EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE.	49
FIGURA 13. FREQUÊNCIA DE MN DOS GRUPOS DE MULHERES SOB FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER CERVICAL EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AO – Anticoncepcional Oral
BPV – *Papillomavirus* bovine
CA – Câncer
CVV – Candidiase vulvovaginal
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DSTs – Doenças Sexualmente Transmissíveis
DP – Desvio Padrão
E6 – Oncoproteína do HPV
E7 – Oncoproteína do HPV
HLA – Human Lymphocytes Alelo
HPV – Papiloma Vírus Humano
HSIL – Lesão Intraepitelial
IARC– Agência Internacional de Rastreamento do Câncer
INCA – Instituto Nacional de Câncer
MN – Micronúcleos
NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS – Organização Mundial da Saúde

RESUMO

O câncer cervical é o segundo mais comum entre mulheres no mundo e a cada ano são registrados novos casos. O papiloma vírus humano (HPV) apresenta um papel central na carcinogênese do colo uterino e vários fatores a ele associados, como as DSTs. Esses fatores podem interagir com as oncoproteínas e outros elementos do HPV, potencializando sua ação na célula hospedeira e facilitando o desenvolvimento do processo de imortalização celular e carcinogênese. Os micronúcleos são estruturas formadas por fragmentos ou cromossomos inteiros resultantes da ação de fatores que podem danificar o material genético. Assim, o teste de micronúcleo (MN) é uma técnica fácil e rápida que pode ser usada para fazer o diagnóstico precoce do câncer antes da instalação dos sintomas.

OBJETIVOS: O objetivo deste trabalho foi analisar e quantificar a frequência de micronúcleos no material proveniente das células da mucosa cervical de pacientes submetidas ao exame citopatológico. Foram analisadas 112 com idades variando entre 15 a 69 anos mulheres submetidas ao exame citopatológico em diferentes Postos de Saúde da cidade de Porto Velho-RO. **Resultados:** Os resultados obtidos mostraram que a frequência de micronúcleos nas células esfoliadas cervicais das mulheres com lesões na cérvix causadas por HPV foi de 19,58% e quando comparada ao controle a diferença foi estatisticamente significativa $p=0,0002$, Kruskal-Wallis. A análise de micronúcleo nos casos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) quando comparada ao controle apresentou $p=0,0035 < p=0,05$, o que caracteriza que este fator está atuando de forma positiva na indução de MN. Os outros fatores estudados não tiveram ação significativa na indução de MN quando comparadas aos controles. **CONCLUSÃO:** Concluímos que a infecção por HPV e a infecção por NIC I tiveram ação na quebra da molécula do DNA evidenciado pelo aumento na frequência de micronúcleos em relação aos controles, o que pode demonstrar uma ação crucial desses fatores na transformação das células neoplásicas que caracterizam o câncer uterino. Os outros fatores analisados (uso de anticoncepcional oral, etilismo e o aumento no número de gestações, tabagismo, cocos, bacilos e multiplicidade de parceiros), quebraram o DNA, induzindo a formação de micronúcleos, mas não obtiveram resultados estatisticamente significante.

Palavra-chave: Micronúcleos, câncer cervical, HPV, carcinogênese

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common among women worldwide and each year new cases are registered. The human papilloma virus (HPV) has a central role in cervical carcinogenesis and various factors associated with it, such as DSTs. These factors may interact with the oncoproteins of HPV and other elements, enhancing its action in the host cell and facilitating the development process and immortalize cell carcinogenesis. Micronuclei are structures formed by fragments or whole chromosomes resulting from the action of factors that can damage the genetic material. Thus, the micronucleus (MN) is an easy and fast technique that can be used to make early diagnosis of cancer before the onset of symptoms.

OBJECTIVES: The aim of this study was to analyze and quantify the frequency of micronuclei in the material from the cervical mucosa cells of patients under examination cytopathology. We analyzed 112 aged 15 to 69 years women undergoing cervical cancer screening in different health units in the city of Porto Velho-RO. **Results:** The results showed that the frequency of micronuclei in exfoliated cells of women with cervical lesions in the cervix caused by HPV was 19.58% compared to the control and the difference was statistically significant ($p = 0.0002$, Kruskal-Wallis). The analysis of micronuclei in cases of cervical neoplasia intraepithelial (NIC) compared to control with $p = 0.0035 < p = 0.05$, which indicates that this factor is acting positively in the induction of MN. The other factors studied had no significant action on the induction of MN when compared to controls. **CONCLUSION:** We conclude that infection with HPV infection and CIN I took action in breach of the DNA molecule as evidenced by increased frequency of micronuclei compared to controls, which could prove a crucial action of these factors in the transformation of neoplastic cells that characterize the uterine cancer. Other factors such as oral contraceptive use, alcohol consumption and an increasing number of pregnancies, smoking, cocci, bacilli and multitude of partners, broken DNA, inducing the formation of micronuclei, but the results were not statistically significant.

Keyword: Micronuclei, Cancer, HPV, Carcinogenesis

1 – INTRODUÇÃO

Os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão, que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio óptico (GATTÁS *et al.*, 1992). Podem ser formados tanto por fragmentos acêntricos como por cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase do ciclo celular (Fenech *et al.*, 1999; GATTÁS 2001). São pequenos núcleos extras, observados no citoplasma das células que se originaram de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal das células filhas durante a divisão celular (ALBERTINI *et al.*, 2000). Esta estrutura é envolta por uma membrana nuclear, embora tenha características semelhantes as do núcleo principal, seu material genético não é funcional (não tem atividade transcricional) (HOFFELDER *et al.*, 2004).

Evans e colaboradores (1959) usaram a frequência de micronúcleos para medir o dano citogenético induzido em plantas por irradiações. Na década de 70, o teste de micronúcleos tornou-se viável e confiável pelo estudo de eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos, passando a ser um dos mais úteis indicadores de dano citogenético na medula óssea (HEDDLE, 1972; SCHMID, 1975). Mais tarde, esse teste passou a ser feito em eritrócitos e linfócitos do sangue periférico e em células esfoliadas, como da mucosa bucal (STICH, 1984; HÖGSTEDT, 1985; VINE MF, 1990).

As células esfoliadas não se dividem mais, mas refletem anormalidades citogenéticas que ocorreram na população de células na camada basal. Na colheita de células de um tecido que foi exposto a um suposto agente genotóxico (exposição aguda), a colheita deve ocorrer entre 5 a 24 dias após a exposição, uma vez que as células da camada basal tem um tempo de migração de aproximadamente 5 a 7 dias e as células expostas descamam totalmente em cerca de três semanas. A presença de micronúcleos nas células esfoliadas serve como dosímetro interno, medindo a extensão em que determinado agente ambiental está associado a dano ao DNA dos tecidos e, de certa forma, indicando um potencial ao desenvolvimento de câncer (STICH *et al.*, 1983; VINE, 1990). Mais tarde, esse teste passou a ser feito em eritrócitos e linfócitos do sangue periférico e em células esfoliadas, como da mucosa bucal, por exemplo (STICH, 1984; HÖGSTEDT, 1985; VINE, 1990).

Os micronúcleos são classificados como corpúsculos intra e extracelulares originados de fragmentos acêntricos de cromossomos degenerados da etapa da metáfase do ciclo celular (ANDERSON *et al.*, 2006).

Por se apresentarem como corpos de inclusão intracitoplasmática formado a partir de fragmentos de cromatina ou cromossomos inteiros, a sua presença nas células é um reflexo de aberrações cromossômicas durante a mitose celular. Os micronúcleos em células esfoliadas do colo do útero são sugeridos como um marcador de potencial maligno. São constituídos por material genético cromatínico contido por um envoltório nuclear, menores que o núcleo principal, e resultante fragmentos cromossômicos que se comportam independentemente dos outros cromossomos do cariótipo durante a divisão celular (HEDDLE *et al.*,1990).

1.1 – Técnica de Micronúcleos

Há 28 anos, Stich *et al.*,1982 desenvolveram um protocolo para o teste de micronúcleos com células esfoliadas epiteliais, que tem sido amplamente utilizado em estudos. Micronúcleos são formados pela exclusão do cromossomo inteiro ou fragmentos de cromossomos durante a divisão celular, e sua presença nas células é um reflexo da estrutural e / ou aberrações numéricas (clastogênico e / ou efeitos aneugênica) (ROSIN,1992).

O teste de micronucleo é uma técnica fácil e relativamente rápida e pode ser usada para fazer o diagnóstico clínico do câncer de forma precoce antes da instalação dos sintomas. Dessa forma o MN pode ser visto como uma ferramenta confiável e promissora para a prática clínica e o biomonitoramento de grupos maiores (ANGELINI *et al*, 2005).

Os fragmentos de DNA deixados para trás são incorporados dentro de núcleos secundários, que por serem muito menores que o núcleo principal da célula são chamados de micronúcleos. As células esfoliadas não se dividem mais, mas refletem anormalidades citogenéticas que ocorreram na população de células da camada basal. A determinação de micronúcleo pode ser feita por um método rápido e não invasivo, nos casos de mucosa bucal, escarro, urina, sêmen, colo uterino. A presença de micronúcleos nas células esfoliadas serve como dosímetro interno, indicando um potencial ao desenvolvimento de câncer. A aplicação da pesquisa de micronúcleos em estudos populacionais com diferentes exposições genotóxicas

pode aumentar o conhecimento do potencial carcinogênico de agentes ambientais em humanos e pode permitir elucidar mecanismos carcinogênicos (DIETZ *et al.*,1992) .

Segundo uma análise da "International Human Micronucleous (HUMN) Project, "a média do número de células epiteliais com micronúcleos em indivíduos saudáveis é de 1-3 por 1000 células epiteliais, esse número é independente do tipo de células epiteliais (FENECH *et al.*, 1999). Outro estudo mostrou também que pacientes com câncer independente do local do tumor, o número de micronúcleos é significativamente aumentado em células epiteliais em comparação com indivíduos saudáveis (VARDAZARYAN, 2004).

1.2 – Micronúcleo como Biomarcador

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos para determinar o impacto de fatores ambientais, genéticos e quanto ao estilo de vida sobre a estabilidade genômica na população humana (FENECH *et al.*,1999). O micronúcleo (MN) é um indicador de instabilidade genômica relacionado ao controle da multiplicação celular, sua presença nas células é um reflexo de aberrações cromossômicas ocorridas durante a mitose celular sendo utilizado como biomarcador do dano genotóxico e do potencial de malignidade (HEDDLE *et al.*,1991; MULLER-TEGETHOFF *et al.*,1997; DELFINO, CASARTELLI, GARZOGLIO, 2002; HOFFELDER *et al.*, 2004).

Segundo Maffei *et al.*,2002, o estudo dos micronúcleos tem servido para avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos. Entretanto, existem poucos estudos que utilizam a análise de micronúcleos em tecidos neoplásicos, embora se saiba das diversas alterações nucleares comuns às células tumorais (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Para Pastor *et al.*, 2001, a análise de micronúcleos (MN) pode ser considerada um útil biomarcador de efeitos genotóxicos em populações ocupacionalmente expostas a agentes genotóxicos e a fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias. Portanto, a determinação da taxa de micronucleação, mediante a análise microscópica , tem proporcionado uma forma simples e rápida na estimativa da presença de alterações cromossômicas nas células.

O significado do MN pode ser visto em vários testes sofisticados e refinados e por trabalhos de âmbito internacional. A análise de Micronúcleos é uma ferramenta na avaliação da mutagenicidade. A utilização do teste de micronúcleo para detectar e quantificar a ação genotóxica de agentes carcinogênicos foi bem estabelecido em vários sistemas, tanto *in vitro*, como *in vivo* (GAZA-LEAL *et al.*, 2002).

Assim sendo, a frequência de micronúcleos em células da mucosa cervical pode ser um critério adicional para estabelecer o risco do câncer cervical (MAJER *et al.*, 2001; GUZMÁN *et al.*, 2003).

As alterações genéticas requeridas na carcinogênese podem atuar em protooncogenes, genes dominantes, conferindo-lhes ganho de função e em genes supressores de tumor, genes recessivos, conferindo perda de função (BECKMAN & LOEB, 2005).

A técnica mais aceita na determinação de lesões da mucosa cervical é a análise de material de biópsia, porém, apresenta limitações técnicas, é um procedimento invasivo e pode acarretar implicações psicológicas para a paciente. Há grande necessidade de se estabelecer técnicas novas com metodologias mais fáceis, não-invasivas e confiáveis que possam ser associadas às demais e que permitam um diagnóstico satisfatório de indivíduos sob risco de desenvolver câncer. Nos últimos anos houve aumento no interesse pela citologia com esfregaço como método de monitoramento, diagnóstico e prognóstico (ACHA *et al.*, 2005) destacando-se estudos moleculares e citogenéticos.

A vigilância é um dos componentes fundamentais para o monitoramento efetivo de controle de infecções causadas pelo HPV. Um sistema de vigilância estruturado fornece informações sobre a magnitude e o impacto que esse vírus traz às portadoras desse parasito, como também os efeitos e as medidas de prevenção, detecção precoce desse invasor.

A Região Norte apresenta grandes problemas de saúde perante as infecções e agravamento das mesmas tendo muitas vezes como resultado freqüente o câncer de colo uterino. Mesmo com a realização do exame papanicolaou, pacientes têm apresentado diversas alterações, e o câncer de colo uterino é a segunda forma de câncer em números de casos em mulheres no Estado de Rondônia e o primeiro em mulheres na capital "Porto Velho" (INCA 2009).

Diante deste cenário fica clara a necessidade de continuidade em investimento no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do HPV nos

diferentes níveis de atuação como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social e na pesquisa.

Devido ao grande número de casos de neoplasias do colo uterino no Norte e Nordeste brasileiro, o presente trabalho visa investigar as alterações apresentadas nas células infectadas pelo HPV, principalmente nas que afetam o material genético, causando quebras cromossômicas e que podem ser detectadas pelo aumento de micronúcleos no citoplasma das células da mucosa genital. Aumento na frequência de micronúcleos tem sido encontrado em pacientes com neoplasias malignas.

Realizou-se uma análise mais aprofundada e criteriosa nas células da mucosa cervical obtidas durante a coleta para o exame de Papanicolau. Esse material será submetido à técnica de Micronúcleos e será feita análise da frequência de micronúcleos. A presença dos micronúcleos indicará as possíveis anormalidades causadas pelo HPV e outros fatores de risco.

2 – HPV

O *Papiloma Vírus Humano* (HPV) é considerado o agente etiológico do câncer cervical, ele exerce um papel central na carcinogênese do colo uterino (CRONJE HS.,2004). Associado a ele estão outros fatores que influenciam direta ou indiretamente a lesão no epitélio escamoso cervical. Investigações a respeito dos mecanismos de atuação e interação desses fatores com os elementos virais encontram-se na literatura dos últimos 20 anos.

