

Escola Superior de Tecnologias de Saúde do Porto

Daniela Sofia Carvalho Alves

# **Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia e Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Mestrado Tecnologias de Bioquímica em Saúde, realizado sob a orientação científica de Professora Doutora Cristina Prudêncio, ESTSP e de Mestre Amaro Frutuoso, Hospital Pedro Hispano

Setembro, 2011

## **Agradecimentos**

Queria agradecer à Dr<sup>a</sup>. Mrinalini Honovar, Directora do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Pedro Hispano, pela disponibilização das amostras e dos equipamentos, sem os quais não seria possível a elaboração deste trabalho. Queria agradecer especialmente ao Técnico Coordenador Mestre Amaro Frutuoso pela disponibilidade e sabedoria que fez com que este projecto fosse feito com maior rigor e profissionalismo.

Queria agradecer à Professora Doutora Cristina Prudêncio, pela sua disponibilidade total e esclarecimentos manifestados.

## Resumo

Em Portugal, o segundo cancro mais frequente nas mulheres é o cancro do colo do útero, representando cerca de 6% de todos os cancros nas mulheres.

O vírus papiloma humano, *Human papillomavirus* (HPV) que está presente em cerca de 90% das lesões de alto grau e cancro cervical, sendo dividido em dois grupos: o HPV de alto risco que está associado a lesões de alto grau e cancro do colo do útero e o HPV de baixo risco que raramente causa lesão. Neste trabalho visamos estabelecer se houve evolução para lesão nos casos de pacientes com citologia normal e tipagem para HPV de alto risco positiva.

Estudaram-se 51 pacientes do Hospital Pedro Hispano, dividido em dois grandes grupos, um com mulheres até aos 35 anos, outro com mulheres com mais de 35 anos, com resultado da citologia ginecológica normal, e uma tipagem para HPV de alto risco positiva. Das 51 mulheres, 72,6% fizeram segunda colheita e destas 54,9% não fizeram tipagem de HPV de alto risco.

Para avaliação dos resultados foram usados os testes de estatística descritiva, nomeadamente os de frequência.

Das 23 segundas colheitas foi extraído ADN e foi analisado num equipamento específico para detectar a presença de HPV de alto risco.

Das amostras testadas verificou-se que 37,8 % das mulheres continuaram positivas para HPV de alto risco e destas 8,7% evoluiu para uma lesão de alto grau. Apesar de haver uma percentagem razoável de evolução para lesão nestes casos, o número da amostra é reduzido, pelo que condiciona a extrapolação para a população.

Além disso