Entre os fatores associados ao HPV pode-se citar: fatores imunológicos (resposta imune local e humoral) como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana, fatores genéticos como o polimorfismo da proteína p53, o tabagismo e o uso de contraceptivos orais (HOORY *et al*,2008). Todos estes fatores interagem em menor ou maior intensidade com oncoproteínas e outros elementos do HPV, potencializando a ação do vírus na célula hospedeira e facilitando o desenvolvimento dos processos de imortalização celular e carcinogênese (MUNÕZ *et al*,2006).

O nome papilomavírus é composto do latim papila, diminutivo de papula, projeção ou saliência em forma de mamilo e da desinência-oma, usada pelos

antigos médicos gregos para designar as tumorações ou os intumescimentos. As espécies de papilomavírus são nomeadas de acordo com o grupo de animais que eles infectam, seguindo uma nomenclatura binominal, em inglês: *Bovine papillomavirus (BPV)*, *Canine papillomavirus*, *Cottonnail rabbit papillomavirus*, *Deer papillomavirus*, *European elk papillomavirus*, *Human papillomavirus* e *Ovine papillomavirus* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).

Segundo o Ministério da Saúde (1999), O HPV é um DNA-vírus que causa doença infecciosa de freqüente transmissão sexual, conhecida por condiloma acuminado, verrugas genitais ou crista de galo.

A OMS reconheceu desde 1992 o HPV como o principal responsável pelo câncer do colo do útero, aprofundou esse conceito em 1996, em parceria com a *Agência Internacional de Rastreamento de Câncer – IARC*. Assim, foram identificados os tipos 16 e 18 como os principais agentes etiológicos desse tipo de câncer, firmando-se cientificamente, pela primeira vez, a indução de um tumor sólido por um vírus. Estudos que utilizam métodos de hibridização têm demonstrado que mais de 99% dos casos pode ser atribuído a alguns tipos de HPV, sendo o HPV 16 o responsável pela maior proporção de casos (50%), seguido do HPV 18 (12%), HPV 45 (8%) e o HPV 31 (5%) (BRINTON,1992).

2.1 – Ciclo da Infecção do HPV na Célula

O HPV é comumente transmitido durante a atividade sexual ou pequenas fissuras no epitélio muitas vezes produzidas durante o próprio coito, o que facilita o acesso do vírus às células basais (SCHIFFMAN & KJAER, 2003).

Uma vez dentro da célula do hospedeiro, o DNA viral pode assumir duas formas: a forma episomal ou a forma integrada. Na primeira forma, o DNA do vírus se encontra dentro do núcleo da célula do hospedeiro, mas não se encontrando ligado ao seu DNA. No momento que o DNA viral se liga ao genoma da célula hospedeira caracteriza ai a forma integrada, que é a forma que ocorre lesões de maior gravidade como nos carcinomas *in situ* e invasivo (MYERS *et al.*,2000; BOSCH *et al.*,2002)

2.2 – Relação do HPV com o Câncer de Colo Uterino

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1992, a infecção causada por HPV é a principal causa do câncer do colo uterino.

A associação existente entre o *Human Papilloma Virus* (HPV) e o carcinoma escamoso cervical está sendo investigada há muitos anos. Sabe-se hoje do papel central deste vírus na carcinogênese cervical e a afirmação de que não existe câncer do colo sem que o HPV esteja presente (PINTO *et al.*, 2002; NICOLAU, 2003).

O HPV é um vírus que vive na pele e nas mucosas genitais como vulva, vagina, colo de útero na mucosa bucal e pênis. É um vírus transmitido pelo contato sexual que afeta a área genital tanto de homens quanto de mulheres. Os HPVs são vírus da família *Papovaviridae* com mais de 80 tipos. Enquanto, alguns deles causam apenas verrugas comuns no corpo, outros infectam a região genital, podendo ocasionar lesões que, não tratadas, transformam-se em câncer de colo do útero (FERRIGNO, 1992; LOPES, *et al.*, 1995; INCA e MS, 2001).

Carneiro e colaboradores (2004) citam mais de 120 tipos de HPV identificados, concomitantemente por Novaes e colaboradores (2002) e Fernandes e colaboradores (2004), que os classificam de baixo e alto risco.

Cerca de 40 tipos de HPV acometem o trato genital pelo contato sexual e atualmente tem sido a infecção sexualmente transmissível mais freqüente (TROTTIER, 2006).

Existem dois tipos anatomopatológicos principais de câncer cervical: o carcinoma de células escamosas ou epidermóide, originado do epitélio tipo escamoso estratificado, e o adenocarcinoma da cérvix originado do epitélio cilíndrico do canal cervical. O primeiro corresponde a 90% de todos os cânceres cervicais. (NOVAK *et al.*, 1986).

Sabe-se hoje que, para o desenvolvimento da lesão intraepitelial de alto grau e do câncer invasivo do colo do útero, o HPV é a condição necessária; porém, por si só, não é uma causa suficiente, uma vez que, para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intraepiteliais faz-se necessária, além da persistência do HPV, a sua associação com os outros fatores de risco. Aproximadamente todos os casos de câncer do colo do útero são causados por um dos 13 tipos do HPV atualmente reconhecidos como oncogênicos pela *International Agency for Research*

on Cancer (IARC). Destes, os tipos mais comuns são o HPV16 e o HPV18. Outros fatores que contribuem para a etiologia desse tumor são o tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, multiparidade, baixa ingestão de vitaminas, iniciação sexual precoce e coinfeção por agentes infecciosos como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e *Chlamydia trachomatis* (INCA, 2009).

O estilo de vida e fatores biológicos têm sido objetos de vários estudos de monitoramento de indivíduos com maior risco de desenvolver câncer (BECKMAN, LOEB, 2005). Para a progressão do risco de desenvolver o câncer, alguns co-fatores são necessários, como o uso prolongado de contraceptivos hormonais, paridade elevada, a infecção concomitante ao HIV e ao tabagismo.

O colo uterino é revestido por várias camadas de células epiteliais pavimentosas, arranjadas de forma bastante ordenada. Nas neoplasias intra-epiteliais, esta estratificação fica desordenada. Quando a desordenação ocorre nas camadas mais basais do epitélio estratificado, estamos diante de uma displasia leve ou neoplasia intra-epitelial cervical grau I (NIC I). Cerca de 60% das mulheres com NIC I vão apresentar regressão espontânea, 30% podem apresentar persistência da lesão como tal, e das demais, menos de 10% irão evoluir para NIC III, sendo a progressão para o câncer invasor estimado em cerca de 1%. Se a desordenação avança até os três quartos de espessura do epitélio, preservando as camadas mais superficiais, estamos diante de uma displasia moderada ou NIC II. Na NIC III, o desarranjo é observado em todas as camadas (POTÉN *et al*, 1995).

Em seus estágios iniciais as doenças causadas pelo HPV podem ser tratadas com sucesso em cerca de 90% dos casos, impedindo que a paciente tenha maiores complicações no futuro. Portanto, a melhor arma contra o HPV é a prevenção e se fazer o diagnóstico precoce (JUNG, *et al* 2004).

Segundo Smeltzer & Bare (2009), o câncer cervical quando no início dificilmente apresenta sintomas, uma vez que esses sintomas se presente, pode passar despercebidos, tendo muitas vezes como sinal uma fina secreção vaginal aquosa, observada após a relação sexual. Se sintomas mais acentuados como sangramento irregular ou sangramento após a relação sexual a doença pode estar em estado muito avançado.

2.3 – Tipos de HPV

Dentre a família papiloma vírus da qual se origina o papiloma vírus humano existem diversos subgrupos e segundo Brasil (2006a) “mais de 100 tipos são reconhecidos atualmente, 20 dos quais podem infectar o trato genital”. Dentre os vários subgrupos do HPV existem alguns que oferecem maiores riscos de desenvolvimento de neoplasias em várias regiões do corpo.

Outra divisão possível para o HPV é através do seu potencial oncogênico. Pois, existem subtipos de HPV que são classificados como sendo de baixo risco, devido à sua associação com condilomas na forma de lesões intra-epiteliais (LIE) de baixo grau e são eles: 6, 11, 42, 43 e 44. Outros são classificados como subtipos de alto risco, os quais podem causar LIE de alto grau, vindo a desenvolver cânceres do colo uterino seus agentes principais são: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 46, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (BRASIL, 2006b).

Fernandes (2007), diz que os HPVs podem ser classificados também de acordo com a capacidade que eles apresentam de transformação neoplásica em grupos de baixo risco nos tipos (6,11,42,43,44), relacionados apenas as verrugas genitais e neoplasia de baixo grau e o grupo de alto risco tipos (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58 e 66), onde os tipos 16 e 18 estão associados diretamente com a neoplasia intra-epitelial de alto grau (NICIII ou HSIL).

Estudos observados pela Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (2002) mostraram que o risco de uma mulher desenvolver neoplasia de colo uterino aumenta em 19 vezes quando ela é infectada com o vírus HPV, e que associados ao tipo 18, 31 ou 33 aumenta em 50 vezes. Quando é relacionado ao HPV 16 este risco sobe para mais de 100 vezes, quando comparado a mulheres não infectadas. Isto demonstra que o HPV 16 mantém uma forte relação com a persistência das LIE com a sugestão dele ser um agente infeccioso de ação prolongada (RAMA *et al.*, 2005).

De acordo com um relato clínico de Castro & Duarte (2004), foi diagnosticado evidências de HPV dos tipos: 0, 1, 2, 4, 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32 e 57, em cavidade oral. Estes tipos virais são os mesmos que atingem outras regiões do corpo como as mucosas oral, ocular e respiratória, afetando especialmente a mucosa genital e a pele. Nesta pesquisa é ressaltada a presença do subtipo 16 como prevalente em lesões neoplásicas, porém, afirmando que é o 18 o tipo mais

agressivo nestas lesões, e que o 6 e o 11 são encontrados nas lesões condilomatosas. Os HPVs tipos 16 e 18 foram categorizados em 1995 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) como carcinogênicos em humanos (WHO.IARC, 1995).

2.4 – Método de Prevenção (Vacinas)

A prevenção primária do câncer cervical depende desde medidas preventivas contra a infecção pelo HPV, como medidas educativas preventivas que enfatizem mudanças no comportamento de risco para as DSTs e até a imunização contra alguns tipos de HPV. A prevenção secundária interrompe a progressão da doença após ela já ter iniciado, através da identificação e o tratamento de suas lesões precursoras (DENNY *et al*,2006).

Duas vacinas contra o papilomavirus humano foram aprovadas no Brasil, a Gardasil® a primeira vacina aprovada recomendada para faixa etária de 9 a 26 anos de idade em três doses e sua duração é em torno de cinco anos e meio. Protege contra quatro tipos de HPV (6, 11, 16 e 18), causadores de verrugas e câncer cervical (OLIVEIRA, 2008). A segunda vacina é a Cervarix® recomendada na idade de 10 a 25 anos. Ela também é quadrivalente, aplicada em três doses, porém não está disponível no sistema público assim como a Gardasil (CAMPBELL, 2008).

2.5 – EPIDEMIOLOGIA

Uma das características do vírus HPV, é que ele pode ficar instalado no corpo por muito tempo sem se manifestar, entrando em ação, em determinadas situações como na gravidez ou numa fase de estresse, quando a defesa do organismo fica abalada. Na maior parte das vezes a infecção pelo HPV não apresenta sintomas. A mulher tanto pode sentir uma leve coceira, ter dor durante a relação sexual ou notar um corrimento. O mais comum é ela não perceber qualquer alteração em seu corpo (BURD, 2003). Geralmente, esta infecção não resulta em câncer, mas é comprovado que 99% das mulheres que têm câncer do colo uterino foram antes infectadas por este vírus. No Brasil, cerca de 7.000 mulheres morrem anualmente por esse tipo de tumor (INCA, 2006).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam uma ocorrência de 22 mil novos casos de câncer, com o risco de (22/100.000) para região Norte, sendo a neoplasia mais incidente nessa região, ocupando a segunda posição nas regiões Sul (24/100.000), Centro-Oeste (19/100.000) e Nordeste (18/100.000), enquanto na região Sudeste é a quarta neoplasia mais freqüente (18/100.000), (BRASIL,2008). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA 2009).

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais freqüente entre as mulheres, com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano (BRASIL, 2007). Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos. A prevalência de câncer do colo do útero evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (INCA 2008). Ao mesmo tempo, com exceção do câncer de pele, ele é o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente. Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 51% a 66%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estádios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é menor, cerca de 41% após cinco anos. A média mundial estimada é de 49%(FERNANDES *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2008).

2.6 – Caracterização das Neoplasias Intra-Epiteliais Cervicais (NICs)

As neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs) são caracterizadas por diversos graus de anormalidades na diferenciação e maturação celular do epitélio cervical. Relativo a classificação Richart, as NICs podem ser divididas em NIC I, NIC II e NIC III. Como NIC-I, entende-se que as alterações celulares se restringem ao terço inferior do epitélio cervical (chamada também de lesão cervical de baixo grau).

Na NIC-II, as alterações chegam até o terço médio do epitélio cervical. Na NIC III, verifica-se que as alterações celulares ocupam o terço superior do epitélio cervical. As lesões compatíveis com NIC II e NIC III são também denominadas de lesões de alto grau (DE PALO, 1996).

As neoplasias intra-epiteliais tipo II (NIC II), correspondem às displasias moderadas atingindo cerca da metade do epitélio. Já as neoplasias intra-epiteliais do tipo III (NICIII), representam as displasias acentuadas e o carcinoma *in situ*, esse atinge toda a espessura do epitélio, não ocorrendo invasão neoplásica do estroma adjacente da membrana basal. As NICs e o carcinoma microinvasor frequentemente são assintomáticos. Porém, quando aparecem sintomas como corrimento, corrimento com odor fétido, corrimento sanguinolento, sangramento após a relação sexual, sangramento espontâneo, dispareunia, dor no baixo ventre, disúria e polaciúria caracteriza-se o carcinoma é invasor (SOUEN, PINOTTI, 1992; ROBBINS *et al.*, 2000).

No Sistema Bethesda, uma amostra é considerada satisfatória quando contém tanto células escamosas e endocervicais ou células escamosas metaplásicas. Estes elementos celulares formam a base microscópica para a hipótese de que a zona de transformação está representada. Dados da literatura são inconclusivos com respeito aos componentes endocervicais como medida de adequação da amostra. Estudos cruzados têm repetitivamente demonstrado que esfregaços com células endocervicais têm uma frequência significativamente mais alta e um alto grau de normalidade escamosa detectada do que com falta de tais células (KURMAN & SOLOMON, 1997).

Nesse sistema, a classificação e notificação de citologia cervical anormal foram desenvolvidas em 1988 e revisto mais recentemente, em 2001 (SOLOMON *et al.* 2002). Apesar de ter sido projetado inicialmente para identificar todas as lesões pré-cancerosas, o foco mudou agora para facilitar a detecção e tratamento de alto grau de lesões intra-epiteliais cervicais, com base no novo entendimento que a maioria das lesões de baixo grau, especialmente em mulheres jovens, está associada à auto-infecção pelo HPV (WRIGHT *et al.* 2002).

Segundo Bezerra *et al.*, (2005), dentre os métodos de detecção, a nomenclatura Bethesda é o mais eficiente a ser aplicado de forma coletiva em programas que fazem o rastreamento do câncer cervical uterino, uma vez que é uma técnica difundida a mais de 40 anos.

Atualmente descrito pelo sistema Bethesda, o exame de citologia cervical, permite o diagnóstico precoce de lesões precursoras de neoplasias da cérvix uterina, além de alterações citopáticas causadas pelo HPV (UTAGAWA *et al.*, 2000; SOLOMON, 2004).

Tabela 01-Caracterização das Anormalidades das Células Escamosas Epiteliais através do Sistema Bethesda.

<i>Tipos de Lesão</i>	<i>Características da Lesão</i>
<i>ASC-US</i>	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
<i>ASC-H</i>	Células Escamosas Atípicas, não se pode excluir HSIL
<i>LSIL</i>	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau Engloba: Alterações Relacionadas com HPV Displasia Leve (Mild CIN)
<i>HSIL</i>	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau Engloba: Displasia Moderada e Grave CIN Moderada Grave Carcinoma <i>in situ</i>

2.7 – Caracterização das Anormalidade das Células Escamosas Uterinas

A figura 01 demonstra a parte externa do colo do útero normal coberto por uma camada de células achatadas (células escamosas). Essas células ocorrem antes das camadas das células com núcleos centrais. Frequentemente a parte

inferior das camadas de células são arredondadas (células mais jovens). Quando maduras essas células migram para parte mais externa tornando-se planas.

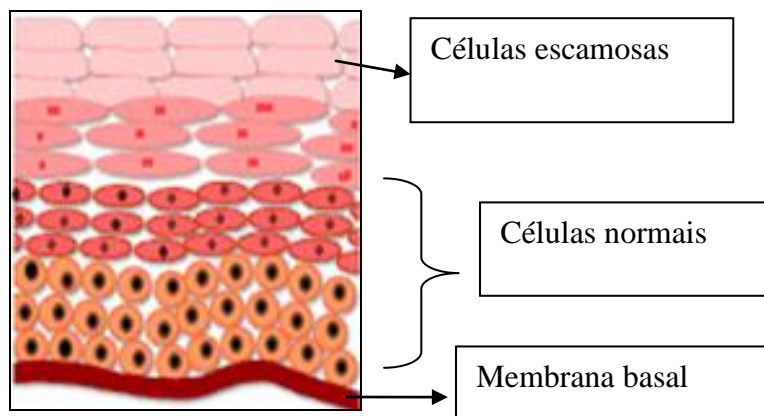


FIGURA 1. Cervix normal

FONTE: <http://www.mjbovo.com/Women/Dysplasia.htm>

Na figura 02, esta demonstrando que quando é a displasia cervical leve (CIN *Mild*), apenas algumas células são anormais. Essa displasia às vezes desaparece sem tratamento..

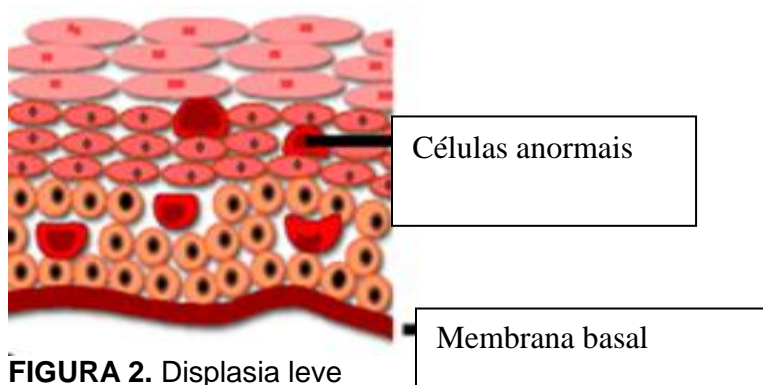


FIGURA 2. Displasia leve

FONTE: <http://www.mjbovo.com/Women/Dysplasia.htm>

Na figura 03, quando a displasia é do tipo moderada, envolve quase a metade da espessura do revestimento da superfície do colo do útero pelas células anormais.

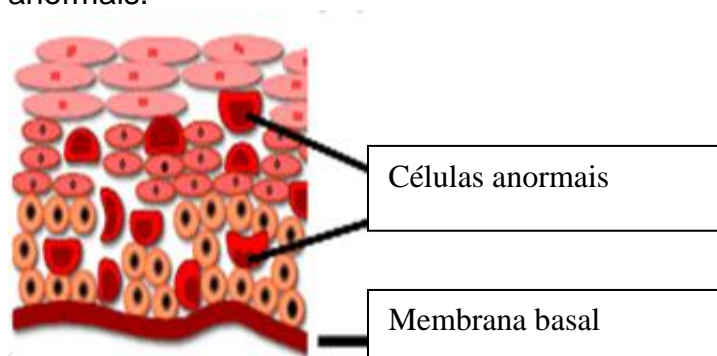


FIGURA 3. Displasia moderada

FONTE: <http://www.mjbovo.com/Women/Dysplasia.htm>

A figura 04 evidencia a displasia severa ou grave, que também pode ser chamada de carcinoma *in situ*. Observa-se que toda espessura do colo do útero é formado por células anormais. Pelo fato dessas células ainda não terem se espalhado por todo órgão, dizemos que caracteriza carcinoma *in situ* uma vez que o câncer está no lugar.

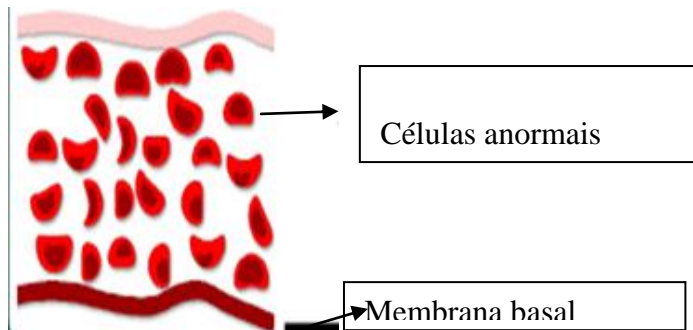


FIGURA 4. Displasia severa

FONTE: <http://www.mjbovo.com/Women/Dysplasia.htm>

Já a figura 05 demonstra o câncer do tipo invasivo, onde as células não apenas anormais, também invadem a membrana basal, o que caracteriza o grau de gravidade do câncer.

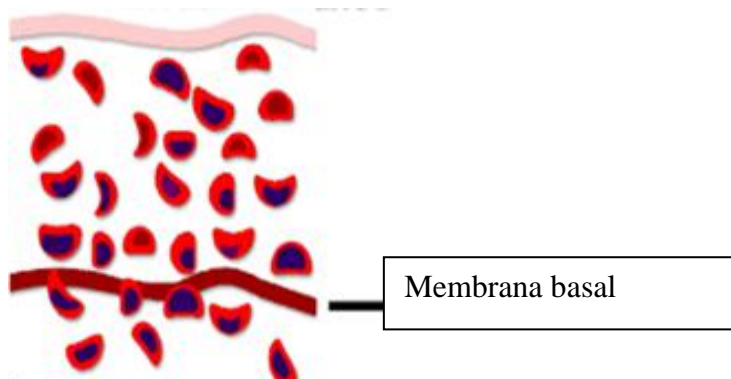


FIGURA 5. Câncer invasivo

FONTE: <http://www.mjbovo.com/Women/Dysplasia.htm>

2.8- Suscetibilidade Gênica

As mulheres que apresentavam variações gênicas relacionadas com o polimorfismo natural-HLA (*Human Lymphocytes Antigen*) foram investigadas relacionando à suscetibilidade para a infecção persistente por HPV e para a progressão ao câncer cervical. Atualmente usando as técnicas moleculares foram detectadas mulheres com alelo HLA-DRB*1301 que apresentam condições de

proteção à infecção pelo HPV, o que as tornam menos suscetíveis a infecção pelo vírus do que na maioria das mulheres. A decorrência do polimorfismo do gene HLA, que participam da resposta imunitária, diminui o risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Um outro achado interessante obtido do estudo do polimorfismo HLA, foi o fato de mulheres que não apresentavam câncer cervical, apesar de exposições repetitivas da infecção por HPV, como as prostitutas, ou descendentes de famílias com suscetibilidade para o câncer do colo do útero, como as freiras, verificando o efeito protetor dos alelos HLA-DRB1*13/DQB1*0603 de classe II contra a infecção e persistência viral (WANG & HILDESHEIM, 2003; GÓMEZ & CASTILLO, 2004).

A integridade da molécula de DNA está constantemente sob ataque de radicais livres endógenos, instabilidades termodinâmicas e ação de agentes exógenos, de forma que o reparo do dano ao DNA é essencial para a sobrevivência da célula e saúde do organismo como um todo (BOER, 2002). Quando há falha no reparo do dano ao DNA, a instabilidade genética gerada sob essas condições pode favorecer a gênese do câncer pelo acúmulo de mutações. As mutações carcinogênicas podem alterar genes ou estruturas cromossômicas por meio de mutações pontuais, deleções, inserções e rearranjos, além disso, as alterações espontâneas e herdadas também facilitam a gênese do câncer (OBE *et al.*, 2002; ACHA *et al.*, 2005).

3 – Fatores Associados à Oncogênese Cervical

O rastreamento das neoplasias intraepiteliais cervicais e do câncer do colo uterino, a citologia oncológica e as alterações citohistológicas induzidas pelo HPV continua sendo utilizado para identificar os fatores e risco e o prognóstico do câncer em pacientes que apresentam alterações morfológicas em seus exames (PAULA *et al.*, 2007).

Vários fatores estão associados a oncogênese cervical, por exemplo:

- Multiplicidade de Parceiros Sexuais (Promiscuidade)
- Vida Sexual Precoce
- Uso de Anticoncepcional Oral (uso hormonal)
- Tabaco

- Etilismo (uso de bebidas alcoólicas)
- Vaginose Bacteriana

3.1 – Multiplicidade de Parceiros Sexuais (Promiscuidade)

Segundo Franco (2003), o número de parceiros sexuais é considerado fator de risco para a aquisição de DST, em geral, e também para o câncer do colo uterino, relacionando-se diretamente a mortalidade por carcinoma cervical com a condição social e práticas sexuais dos parceiros.

3.2 – Vida Sexual Precoce

De acordo com Alvarenga *et al.*,(2000), a atividade sexual, quando exercida precocemente, aliada a um número alto de parceiros sexuais, juntamente com o uso do fumo, contraceptivo oral e outras doenças sexualmente transmissíveis, são fatores que podem contribuir para aumentar as chances de infecção pelo HPV. Quando mais precocemente for a primeira relação sexual, maior será a chance do HPV se tornar um fator de risco para desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), isso se deve aos achados de transformações nessas mulheres com processos de metaplasia jovem (BORGES *et al.*, 2004).

3.3 – Uso de Anticoncepcional Oral (uso hormonal)

Entre os fatores hormonais, destaca-se o uso de contraceptivos hormonais, pela sua repercussão social e econômica, acrescidos ao risco de desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical e câncer invasor do colo uterino. Atualmente, milhões de mulheres no mundo usam os contraceptivos hormonais, incluindo os anticoncepcionais orais e progestágenos de longa ação, como acetato de medroxiprogesterona injetável e implantes subdérmicos de levonorgesterol, (HARPER *et al.*,1994).

O uso de anticoncepcionais hormonais por mais de cinco anos eleva o risco de desenvolver lesão intra-epitelial de alto grau em pacientes com HPV (NEGRINE *et al.*,1990). Os anticoncepcionais orais, tanto combinados trifásicos quanto os de

baixa dose, estão associados ao aumento da transcrição do HPV (VANDENVELDE, 1992).

Para Daling *et al.*, (1996), o anticoncepcional hormonal pode ser importante fator na etiopatogenia do câncer do colo uterino se o uso ocorrer antes do completo desenvolvimento do trato genital feminino, isto é, antes dos 17 anos. O risco para desenvolvimento de adenocarcinoma *in situ* do colo uterino está aumentado também para as mulheres com longo tempo de uso de anticoncepcionais orais (mais que 12 anos) (MADELEINE *et al.*, 2001).

3.4 – Tabaco

O tabagismo é um fator de risco associado tanto para infecção genital de HPV como de câncer de colo uterino (NUÑEZ *et al.*, 2002; WINER *et al.*, 2003). A alta taxa da infecção por Papilomavírus humano (HPV) e a evolução de alguns casos onde as células se tornam malignas sugerem a existência de múltiplos fatores associados na imunodepressão tais como fumo, anticoncepcionais orais e infecção por Herpes simples tipo 2 (DALLING *et al.*, 1996).

Vaccarella *et al.*, (2008), em estudos recentes, demonstraram a maior prevalência da infecção por HPV de alto risco (HR-HPV), entre mulheres fumantes, essa associação esta atrelada a dose-dependente, ou seja, depende do número de cigarros fumados por dia.

O hábito de fumar contribui para dois mecanismos da ontogênese cervical, a exposição direta do DNA de células epiteliais cervicais a nicotina e a cotidina e aos produtos do resultado de reações com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as aminas aromáticas entre outros componentes da fumaça do cigarro (HELBERG *et al.*, 1998; PINTO *et al.*, 2002).

WU *et al.*,(2003), concluiu em mulheres Tailandesas que o tempo de exposição a fumaça do cigarro, que as tornavam tabagistas passivas era um fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical.

Em Cingapura, Tay;Tay (2004), demonstrou que fumantes passivas apresentam um maior risco para desenvolver a neoplasia cervical. As mulheres por ele estudadas possuíam baixa incidência para o hábito de fumar, além de poucos parceiros sexuais, o que sugeria menos risco de desenvolver HPV se comparado

com outros fatores. Porém, ele verificou que essas mulheres apesar de não fumantes tinham seus cônjuges fumantes, o que as tornavam fumantes passivas.

O tabaco e seus derivados podem induzir diversas alterações no sistema imunológico principalmente nas células natural killer e nas células de *Langerhans*. (SASSON, 1985; BARTON *et al.*, 1988). As células de *Langerhans* são componentes importantes no sistema de vigilância imunológica celular, uma vez que são apresentadoras de antígeno e ativam especificamente os linfócitos T-CD4 (VARGAS LINARES, 1989).

Segundo Barton *et al.*, (1988), as células de *Langerhans* na cérvix de mulheres fumantes tem diminuído, porém nas mulheres ex-fumantes tendem ter a mesma contagem das mulheres não fumantes. O que confirma a ação do tabaco na diminuição da quantidade e da função das células de *Langerhans*, que são responsáveis pela ativação da imunidade celular local contra o HPV. Os metabólitos da nicotina podem ser encontrados no muco cervical (GOMPEL & KOSS, 1997; SKEGG, 2002; BURD, 2003; PEREYRA & PARELLADA, 2003).

3.5 – Uso de bebidas alcoólicas

Ainda são inconclusivos os estudos que associam o consumo de bebida alcoólica ao risco para desenvolver o câncer de colo de útero. Associa-se esse risco por razões relacionadas ao tipo de vida, uma vez que mulheres etilistas são vulneráveis a multiplicidade de parceiros sexuais ou promiscuidade.

Mulheres que consomem bebida alcoólica comumente fumam, associando o tabaco ao álcool, o que promove um risco significativo para desenvolvimento de câncer cervical (WEIDERPASS *et al.*, 2001).

3.6 – Vaginose Bacteriana

Representa uma síndrome clínica resultado do desequilíbrio da concentração de espécies de *Lactobacillus*, onde essa concentração é substituída por uma alta concentração polimicrobiana de bactérias anaeróbicas. Essa síndrome pode ser assintomática ou até mesmo causadora de descarga branca, muito espessa que adere na parede vaginal e vestíbulo. Representa um risco para infecção do trato genital pela ascensão dos agentes microbianos, que provocam lesões e fissuras favorecendo a contaminação por agentes causadores de DSTs (ROCHA &

CUNHA,1998; PINOTTI *et al.*, 2001; PEREIRA & PARELLADA, 2001; NAUD *et al.*, 2003).

As vaginoses ocorrem, quando há presença de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp*, *Bacterioides sp*, *Mycoplasma hominis*, *Peptostreptococcus* e outras bactérias anaeróbias (NAUD *et al.*, 2003). O aumento indevido desses microrganismos também pode contribuir para o desenvolvimento de doenças malignas (SOPER, 1996; SUZUKI & GONÇALVES, 1996; STINGHEN *et al.*, 2004).

O grupo social de maior risco de contrair vaginose bacteriana, por transmissões sexuais (DST), é o formado por mulheres adolescentes e rapazes muito jovens; com baixo nível de maturidade sexual; com necessidade de afirmação da virilidade ou feminilidade na prática sexual com diferentes parceiros, e de comportamento promíscuos. Além do claro descaso destas mulheres pelo uso de preservativos. Sendo estas algumas das atitudes que fazem deste grupo de mulheres as mais susceptíveis a estas infecções (DULANTO, 1994; BRESSLER *et al.*, 1999; ADAD *et al.*, 2001).

- ***Candidíase Vulvovaginal***

Caracteriza-se pelo crescimento anormal de fungos do tipo levedura no trato genital. A *candidíase vulvovaginal* (CVV), é uma infecção que acomete cerca de 20 a 25% de mulheres que normalmente saudáveis e frequentemente assintomáticas apresentam culturas de secreção vaginal positivas para a *Candida albicans*; (SOBEL,1993).

Por apresentar uma incidência aproximada de 25% a CVV corresponde a um dos diagnósticos mais frequentes na citologia ginecológica, o que demonstra que o número de mulheres acometidas por essa infecção está aumentando já ocupando o segundo lugar entre as infecções cérvico-vaginais, precedida apenas pela vaginose bacteriana (ALEIXO *et al.*,1999; GARCIA *et al.*,2002).

- ***Gardnerella vaginalis***

A *Gardnerella vaginalis* é um coco-bacilo, Gram negativo, que desencadeia corrimento vaginal excessivo, com odor fétido, acinzentado ou amarelado, fluido,

sem sintomas irritativos locais. O corrimento vaginal e o odor são as principais queixas entre mulheres, com ou sem vida sexual ativa, em consultórios ginecológicos. São as vaginose bacterianas responsáveis por aproximadamente um terço destas queixas, as quais são caracterizadas por um desequilíbrio polibacteriano da flora vaginal normal, devido ao crescimento exagerado de bactérias, em especial as anaeróbias (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteróides sp*, *Mobiluncus sp*, *micoplasmas*) (CATAPLAN, 1996; RIBEIRO & THESING, 1998; SILVA FILHO & LONGATO, 2000; MURTA *et. al.*, 2000; ADAD *et. al.*, 2001; MARRAZZO, 2003).

A *Gardnerella vaginalis*, isoladamente ou associada ao *Mobiluncus sp.*, é um dos principais agentes causadores de vaginose bacteriana principalmente em mulheres em idade sexual, seja associada à falta de hábitos de higiene, grau de esclarecimento, número de parceiros sexuais ou a desequilíbrios da microflora vaginal, em decorrência do aumento do pH e diminuição dos lactobacilos.

A *G. vaginalis* é uma bactéria, transmitida principalmente pelo ato sexual (DST), com características morfológicas de cocos-bacilos, curtos, gram-negativos ou gram-variáveis, pleomórficos, não capsulados, imóveis e anaeróbicos facultativos. Cresce melhor em atmosfera de CO₂ e a temperatura entre 35 a 37 °C; têm a capacidade de causar quadros de vaginose, caracterizadas por infecção polimicrobiana de bactérias sinérgicas a *G. vaginalis*. Está associado também à redução de bacilos de Döderlein e alteração do pH vaginal (acima de 4,5), com diagnóstico clínico diferencial caracterizado por corrimento abundante de cor branco acinzentado de odor fétido (peixe podre) oriundos da produção de aminopeptidases, que formam aminas (principalmente, putrecina, cadaverina e trimetilamina), que rapidamente se volatizam em pH elevado e produzem o mau cheiro; além de serem citotóxicas, ocasionando a esfoliação das células epiteliais e o corrimento vaginal (SOBRINHO CASTRO, 1993; GOMPEL & KOSS, 1997; LIRA NETO, 2000; MURTA *et. al.*, 2000; LONGATO & SILVA FILHO, 2000; ADAD *et. al.*, 2001). Sendo importante, entretanto, enfatizar que a presença de *G. vaginalis* não significa que a mulher tenha vaginose bacteriana, uma vez que essa bactéria pode ser encontrada em 25 até 30% de mulheres saudáveis e assintomáticas (GARCIA, 2003; MARRAZZO, 2003).

Morfologicamente a *G. vaginalis*, em mulheres em plena atividade sexual e com vaginose bacteriana induzir leucorréia, em decorrência de um desequilíbrio da

flora vaginal. No exame de Papanicolaou se caracteriza por alterações celulares inflamatórias como metacromasia (anofilia) e/ou pseudo-eosinofilia, apagamento de bordas citoplasmáticas, e um elemento de grande valor diagnóstico que é a chamada “célula-guia”, efeito citológico caracterizado pela presença de células escamosas recobertas por densas colônias do microorganismo, que se coram em escuro pela coloração de Papanicolau. Outros importantes achados citológicos associados a esta infecção que são a diminuição da quantidade de bacilos de Döderlein e de leucócitos no esfregaço (GOMPEL & KOSS, 1997).

- **Mobiluncus sp**

As bactérias do gênero *Mobiluncus*, são considerados agentes etiológicos importantes associados a vaginose bacteriana com uma freqüência de 50 a 70% dos casos. Anaeróbicas restritas, de aspecto curvo ao exame citológico em objetiva de imersão, com presença de células-guia; cultivo lento (cerca de 10 dias de cultivo) com preferência por pH alcalino e de comportamento Gram variável, usualmente Gram negativa; que não produzem aminas putrecina e cadaverina, mas sim, trimetilamina. Compreendem espécies bem definidas e morfologicamente diferentes como *Mobiluncus mulieris* e o *Mobiluncus curtisii*, comuns em infecções do trato genital feminino que se caracterizam morfologicamente por bacilos espiralizados e móveis ao exame a fresco ou como bacilos curvo (CATAPLAN, 1996; HERNÁNDEZ, 1997; RIBEIRO & THESING, 1998; LIRA NETO, 2000; LONGATO & SILVA FILHO, 2000; MARRAZZO, 2003). Entretanto, ainda que *Mobiluncus* não seja o único agente etiológico da vaginose bacteriana, vários estudos têm demonstrado uma importante associação deste agente com a *G. vaginalis*, em 65 a 85% dos casos de vaginose bacteriana, conforme a metodologia utilizada para o seu diagnóstico (CATAPLAN, 1996; LONGATO & SILVA FILHO, 2000; ELEUTÉRIO JÚNIOR, 2003).

- **Clamídia tracomatis**

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta as células epiteliais humanas do trato genital e do tecido ocular. A infecção por essa bactéria é uma das DSTs mais comuns no mundo com uma estimativa de 89 milhões de novos casos por ano (GOLIJOW *et al*, 2005). Células infectadas pela

Chlamydia trachomatis passam a secretar grande quantidade de citocinas, que resulta num processo inflamatório bem acentuado, induzindo a lesão tecidual por meio de produção indireta de espécies reativas de oxigênio, desencadeando uma cascata inflamatória, que diminuí a imunidade celular (KULKARNI *et al.*,2001).

Estudos tem associado as DSTs com a carcinogênese cervical, focando principalmene a *C. trachomatis*. Um estudo multicêntrico envolvendo vários países foi feito por SMITH, *et al.*, (2004), esse estudo demonstrou que o risco do carcinoma cervical escamoso foi elevado nas mulheres portadoras dessa bactéria.

4 – OBJETIVOS

4.1 – Geral

Verificar se existe relação entre a frequência de micronúcleos da mucosa cervical de pacientes portadores do HPV, vaginose bacteriana, etilistas, tabagistas, as mulheres com multiplicidades de parceiros sexuais, as mulheres que tiveram vários partos (multiparidade), com o grupo controle (pacientes sem nenhuma infecção).

4.2 – Específicos

Analisar nas células epiteliais da mucosa cervical a presença de micronúcleos, em pacientes portadoras de HPV atendidas no Ambulatório do Posto de Saúde Areal da Floresta, Posto de Saúde Mauricio Bustanni, Ambulatório de atendimento da Faculdade de Medicina Aparício Carvalho FIMCA, na Máster-plástica, e na POC (Policlínica Oswaldo Cruz) - Porto Velho/ RO.

Verificar possíveis variações nos padrões citológicos no que se refere aos tamanhos e números desses micronúcleos e se essas variações implicam numa maior gravidade dos sintomas.

Analisar de forma estratificada os diferentes fatores indutores de câncer, e a frequência de Micronúcleos.

5 – METODOLOGIA

Antes da seleção dos indivíduos este projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa Universidade Federal de Rondônia/UNIR, recebendo o parecer favorável para a realização do mesmo; parecer CAAE: 0010.0.047.000-08 FR: 225616 (anexo 1). Fizeram parte do grupo de exclusão mulheres indígenas e portadoras do vírus HIV.

Trata-se de uma pesquisa quantitativa e qualitativa. Os dados clínico-epidemiológicos foram obtidos pela análise dos questionários livre e esclarecido, respondidos pelas pacientes e através dos resultados dos exames citológicos e pela técnica de micronúcleos aplicada nesse trabalho.

5.1 - Seleção da amostra

Foram incluídas no estudo 112 mulheres entre 16 e 69 anos de idade, com útero presentes e atendidas nos ambulatórios de ginecologia dos Postos de Saúde da cidade de Porto Velho (Areal da Floresta, Mauricio Bustanni, Policlínica Osvaldo Cruz, na Clínica Master-Plástica e nos ambulatórios do curso de medicina das Faculdades Integradas Aparício de Carvalho- FIMCA). Das 112 mulheres 18 fizeram parte do grupo controle mulheres com idades variando entre 16 anos a 46 anos. Foi aplicado um questionário padronizado de acordo com o protocolo publicado pela Comissão Internacional de Proteção Contra Carcinogênicos e Mutagênicos Ambientais (ICPEMC) (CARRANO & NATARAJAN,1988) (anexo2), para obtenção de informações sociodemográficas. Excluíram-se do estudo mulheres com história (suspeita ou confirmada) de imunossupressão com diagnóstico atual, as portadoras de deficiências mentais ou físicas que as impediam de compreender o estudo ou responder ao questionário; e as gestantes. As participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Em seguida, as participantes foram submetidas ao exame ginecológico pelos profissionais de saúde que fizeram à coleta de células cervicais para a citologia oncológica e para os testes de Micronúcleo.

5.2 - Coleta das células

As coletas foram realizadas no período de Novembro de 2008 a janeiro de 2010 nos Postos de Saúde e outras clínicas já citadas.

As células foram coletadas de forma não invasiva com o auxílio de escovas endocervicais do tipo *cytobrush*, por profissionais da saúde como médicos e enfermeiros.

5.3 – Material

As escovas endocervicais do tipo *cytobrush* contendo o material coletado foram colocadas em tubos *Falcon* contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% ou soro fisiológico e encaminhados para o laboratório de citogenética da (FIMCA), e para Centro Interdepartamental de Biologia Experimental (CIBEB), UNIR onde foi feita a técnica de micronúcleo.

5.4 - Técnica de micronúcleo (STICH *et al.*, 1982)

Para o preparo das células para a análise de micronúcleos foi seguida a técnica de Stich *et al.*, (1982), com modificações. Foram feitos os passos a seguir:

1. Transferência do material para tubos de ensaio;
2. Centrifugação por 9 minutos a 800 rpm;
3. Descarte do sobrenadante;
4. Acréscimo de 3 mL de fixador metanol:ácido acético (3:1) e ressuspensão com pipeta Pasteur e centrifugação e descarte do sobrenadante.
5. Repetir mais uma vez esse processo
6. Preparação das lâminas: em lâmina gelada e molhada pingar 10 gotas do material e deixar secar;
7. Coloração com Giemsa 4%, diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 0,06M/pH 6,8), por 10 minutos;
8. As lâminas foram lavadas em água destilada, secas à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$) e em seguida acondicionadas em geladeira até a análise da frequência de micronúcleos.

5.5 – Análise dos Micronúcleos (MNs)

Análise dos MNs foi feita em microscopia óptica, utilizando a objetiva 40x (quando necessário foi utilizada a objetiva de 100x). Foram considerado MNs estruturas semelhante ao núcleo, presentes no citoplasma da célula com contorno regular, ter a coloração de intensidade menor ou igual a do núcleo principal e seu tamanho ser menor que o núcleo principal (PICKER *et al*,1986). Foram analisadas quanto à presença de MN 3000 células de cada mulher participante do estudo.

Esses micronúcleos são indicadores de quebras do DNA por conseqüente o cromossomo. O número basal é de 4 a 5 MN/1000 células, o aumento dos micronúcleos esta associado a fatores que estão quebrando o DNA aumentando a freqüência dos micronúcleo.

5.6 – Análise Estatística:

As análises foram feitas utilizando o pacote *BioStat* (2.0). A diferença entre os dados foi calculada pela análise de variância e para a comparação entre as variáveis foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* (por se tratar de amostras não paramétricas). O valor de significância estatística foi estabelecido em 5%, ou $p < 0,05$.

6 – RESULTADOS

Das 112 pacientes estudadas, apenas 18 mulheres não possuíam nenhum fator de risco envolvido no estudo, (fumo, alcoolismo, doenças sexualmente transmissíveis, infecção, multiparidade e anticoncepcional oral), e serviram de controle.

Os dados epidemiológicos das mulheres participantes da pesquisa e as que iniciam a vida sexual com idade precoce, demonstrado na (Tabela 02) e Figura 06 para idade de início da vida sexual).

Tabela 02- Início da vida sexual das mulheres participantes do estudo, frequência e percentual

Idade Início da Vida Sexual	N	Percentual (%)	Percentual Cumulativo
12	2	1,8	1,8
13	6	5,4	7,1
14	19	17	24,1
15	23	20,5	44,6
16	10	8,9	53,6
17	16	14,3	67,9
18	13	11,6	79,5
19	12	10,7	90,2
20	7	6,3	96,4
21	2	1,8	98,2
25	1	0,9	99,1
33	1	0,9	100
Total	112	100	

Estudos demonstram que início de idade precoce da vida sexual as colocam em contato precocemente com algumas DSTs, o que favorecem ao aumento da frequência de MN uma vez que essas mulheres entram em contato prévio com as DSTs, tornando-as susceptíveis a desenvolver infecções cervicais pela diversidade de parceiros sexuais o que é considerado um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer uterino (PIOT & ISLAM, 1994).

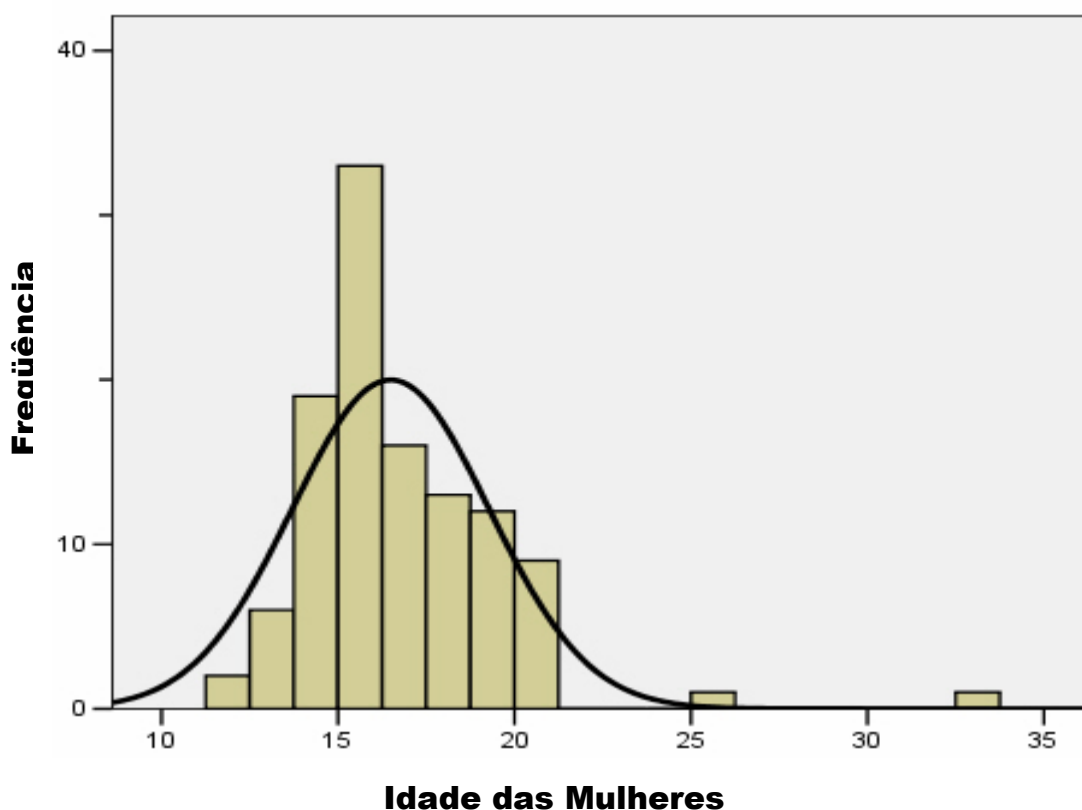


Figura 6. Histograma idade de início da vida sexual das mulheres participantes do estudo

As mulheres não fumantes nesse estudo foram 64 o que apresentaram um percentual de 57,1%, as mulheres fumantes foram 18 representadas por um percentual de 16,1%, as mulheres que não fumavam, mas tinham seus cônjuges fumantes foram 30 representadas por um percentual de 26,8% (Tabela 03 e Figura 7).

Tabela 03. Frequência de mulheres fumantes, mulheres com cônjuges fumantes e mulheres não fumantes participantes do estudo.

Fator	N	Percentual (%)	Percentual Cumulativo (%)
Fumante	18	16,1	16,1
Cônjuge Fumante	30	26,8	42,9
Não Fumante	64	57,1	100,0
Total	112	100,0	

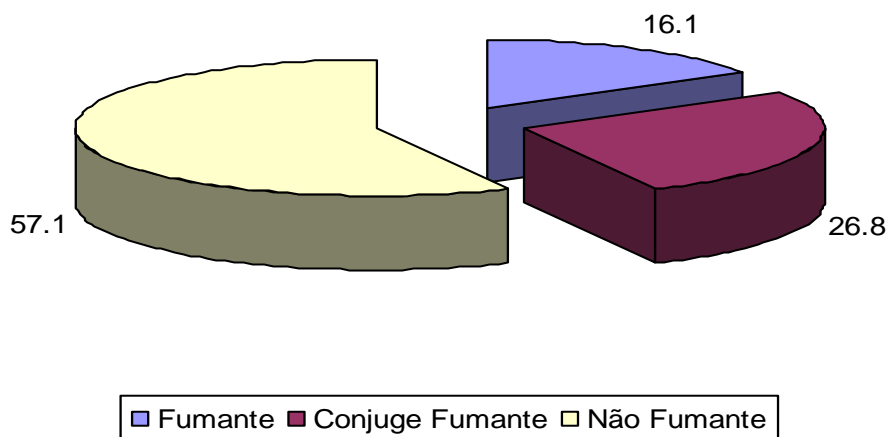


FIGURA 7. Frequência (%) de mulheres fumantes, mulheres não fumantes e mulheres com cônjuges fumantes participantes do estudo.

O gráfico mostra que todas as mulheres estudadas e entrevistadas baseadas no questionário livre e esclarecido, teve um percentual maior de mulheres não fumantes do que mulheres fumantes e que mulheres que tem maridos fumantes.

Ao analisar as médias, o desvio padrão e o valor de p, verificamos que as mulheres não fumantes apresentaram um resultado estatisticamente significativo em relação às mulheres não fumantes e com as fumantes. Isto se deve ao fato das mulheres não fumantes apresentarem outros fatores como NIC I, cocos, gardinerela e HPV que quebra o DNA, aumentando a frequência de micronúcleos.

Tabela 04. Frequência de Micronúcleos em mulheres fumantes, mulheres com cônjuges fumantes e mulheres não fumantes em 1000 células participantes do estudo.

Fator	N	Frequência De Micronúcleos	Percentual (%)	Média (\pm DP)	Valor de P
Fumante	18	86	11	4.42 (\pm 3.610)	
Cônjuge Fumante	30	189	24	6.40(\pm 5.887)	0.1645

Não Fumante	64	497	65	7.76(±6.236)	0.0215*
Total	112	100,0	100,0		

O aumento da frequência de micronúcleos foi observado nos resultados de todos os fatores, com exceção do fator mobiluncos que apresentou uma média inferior à média da frequência controle do estudo. De acordo com as médias analisadas verificamos que as portadoras de HPV e NICI demonstraram uma quebra maior no DNA causando frequência elevada de micronúcleos. Os fatores de risco tiveram resultados com valor de significância estatística estabelecida em 5%, ou $p < 0,05$, porém algumas variáveis quando comparadas com o grupo controle apresentaram uma significância estabelecida em 1% ou $p < 0,01$. Foram analisadas quanto à presença de micronúcleos 3000 células de cada mulher participante do estudo, mas de acordo com o protocolo estabelecemos apenas 1000 células micronucleadas como objeto deste estudo. As mulheres sem nenhum fator apresentaram uma média de MN 5,55 ($\pm 3,382$). Mulheres como o HPV apresentaram uma média de MN 19,63 ($\pm 6,801$) e $p = 0,0004$ o que demonstra que essa diferença é significativa em relação ao $p < 0,05$. Outro fator que teve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle foi NIC I que teve $p = 0,0027$. Os outros fatores como etilismo, uso de anticoncepcional oral (AO), Gardinerella, Bacilos, Cocos, Mobiluncos, *C. albicans*, quando comparados as mulheres sem fatores de riscos não mostraram diferença estatisticamente significativa (Tabela 05, Figura 8).

Tabela 05. Número de pacientes, Média total de Micronúcleos, Desvio Padrão e valor de “p” dos Controles e Fatores de Risco para o Desenvolvimento do Câncer Cervical em 1000 células.

	N	Média (\pm DP)	Valor de P
Controle	18	5.55 (\pm 3.382)	
HPV	11	19.63 (\pm 6.801)	0,0004*
Etilistas	24	7,75 (\pm 6.713)	0,3241
AO	25	6.40 (\pm 5.909)	0,9401
Gardinerela	30	8.70 (\pm 7.598)	0,4448
Bacilos	55	6.56 (\pm 5.993)	0,9352
Cocos	23	6,57 (\pm 6.900)	0,9188
<i>C.albicans</i>	08	6.37 (\pm 3.777)	0,6832
Mobiluncos	21	5.76 (\pm 5.761)	0,7716
Multiparidade	36	6.88 (\pm 6.065)	0,9669
Fumante	18	4.42 (\pm 3.610)	0,4163
NIC	06	17.50 (\pm 6.833)	0,0027*

* Estatisticamente significativo para $p=0,05$ (teste de Kruskal-Wallis)

DP: Desvio Padrão; NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; AO: Anticoncepcional Oral; HPV: Papiloma Vírus Humano.

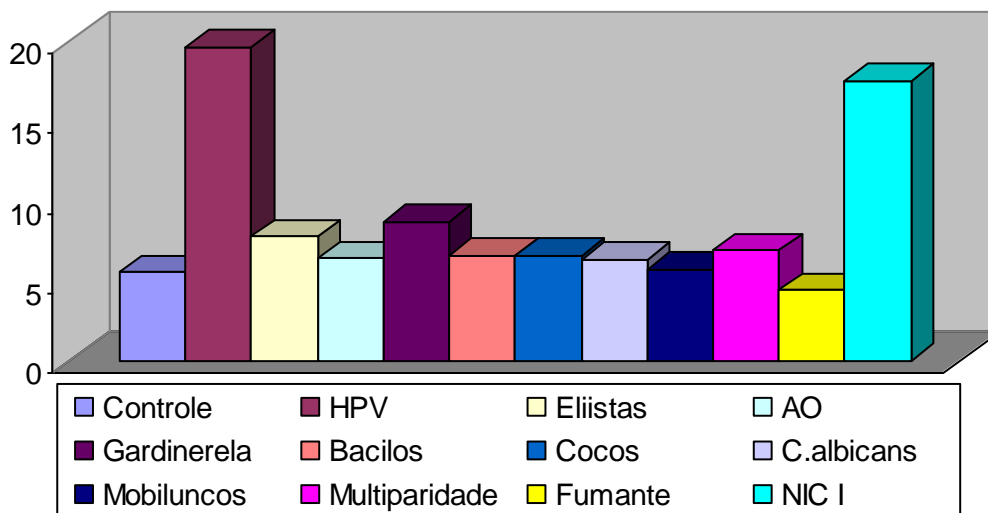


Figura 8. Comparação entre as médias dos fatores que predis põe o Câncer de Colo de Útero participantes do estudo.

Quando o parâmetro analisado foi o número de células com micronúcleos ou células micronucleadas (CMN), o grupo considerado controle constituído por 18 mulheres apresentou uma média de 4,83 ($\pm 2,526$) e quando comparadas as mulheres com HPV tem uma média de 15,27 ($\pm 5,349$) a diferença foi de $p=0,0005$, inferior ao $p=0,05$ mostrando que o HPV está induzindo o aumento de micronúcleos. Em relação a Neoplasia Intraepitelial Cervical do tipo I (NIC I), foram encontradas 6 mulheres com média 14,00 ($\pm 5,291$), quando comparadas as controles a diferença foi estatisticamente significativa, com $p=0,0033$ menor que $p=0,05$. Os outros fatores como etilismo, anticoncepcional oral, Gardinerela, Bacilos, Cocos, mobiluncos, *C. albicans*, as mulheres que teve varias gestações não apresentaram diferença significativa estatisticamente (Tabela 06).

Tabela 6. Número de pacientes, Média total de células com micronúcleos, Desvio Padrão e valor de “p” dos Controles e Fatores de Risco para o Desenvolvimento do Câncer Cervical

	N	Média (\pm DP)	Valor de P
Controle	18	4.83 (± 2.526)	
HPV	11	15.27 (± 5.349)	0,0005*
Etilistas	24	6.45 (± 5.064)	0,5199
AO	25	5.56 (± 4.700)	0,9133
Gardinerela	30	7.13 (± 5.835)	0,5820
Bacilos	55	5.45 (± 4.413)	0,8832
Cocos	23	6,56 (± 5.358)	0,7363
<i>C. albicans</i>	08	5.87 (± 3.440)	0,6985
Mobiluncos	21	4.76 (± 3.923)	0,4597
Multiparidade	36	6.19 (± 4.615)	0,6348
Fumante	18	4.16 (± 3.222)	0,2804
NIC	06	14.00 (± 5.291)	0,0033*

Estatisticamente significativa para $p=0,05$ (Teste de Kruskal-Wallis)

DP: Desvio Padrão; NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; AO: Anticoncepcional Oral; HPV: Papiloma Vírus Humano.

A frequência micronúcleos (MN) e de células com micronúcleos (CMN) foi calculada em 1000 células analisadas e foram determinadas por grupos de risco e o grupo controle (sem fatores de risco). A maioria das células micronucleadas apresentou um MN, entretanto algumas apresentaram de dois a três ou mais micronúcleos (Figura 9).

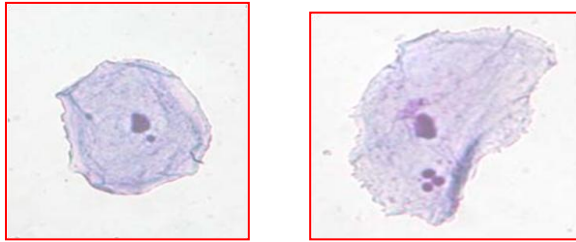


Figura 9. Célula esfoliada cervical em divisão contendo 1 Micronúcleos e 3 Micronúcleos.

Quando analisamos os micronúcleos e comparamos com o número de células micronucleadas ou células com micronúcleos, observamos que o HPV e o NIC I representam os fatores que mais quebraram o DNA, aumentando o número de células micronucleadas e a frequência de micronúcleos (Figura 10).

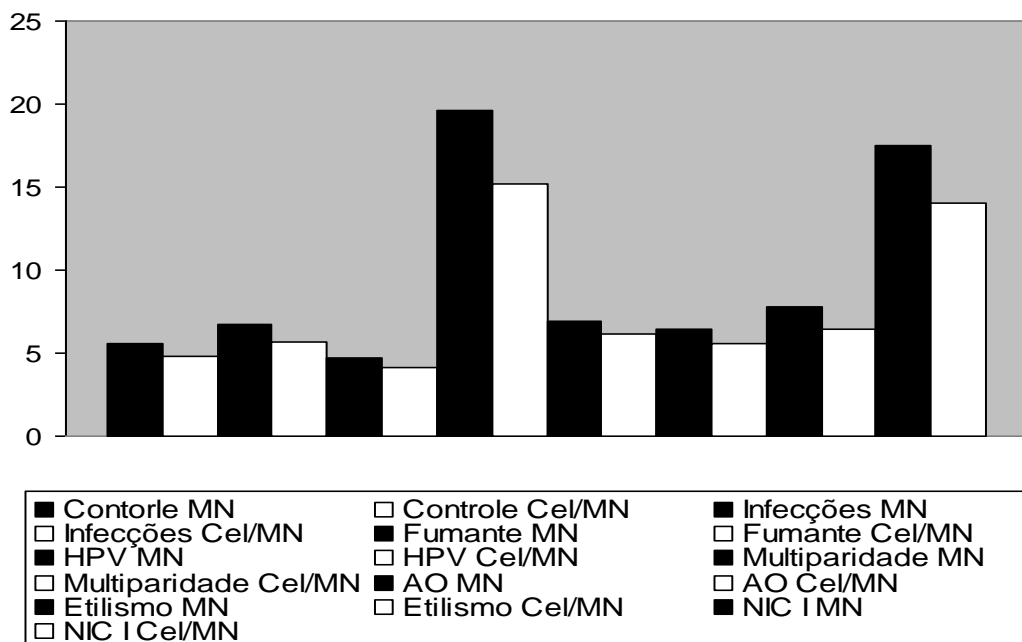


Figura 10. Número Total de Células Micronucleadas em Relação às Mulheres Sem Fatores de Risco com as Mulheres que Apresentam Fatores de Risco para o Câncer Cervical.

O aumento da frequência de micronúcleos foi observado nos resultados de alguns fatores, porém a infecção causada por HPV quando comparada ao grupo controle e com os demais fatores se mostrou bem elevada demonstrando que o HPV continua sendo um fator que danifica a célula provocando à quebra do DNA e conseqüentemente a formação dos micronúcleos (Figura 11).

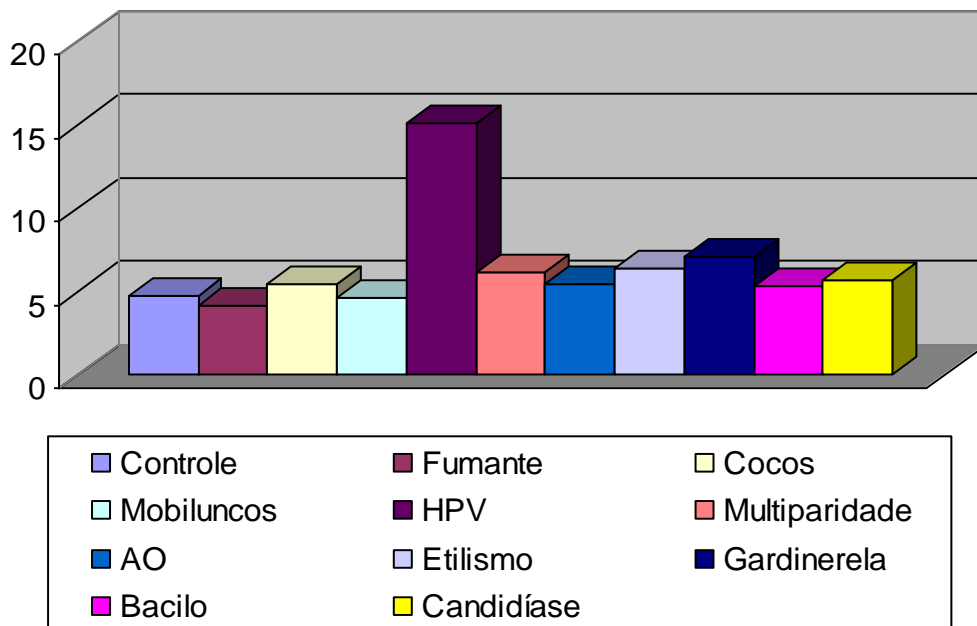


FIGURA 11. Frequência de micronúcleos dos grupos de mulheres sob fatores de risco para o câncer cervical em relação ao grupo controle.

Quando comparamos a frequência de micronúcleos do NIC I, do HPV com o controle, o HPV se mostra com uma maior frequência em relação ao controle e em relação ao NIC I. O NIC I apesar de ser o tipo mais leve de neoplasia intraepitelial cervical, apresentou variação da frequência de micronúcleos em relação ao controle o que demonstra que independente do tipo da neoplasia (NIC), o DNA foi quebrado, ocorrendo a formação de micronúcleos (Figura 12).

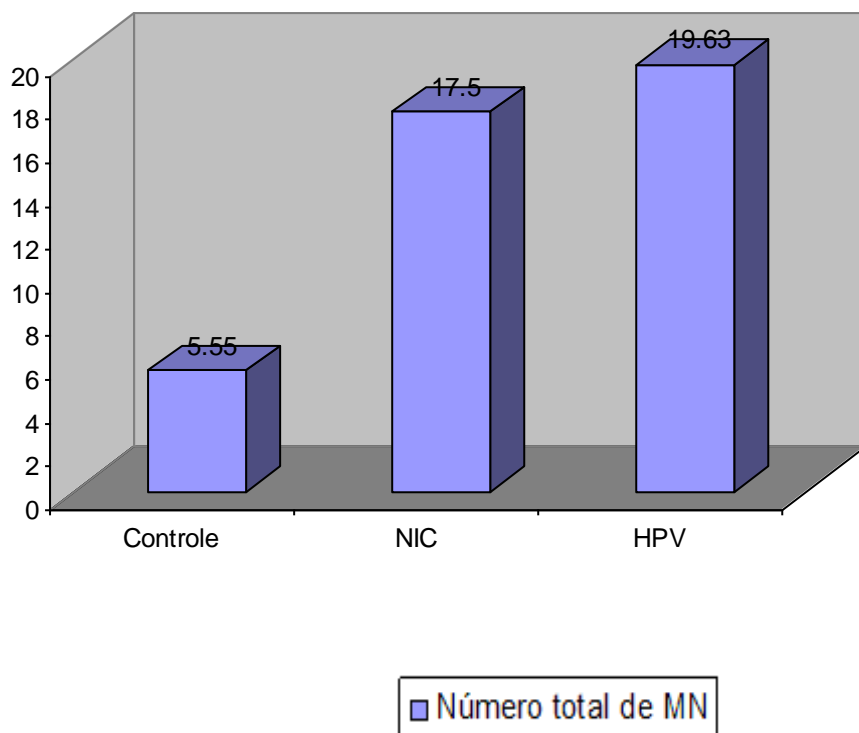


FIGURA 12. Frequência de micronúcleos dos grupos de mulheres sob fatores de risco para o câncer cervical em relação ao grupo controle em 1000 células.

7 – DISCUSSÃO

De todos os cânceres existentes, o câncer cervical é o que possui um dos maiores potenciais de prevenção e cura, quando diagnosticado precocemente. O Brasil foi um dos primeiros países a introduzir o exame preventivo Papanicolau na detecção precoce do câncer uterino, mas a doença continua a ser um grave problema de saúde pública, visto que as mulheres que se submetem ao exame não passam de 30%, isto quando elas se submetem pelo menos três vezes na, resultando em um diagnóstico já em avançada fase, em 70% dos casos (LEAL *et al.*, 2003).

No presente trabalho, observamos que 84% das mulheres apresentaram algum fator de risco ao câncer cervical como HPV, Multíparas, início da vida sexual precoce, uso de anticoncepcional oral (AO), infecção, etilismo, tabagismo, NIC I, vários parceiros sexuais, apresentando estas 62% quando analisada a frequência de micronúcleos. Elas estão entre a faixa etária inferior a esperada para esta doença, principalmente as jovens ≤ 35 anos de idade que demonstram maior predisposição aos riscos ao câncer uterino. De acordo com Mangan *et al.*, (1997), as mulheres adultas jovens são mais vulneráveis aos fatores de risco, por apresentarem a zona de transformação do colo na região da ectocérvica, estando expostas aos agentes potencialmente associados à neoplasia, esses fatores são múltiplos parceiros, o não uso de preservativo na prevenção de doenças sexualmente transmissíveis.

Outro aspecto observado foi o fator gestação, mulheres multíparas (com mais de duas gestações), apresentaram uma frequência elevada de MN quando comparadas com as mulheres nulíparas (sem nenhuma gestação). Halbe (2000), menciona que a multiparidade antes dos 20 anos são fatores de risco importantes para o câncer cervical. Entretanto, não foi observada diferença quando comparada com o grupo controle. A literatura sugere relação entre a idade das mulheres nulíparas com o tempo de uso de anticoncepcional oral, acima de cinco (5) anos, como potencializador da oncogenicidade do HPV (GUYTON, 2002; SHAPIRO *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003).

A idade da primeira relação sexual (sexarca) e múltiplos parceiros está relacionada ao risco de neoplasia cervical. O coito precoce pode aumentar a

sensibilidade aos efeitos de um agente sexualmente transmissível. Esta afirmação é sustentada por outras evidências, as quais mostram que o intervalo entre a menarca e o primeiro coito parece ser mais relevante que a idade da sexarca, ligando assim, o risco de neoplasia à idade sexual mais do que a idade cronológica (LEAL *et al.*, 2003). Quando comparamos a frequência de MNs com a sexarca não observamos diferença significativa em relação ao controle, porém o número de parceiros sexuais apesar de não ser estaticamente significativa, houve um aumento na frequência de MNs em relação ao grupo controle.

Plínio *et al.*, (2002) e Shapiro *et al.*, (2003), demonstraram que o uso de contraceptivos orais parece aumentar a atividade transformadora dos oncogenes do HPV e interferem na resolução eficiente de lesões causadas pelo vírus na cérvix de mulheres jovens. Mesmo muitos estudos recentes mostrarem que o uso prolongado dos anticoncepcionais serem fatores marcantes no desenvolvimento do câncer cervical, para Dziubinska-Parol *et al* (2003) e Shields *et al* (2004), esses hormônios esteróides não mostraram nenhuma diferença na expressão do HPV. Porém Moodley *et al* (2003), mostram evidências que 6 anos ou mais do uso de hormônios esteróides induz a progressão maior do câncer *in situ*, pelo aumento da expressão das proteínas oncogênica E6 e E7 do HPV-16, que se ligam e degradam o produto do gene p53, induzindo a falha apoptótica e a carcinogênese. Neste estudo foi observado o aumento da frequência de micronúcleos das mulheres que fazem uso do anticoncepcional oral em relação as mulheres do grupo controle, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Cerqueira *et al* (1998) determinaram através do teste de micronúcleos em células esfoliada do colo uterino, que o número de micronúcleos era significativamente maior em mulheres fumantes e quando comparada as não fumantes. Entretanto, neste trabalho foi encontrada diferenças estatisticamente significativa entre as mulheres não fumantes com as mulheres fumantes ($p=0.0215$), uma vez que as mulheres que não eram fumantes apresentaram outros fatores com HPV, Gardinerela e NIC I que colaboraram para a quebra do DNA aumentando assim o número de micronúcleos. Quando comparamos as mulheres fumantes com as que têm cônjuges fumantes não encontramos resultados estatisticamente significantes ($p=0.1645$).

Matsumoto *et al* (2003), em estudos epidemiológicos em mulheres japonesas, mostraram que fumantes com infecção por Clamídia são cofatores para progressão do NIC.

Com relação ao uso de bebidas alcoólicas não foram encontrados a associação direta com os componentes da bebida em relação com o câncer cervical. Porém, Weiderpass *et al* (2001), verificou que mulheres que fazem uso de bebidas alcoólicas possuem alto risco de desenvolverem câncer cervical *in situ*, invasivo e vaginal. Conseqüentemente, esse estudo epidemiológico verificou que o alcoolismo está diretamente ligado ao estilo de vida da mulher, como promiscuidade, tabagismo, uso de contraceptivos hormonais e dieta deficiente. Neste estudo não foi observado aumento significativo ($<0,05$) na freqüência de MN em mulheres que fazem uso de bebidas alcoólicas em relação ao grupo controle.

O conjunto dos fenômenos de reação a qualquer agressão tissular é chamado de inflamação (GOMPEL; KOSS, 1997). A citologia permite a avaliação da intensidade da reação inflamatória do trato genital além de acompanhar a sua evolução e em certos casos determina a natureza do agente causador da reação. A destruição celular é preenchida por uma proliferação fibroblástica, neo-capilares, presença de leucócitos polinucleares, linfócitos, macrófagos, formando então um granuloma de reparação (BIBBO *et al*, 1971). A intensidade dos processos inflamatórios é caracterizada pela metaplasia atípica, onde ocorrem anomalias severas a moderadas, com núcleos granulosos, hipercromáticos, nucléolos volumosos, intensidade das atipias núcleo-citoplasma, envolvendo lesão maligna (GOMPEL; KOSS, 1997).

Neste trabalho os microorganismos estudados apesar de causarem aumento na freqüência de MN, estes não foram significativos, mas isso não exclui a influência dos mesmos na indução de MN mostrando então coerência com a literatura.

O câncer de colo uterino, em geral, tem evolução lenta e é precedido por neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), que causam desorganização do epitélio malpighiano, por figuras de mitose anormais e por atipias nucleares (GOMPEL & KOSS, 1997). Dentre os NICs, nesse trabalho foi encontrado

apenas o tipo de NIC I considerado o tipo mais baixo de lesão, verificamos um aumento estatisticamente significativo na frequência de MN em relação ao controle ($p=0.0035$). Este fato evidencia que se o NIC I aumenta a frequência de MN, o que nos leva a crer que o NIC II e NIC III certamente apresentaria uma frequência ainda maior de MN e a progressão para o quadro clínico de câncer uterino. Corroborando com a importância do teste de micronúcleos como um biomarcador. A associação entre a severidade da lesão e a frequência de MN em células epiteliais foi demonstrada por Guzman *et al* (2003), que contribui para validação do teste como possível biomarcador para o risco de câncer.

O mecanismo da oncogênese induzida pelo HPV, já está bem compreendido na literatura. Após a infecção do HPV, as oncoproteínas do vírus se integram com proteínas supressoras do tumor, P35 e PRb, que alteram a função dessas proteínas, tendo como resultado a atividade transcricional descontrolada e a replicação do DNA e da divisão celular alterada o que resulta na formação de tumor (OLIVEIRA *et al*, 2002; PINTO *et al*, 2002; DELUCA *et al*, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram aumento significativo na frequência de MN nas mulheres com HPV em relação ao grupo controle ($p=0,0002<0,05$). A infecção pelo HPV foi comparada com os diversos fatores de risco para o câncer cervical e os resultados são concordantes com a literatura (LEAL-GARZA *et al*, 2002).

Este estudo utilizou o teste de MN, demonstrando que este teste pode ser considerado um excelente biomarcador de malignidade, uma vez que os resultados foram significativos em diversos fatores de risco para o câncer cervical ($p<0,05$), em concordância com Campos *et al* (2008) que encontrou em seus resultados a prevalência de micronúcleos em células esfoliadas de colo uterino maior nas pacientes com um ou mais fatores de risco para câncer cervical do que em pacientes sem fatores de risco. LEAL-GARZA *et al*, (2002) demonstraram que o MN é um biomarcador útil para avaliar os processos malignos cervicais uterinos.

As células micronucleadas mostram a intensidade do dano do seu material genético. Células que contêm vários micronúcleos possuem um maior dano genético, que as células que apresentam apenas um micronúcleo. Guzman *et al* (2003) observaram que não houve diferença significativa no

aumento de células micronucleadas entre lesões cervicais de baixo grau, porém ocorreu um aumento significativo de células micronucleadas em relação à pacientes normais, o que sugere a validação do MN como possível biomarcador para o risco de câncer.

8 – CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados pode-se concluir que as infecções, uso de anticoncepcional oral, etilismo e o aumento no número de gestações tiveram ação na quebra da molécula do DNA evidenciado pelo aumento na frequência de micronúcleos em relação aos controles. Entretanto esse resultado não foi estatisticamente significativo. Porém o HPV e o NIC apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, demonstrando uma ação crucial desses fatores na transformação das células neoplásicas que caracterizam o câncer uterino.

Os fatores etilismo, tabagismo Anticoncepcional oral, aumentaram a frequência de micronúcleos, porem esse aumento também não foi estatisticamente significativo quando comparados aos controles.

A infecção por HPV sozinha causa um dano na célula quebrando o DNA originando micronúcleos em relação às mulheres que não possuem a infecção pelo vírus.

O NIC I, apesar de ser o NIC mais baixo de lesão apresentou um resultado estatisticamente significativo quando comparados com o grupo controle.

A infecção por HPV associados a outras infecções como Gardinerella, Cocos, Bacilos e Mobiluncos, potencializa a formação de micronúcleos.

O teste de micronúcleos, por apresentar um fácil protocolo e de baixo custo, deveria ser introduzido no sistema único de saúde (SUS), junto com o exame preventivo Papanicolau, para contribuir na detecção dos danos citogenéticos precoce sofrido pelas células. Isto contribuiria para a redução da mortalidade de mulheres acometidas por uma doença freqüente que pode ser evitada.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, A. RUESGA MT, RODRÍGUEZ MJ, MARTÍNEZ DE PANCORBO MA, AGUIRRE JM. Applications o the oral scraped (exfoliative) cytology in oral and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 10, p. 95-102, 2005.

ADAD SJ, DE LIMA RV, SAWAN ZT. Frequency of Trichomonas vaginalis, Candida sp and Gardnerella vaginalis in cervical-vaginal smears in four different decades. Sao Paulo **Med J**. 2001;119(6):200-5.20

ADAM, E.; BERKOVA Z.; DAXNEROVA Z, ICENOGLE J, REEVES WC, KAUFMAN RH. Papillomavirus detection : demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. **Am J Obstet Gynecol** 2000; 182:257-264.

ALBERTINI, R.J; ANDERSON, D; DOUGLAS, G.R; HAGMAR, L; HEMMINKI K; MERLO F; NATARAJAN, A.T. NORPPA H; SHUKER, D. E.G; TICE R; WATERS, M. D; AITIO, A. IPCS guidelines for monitoring of genetoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat. Res.**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALEIXO NETO A, HAMDAN JS, SOUZA RC. Prevalência de Candida na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. **RGBO** 1999; 21: 441-45.

ALVARENGA GC, SÁ EMM, PASSOS MRL, PINHEIROVMS. Papilomavírus Humano e carcinogênese no colo do útero. **J Bras Doenças Sex Transm** 2000; 12(1):28-38. APGAR BS. New tests for cervical cancer screening. **Am Fam Physician** 2001;64:729-731.

BARTON, S. E., MADDOX, P. H.; JENKINS, D. Effect of cigarret smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic chance? **Lancet**, vol.2, p. 652-54, 1988.

BECKMAN, R. A.; LOEB, L. A. Genetic instability in cancer: Theory and experiment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 423-435, 2005.

BEZERRA SJS, SAIWORI JS, GONÇALVES PC, FRANCO ES, PINHEIRO AKB. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. DST **J Bras Doenças Sex Transm** 2005;17(2):143-8.

BONTKES HJ, DE GRUIJI TD, WALBOOMERS JM, SCHILLER JT, DILLNER J, HELMERHORST TJ. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. **J Gen Virol** 1999;80:409-417.

BORGES, S. C. V; MELO, V. H; JÚNIOR, G. M; ABRANCHES, A; NETO, J. B. L; TRIGUEIRO, M. C. Taxa de detecção do papilomavirus humano pela captura híbrida II, em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.26, n. 2, p. 105-110, mar. 2004.

BOSCH FX, LORINCZ A.; MUNOZ N.;MEIJER CJLM.;SHAH KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J clin Pathol**. 2002;55:224-65.

BOSCH FX, MANOS MM, MUNOZ N, SHERMAN M, JANSEN AM, PETO J. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer : a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst** 1995;87:796-802.

BOVICELLI A, BRISTOW RE, MONTZ FJ. HPV testing: where are we now?. **Anticancer Res** 2000; 20:4673-4680.

BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2009. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativas2010-2011/síntese.html>>. Acesso em 20 de dezembro de 2009.

BRASIL. O INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER: Infecções Sobre HPV. [citado 28 de abril de 2002] Disponível em: www3cancer.gov/prevention/alts/about HPV.html

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis DST. 4ª ed. Brasília. 2006, p. 11, 12, 86-89(a)

_____. Ministério da Saúde. Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis DST. 3ª. Ed. Brasília. 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica nº. 13. Controle dos Cânceres do Colo do Útero e da Mama. Brasília. 2006, p. 23-24, 45-47, 50, 58(b).

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual Técnico. Profissionais da Saúde. Prevenção do Colo do Útero. Brasília. 2002, p. 5, 8, 13.

BRINTON, L.A., 1992, "Epidemiology of cervical cancer – overview". In: The Epidemiology of cervical cancer and human Papillomavirus. Ed: N. Muñoz, F.X.Bosch, K.V.Shah and A. Meheus, Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARC.

BURD ME. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin.Micribiol**, 2003;16:1-17.

CAMPBELL, U. Nova vacina contra HPV, fonte: correio Brasiliense, 2008. Disponível em: <<http://www.gaparp.org.br>>. Acesso em 07 de Junho de 2008, 19: 04:25.

CAMPOS, S. Ginecologia / Mulher HPV - papilomavírus, 2003. Disponível em: < <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/7471> >. Acesso em 02 de Maio de 2008, 12: 08:07.

CAMPOS,L.M.F.R; DIAS,F.L; ANTUNES,L.M.G; MURTA,E.F.C. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. **Med J** 2008; 126 (6):323-8.

CARNEIRO, S. S.; MOREIRA, M. A. R; ALMEIDA, N; JOAQUIM C. HPV e câncer do colo uterino. **REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL**, V. 33,N. 1, P. 01-20, jan./jun. 2004.

CASTRO, THEREZITA M.P.P.G.; DUARTE, MARIA LUISA. Condiloma lingual: a case report relato de caso clínico. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** , São Paulo, v. 70, n. 4, 2004.

CERQUEIRA. E.M; SANTORO. C. L; DONOZO. N. F. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol**, vol.42. p.639-49, 1998.

COHN DE, HERZOG TJ. New innovations in cervical cancer screening. **Clin Obstet Gynecol** 2001; 44:538-549.

COKER AL, BOND SM, WILLIAMS A, GERASIMOVA T, PIRISI L. Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. **Cancer Detect Prev** 2002; 26:121-128.

CUZICK J, BEVERLEY E, HO L, TERRY G, SAPPER H, MIELZYNSKA I. HPV testing in primary screening of older women. **Br J Cancer** 1999; 81:554-558.

CUZICK J, SASIENI P, DAVIES P, ADAMS J, NORMAND C, FRATER A. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme : summary and conclusions. **Br J Cancer** 2000; 83:561-565.

CHAN PK, CHANG AR, CHEUNG JL, CHAN DP, XU LY, TANG NL. Determinants of cervical human papillomavirus infection : differences between high- and low-oncogenic risk types. **J Infect Dis** 2002; 185:28-35.

CHEW GK, CRUICKSHANK ME. Human papillomavirus as a form of risk assessment. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2001;15:759-768.

DALING JR, MADELEINE MM, MCKNIGHT B, CARTER JJ,WIPF GC, ASHLEY R. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 1996;5(7):541-8.

DELFINO, V.; CASARTELLI, G.; GARZOGLIO, B. Micronuclei and p53 accumulation in prenioplastic and mutagenicity. **Mutat. Res.**, v. 258, p.253, 2002.

DELUCA.G.D; LUCERO.R.H; CIVETTA. M. Human papillomavirus genotypes in womem with cervical cytological abnormalities from area with high incidence of cervical cancer. *Rev. Inst.Med Trop. São Paulo*, vol,46, p.9-12, 2004.

DENNY. L, QUINN. M, SANKARANARAYANAN. R. Chapter 8: Screening for cervical cancer in developing countries. *Vaccine*.2006;24:S3/71-7.

DZIUBINSKA-PAROL. I; GASOWSKA. U; RZYMOSKA. J. Influence of physiologic 17 beta-estradiol concentrations on gene E6 expression in HPV type 18 in vitro. **Ginekol Pol**, vol. 74, p.710-13, 2003.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Projetos Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento, 2002, p. 4, 6-9, 12.

Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/079.pdf>. Acesso em 07 de Abril de 2008, 22: 39:15.

FERNANDES, A. P. M; GONÇALVES, M. A. G; SIMÕES, R. T; QUINTANA,S.M; DUARTE, G; DONADI, E. A. Influência do HPV-16 sobre a produção intralesional de IL-10 em mulheres imunogeneticamente responsivas e portadoras do HIV-1. DST – **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis** ,v. 16, n. 3, p. 67-72, 2004.

FERNANDES, R. A. Q; NARCHI, N. Z. **Enfermagem e Saúde da Mulher**. Edição brasileira-2007. Barueri-SP.Manole. 2007.

FERRIS DG, WRIGHT TC JR, LITAKER MS, RICHART RM, LORINCZ AT, SUN XW, et al. Comparison of two tests for detecting carcinogenic HPV in women with Papanicolaou smear reports of ASCUS and LSIL. **J Fam Pract** fevereiro 1998; 46:136-141.

FRANCO EL, DUARTE-FRANCO E, FERENCZY A. Cervical cancer : epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Can Med Assoc J** 2001; 164:1017-1025.

FISCHER. N. Chlamidia tracomatis infection in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, vol.23, p.247-50, 2002.

FRANCO EL, FERENCZY A. Assessing gains in diagnostic utility when human papillomavirus testing is used as an adjunct to Papanicolaou smear in the triage of women with cervical cytologic abnormalities. **Am J Obstet Gynecol** 1999;181:382-386.

FRANCO ES. Cervicografia digital na prevenção do câncer do colo uterino. In Semana Brasileira de Enfermagem-Conselho Federal de Enfermagem e Conselho Regional de Enfermagem do Estado do Ceará, Fortaleza; 2003.

GAMZU R, ALMOG B, LEVIN I, FAINARU O, NIV J, LESSING JB. Clinical and economic implications of adding HPV tests to the routine cytology follow-up and management of patients with histologically defined cervical intraepithelial neoplasia grade 1. **Gynecol Oncol** 2002; 86:129-133.

GARCIA R; CABELLO R.R; TALONIA F.C; BONIFAZ A; MARQUEZ F.Z. Estudio de espécies de Candida no albicans y su relación com candidiasis vulvovaginal recorrente. **Ginecol Obstet Méx** 2002; 70: 431-36.

GOLIJOW, C. D.; ABBA, M. C.; MOURÓN, S. A.; LANGUES, R. B.; DULOUT, F. N.; SMITH, J. S. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections cervical disease in Argentine women. **Gynecologic Oncology**. Vol. 96, p. 181-186. 2005.

GOMPEL,C.;KOSS,L. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. 1ª ed. São Paulo, Manole,1997.79-105

GUYTON, A; HALL, J.E.Tratado de fisiologia médica.Editora Guanabara, vol.10,p.809-810,2002.

GUZMAN. P; SOTELO-REGIL. R . C; MOHAR. A . Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in papanicolau smears. *Environ. Mol. Mutagen*, vol.41, p.339-43, 2003.

HALBE HW.**Tratado de ginecologia**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2000. vol 3.

HARPER JM, LEVINE AJ, ROSENTHAL DL, WIESMEIER E,HUNT IF, SWENDSEID ME. Erythrocyte folate levels, oral contraceptive use and abnormal cervica cytology. **Acta Cytol**. 1994;38(3):324-30.

HEDDLE, J. A; Cimino, M. C; Hayashi, M; Romagna, F; Shelby, M. D; Tucker, J. D; Vanparys, P.h; MacGregoR, J. T. Micronuclei as an index of citogenetic damage: past, present, and future. **Environ Mol Mutagen**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HELLBERG. D; NILSSON. S; HALEY. N. J. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinini in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. **Am, J.Obstret Gynecol**, vol.158, p.910-13, 1988.

HELMERHORST TJ, MEIJEr CJ. HELMERHORST TJ, MEIJER CJ. Cervical cancer should be considered as a rare complication of oncogenic HPV infection rather than a STD. **Int J Gynecol Cancer** 2002; 12:235-236.

HILDESHEIM A, SCHIFFMAN MH, GRAVITT PE, GLASS AG, GREER CE, ZHANG T. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **J Infect Dis** 1994; 169:235-240.

HOLFFELDER, D. R; LUO, L; BURKE,, N. A; WATKINS, SIMON C; GOLLIN, S. M; SAUNDERS, WILLIAM S. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. **Chromossoma**, v. 112, p. 389-397, 2004.

HO GY, BIERMAN R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-428.

JANICEK MF, AVERETTE HE. Cervical cancer : prevention, diagnosis, and therapeutics. **J Clin** 2001;51:92-114.

JASTREBOFF AM, CYMET T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. **Postgrad Med J** 2002;78:225-228.

JIN XW, Xu H. Cervical cancer screening from Pap smear to human papillomavirus DNA testing. **Compr Ther** 2001; 27:202-208.

JUNG, W.W.; CHUN2, T; SUL, D; HWANG, K. W; KANG, H-S; LEE, D .J; HAN, I-K. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. **J Microbiol.** Dec; 42(4):255-66. 2004.

KAHN JA, ROSENTHAL SL, SUCCOP PA, Ho GY, BURK RD. Mediators of the association between age of first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection. **Pediatrics** 2002;109:E5.

KIM JJ, Wright TC, Goldie SJ. Kim JJ, Wright TC, Goldie SJ. Cost-effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. **JAMA** 2002;287:2382-2390.

KONYA J, DILLNER J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. **Adv Cancer Res** 2001; 82:205-238.

KOUTSKY L.A; AULT K.A; WHEELER C.M; BROWN D.R; BARR E; ALVAREZ F.B. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. , *N Engl J Med* 2002; 347:1645-1651.

KULASINGAM SL, MYERS ER. Potential health and economic impact of adding a human papillomavirus vaccine to screening programs. **JAMA** 2003;290:781-789.

KULKARNI S, RADER JS, ZHANG F, LIAPIS H, KOKI AT, MASFERRER JL. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. **Clin Cancer Res** 2001; 7:429-34.

KURMAN, ROBERT J. & SOLOMON, DIANE. O sistema Bethesda para relato de diagnóstico citológico cervicovaginal. Rio de Janeiro : **Revinter**, 1997.

LEAL, E. A; LEAL JUNIOR, O. S; GUIMARARAES, M. H. Lesões precursoras do câncer de colo em mulheres adolescentes e adultas jovens do município de Rio Branco- Acre. **Rev.Bras. Ginecol. Obstet.**, vol. 25, p.81-6, 2003

MADELEINE MM, DALING JR, SCHWARTZ SM, SHERA K, MCKNIGHT B, CARTER JJ. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. *Câncer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):171-7.

MANDELBLATT JS, LAWRENCE WF, WOMACK SM, JACOBSON D, Yi B, HWANG YT. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. **JAMA** 2002;287:2372-2381.

MANOS MM, KINNEY WK, HURLEY LB, SHERMAN ME, SHIEH-NGAI J, KURMAN RJ. Identifying women with cervical neoplasia : using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. **JAMA** 1999;281:1605-1610.

MCFADDEN SE, Schumann L. The role of human papillomavirus in screening for cervical cancer. **J AM ACAD Nurse Pract** 2001;13:116-125.

MASUMOTO. N; FUJII. T; ISHIKAWA. M, *et al.* Dominant human papillomavirus 16 infection in cervical neoplasia in young japoneses women; study of 881 out patients. **Gynevologic Oncology.** Vol. 94, p.509-14, 2004.

MEIJER CJ, SNIJDERS PJ, VAN DEN BRULE AJ. MEIJER CJ, Snijders PJ, van den Brule AJ. Screening for cervical cancer : should we test for infection with high- risk HPV?. **Can Med Assoc J** 2000.

MEIJER CJ, HELMERHORST TJ, ROZENDAAL L, VAN DER LINDEN JC, VOORHORST FJ, WALBOOMERS JM. HPV typing and testing in gynaecological pathology : has the time come? *Histopathology* 1998;33:83-86.

MOODLEY. M; MOODLEY. H; CHETTY. R. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer. **Int. Gynecol. Cancer.** Vol.13, p. 103-10, 2003.

MORENO V, BOSCH FX, MUNOZ N, MEIJER CJ, SHAH KV, WALBOOMERS JM. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. multicentric-control study. **Lancet** Mar 30 2002;359:1085-1092.

MULLER-TEGETHOFF, K; KERSTEN B.; KASPER, P.; MÜLLER, L. Application of the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay in genetic toxicology testing. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 125-138, 1997.

MUNOZ N, FRANCESCHI S, BOSETTI C, MORENO V, HERRERO R, SMITH JS. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer : the IARC multicentric case-control study. **Lancet** 2002; 359:1093-1101.

MUNOZ. N; CASTELLSAGUÉ. X; DE GONZALES A.B; GISSMANN. L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24:S3/1-10.

MURTA, G.F. Saberes e Práticas: Guia para ensino e aprendizado de enfermagem – 4ª. ed. Ver e ampl. – São Caetano do Sul: Difusão Editora, 2008, p. 415-416.

MYERS, E.R; MCCRORY,D.C; NANDA, K; BASTIAN. L; MATCHAR. D.B. Mathematical model for the natural history of human papilomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol*.2000; 151:1158-71.

NADAL, L. R. M; NADAL, S. R. Doenças Sexualmente Transmissíveis. Indicações da Vacina Contra o HPV. **Rev bras.coloproctol**.vol.28 no.1 Rio de Janeiro Jan/Mar. 2008, p. 124, 125.

NAUD, P; MATOS, J; HAMMES, L; MAGNO, V; BROWERS, C; SPILKI, M; DAVILA, A; MARTINEZ, G. Estudo da eficácia e tolerabilidade do fenticonazol no tratamento da vaginose bacteriana: estudo duplo-cego, randomizado, prospectivo, controlado e comparado com grupo placebo. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 1/2, p. 67-70, 2003.

NEGRINI BP, SCHIFFMAN MH, KURMAN RJ, BARNES W, LANNOM L, MALLEY K. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. **Cancer Res**.1990;50(15):4670-5.

NICOLAU, S.M. - Existe câncer do colo uterino sem HPV? *Rev. Assoc. Med.Bras*. V .49, n. 3, São Paulo Jul/Set. 2003.

NOBBENHUIS MA, HELMERHORST TJ, VAN DEN BRULE AJ, ROZENDAAI L, JASPARS LH, VOORHORST FJ. Primary screening for high risk HPV by home obtained cervicovaginal lavage is an alternative screening tool for unscreened women. **J Clin Pathol** 2002;55:435-439.

NOBBENHUIS MA, HELMERHORST T, VAN DER BRULE A. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with abnormal cervical smear. **Lancet** 2001; 358:1782-1783.

NOVAES, L. C. G; NOVAES, M.R.C.G; SIMÕES-BARBOSA, A. Biologia Molecular dos papilomavirus humanos e sua participação na carcinogênese. **Revista de Saúde do Distrito Federal**, v. 3, n. 3/4, p. 29-36, jul./dez. 2002.

NOVAK, E. R. JACINTO, C; BEREK, E.R; **Tratado de Ginecologia**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

NUOVO J, MELNIKOW J, HOWELL LP. New tests for cervical cancer screening. **Am Fam Physician** 2001;64:780-786.

OBE, G; Pfeiffer, P; Savage, J. R. K; Johannes, C; Goedecke, W; Jeppesen, P; Natarajan, A. T; Martínez-López, W; Folle, G. A; Drets, M. E.. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 17-36, 2002.

OLIVEIRA, M. D. C. Vacina contra o câncer do colo do útero HPV, 2008. Disponível em: < http://www.imunity.com.br/artigo_vacinahpv.html >. Acesso em 08 de Junho de 2008, 16: 50:05.

PALO, D.G; CHANEN, W.; DEXEUS, S. **Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior**, 2ª. ed. Editora Médica e Científica Ltda, 1996, p. 23, 27, 31, 125, 128, 129, 133, 134, 137-139.

PARK, J. S.; RHYU, J. W.; KIM, C. J. Neoplastic changer of squamo-columnar junction in uterine cervix and vaginal epithelium by exogenous estrogen in hpv-18 URR E6/E7. **Gynecol. Oncol.**, vol. 89, p. 360-68, 2003.

PAULA AAP, NETTO JCA, FREITAS JR R, PAULA LP, MOTA ED, ALENCAR RCG. Penile carcinoma: the role of koilocytosis in groin metastasis and the association with disease specific survival. **J Urol.** 2007; 177(4):1339-43.

PEREIRA, E. A. G.; PARELLADA, C. I. **Doenças da vulva e da vagina**. In: Instituto para o Desenvolvimento da Saúde, Universidade de São Paulo, Ministério da Saúde, Fundação Telefônica. Manual de Conduas Médicas. São Paulo: [s. n.], 2001, p. 425-437.

PEREYRA EAG; PARELLADA CI. Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Humano. **Manual Schering** 2003.

PINOTTI, J. A; FONSECA A.M; BAGNOLI U.R. Vulvovaginites. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58, n. 5, p. 315-324, 2001

PINTO, A. P. TULIO, S; CRUZ, O. R. Co-Fatores do HPV na Oncogênese Cervical, **Revista da assoc. Méd. Bras.**, vol. 48,2002.

PICKER,J.D.;FOX,D.P. Do curried foods produce micronuclei in bucal epithelial cells? **Mutation Res.**, 171:185-188, 1986.

POTÉN, J., ADAMI, H., BERGSTRÖM, R. Strategies for global control of cervical cancer. **Int. J. Cancer** 60: 1-26, 1995.

RAMA, C. H; ROTELI-MARTINS, C. M; DERCHAIN, S. F. M; OLIVEIRA, E. Z; ALDRIGHI, J.M; **NETO, C. M.** Detecção Sorológica de Anti-HPV 16 e 18 e sua Associação com os achados do papanicolau em adolescentes e mulheres jovens. **Revista da Assoc Med Bras** 2006; 52(1): 43, 45, 46.

ROBBINS,S.L;COLTRAN,R.S;KUMAR,V;SCHOEN,F.J.**Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª Edição. Rio de Janeiro.Guanabara. 2000.

ROCHA, F. J. S.; CUNHA, G. M. A. Estudo retrospectivo da incidência de vulvovaginites, cervicites e neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres atendidas pelo serviço de prevenção ao Câncer ginecológico e de mama no Município de Aracati – CE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 30, n. 2, p. 45-48, 1998.

SASIENI PD. Human papillomavirus screening and cervical cancer prevention. **J Am Med Wom Assoc** 2000;55:216-219.

SCHIFFMAN MH, BAUER HM, HOOVER RN, GLASS AG, CADELI DM, RUSH BB Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:958-964.

SCHIFFMAN M, HERRERO R, HILDESHEIM A, SHERMAN ME, BRATTI M, WACHOLDER S. HPV DNA testing in cervical cancer screening : results from women in a high-risk province of Costa Rica. **JAMA** 2000; 283:87-93.

SCHIFFMAN M; KJAER S.K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **J Natl Cancer Inst Monogr**, 2003; (31):14-9.

SCHIFFMAN MH, KIVIAT NB, BURK RD, SHAH KV, DANIEL RW, Lewis R. Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. **J Clin Microbiol** 1995; 33:545-550.

SCHIFFMAN MH. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions : baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:397-402.

SHAPIRO, S; ROSENBREG, L; HOFFMAN, M. Risk of invasive cancer of the cervix in relation to the use injectable progestogen contraceptives and combined estrogen/progestogen oral contraceptives (South Africa). **Cancer Causes Control**. Vol.14,p.4885-95,2003.

SHERMAN ME, SCHIFFMAN M, COX JT. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage : data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). **J Natl Cancer Inst** 2002;94:102-107.

SKEGG DC. Oral contraceptives, parity, and cervical cancer.**Lancet** 2002;359:1080-1081.

SIMSIR A; BROOKS S; COCHRAN L; BOURQUIN P; IOFFE O.B. Cervicovaginal smear abnormalities in sexually active adolescents : implications for management. **Acta Cytol** 2002; 46:271-276.

SIMONS. A. M; PHILLIP. D. H; COLEMAN. D. V. Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. **Br Med J**. vol.306, p.1444-48, 1993.

SMELTZER, S. C.; BARE. B. G. **Tratado de Enfermagem Médico Cirúrgica**. 11ª Ed. Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan.2009.

SMITH-MCCUNE K, MANCUSO V, CONTANT T, JACKSON R. Management of women with atypical Papanicolaou tests of undetermined significance by board-certified gynecologists : discrepancies with published guidelines.**Am J Obstet Gynecol** 2001; 185:551-556.

SMITH JS, BOSETTI C, MUNOZ N, HERRERO R, BOSCH FX, ELUF-NETO J. IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 2004; 111:431-9.

SOBEL JD. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36: 153-212.

SOLOMON D, NAYAR R. Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal: definições, critérios e notas explicativas. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Revinter**; 2004.

SOLOMON D, DAVEY D, KURMAN R, MORIARTY A, O'CONNOR D, PREY M. The 2001 Bethesda System : terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002; 287:2114-2119.

SOLOMON D, SCHIFFMAN M, TARONE R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance : baseline results from a randomized trial.**J Natl Cancer Inst** 2001;93:293-299. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:293-299.

SOPER, D. E. Infecções das vias genitais superiores. In: COPELAND, L. J. **Tratado de ginecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 493-494.

SOUEN, J. S.; PINOTTI, J. A. **Manual do câncer genital feminino**. São Paulo: Roca, 1992.

STICH, H. F.; CURTIS, J. R.; PARIDA, B.B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells to high cancer risk groups: tobacco chewers, **Int. J. Cancer**, v 30, p. 553-559, 1982.

STINGHEN, A. E. M; NASCIMENTO, A. J; LEONART, M. S. S. Método de Papanicolau em material cervico-vaginal para a triagem de infecção por *Candida* sp, *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*. **Revista Brasileira de Análise Clínicas**, v. 36, n. 2, p.111-115, 2004.

STONE KM, KAREM KL, STERNBERG MR, MCQUILLAN GM, POON AD, UNGER ER. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 infection in the United States. **J Infect Dis** 2002; 186:1396-1402.

SUZUKI, L. E; GONÇALVES, S. M. R. Neoplasia intraepitelial cervical: sua incidência no exame laboratorial de rotina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 28, n. 3, p. 119-121, 1996.

TAY,S.K. & TAY,K.J. Passive cigarette smoking is factor cervical neoplasia. **Gynecol.Oncol.**, vol.93, p. 116-20, 2004

TENCH WD. TENCH WD. Validation of AutoPap primary screening system sensitivity and high-risk performance. **Acta Cytol** 2002; 46:296-302.

THE CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. O Centers for Disease Control and Prevention. Tracking the Hidden Epidemics 2000, Trends in STDs in the United States: A Closer Look at HPV Infection.

THE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. A Food and Drug Administration. FDA Approves Expanded Use of HPV Test. [last updated March 31, 2003; cited August 31, 2003] Available from: www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2003/NEW00890.html

UTAGAWA ML, PEREIRA SMM, CAVALIERE MJ, SHIRATA NK. Lesões precursoras de câncer do colo uterino em adolescentes: impacto em saúde pública. **Folha Méd** 2000;119(4):55-8.

VACCARELA S, HERRERO R, SNIJDERS PJ, DAI M, Thomas JO, HIEU NT. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. **Int J Epidemiol** 2008; 37(3):536-46.

VANDENVELDE C, VAN BEERS D. Risk factors inducing the persistence of high-risk genital papillomaviruses in the normal cervix. **J Med Virol.**1992;38(3):226-32.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRONGLE, C.R. & WICKNER, R.B. (org.). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. **Academic Press**, 2000, 1176 p.

VINTHER J, NORRILD B. Clearance of cervical human papillomavirus infections. **Int J Cancer** 2003; 104:255-256.

WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** Sep 1999;189:12-19.

WEIDERPASS,E; YE, W; TAMIMI, R. **Alcoholism and risk for cervix uteri, vagina, and vulva.** Cancer Epidemiology, Biomarkrs & Prevention, vol.10,p.899-901, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.

WRIGHT TC Jr, COX JT, MASSAD LS, TWIGGS LB, WILKINSON EJ. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. . **JAMA** 2002;287:2120-2129.

WU, P.A; LOH, C.H; HSIEH, L.L; LIU, T.Y; CHEN, C.J; LIOU, S.H. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronucleiin exfoliated buccal mucosal cells. Mutat Res 2003; 562:27-38.

ANEXOS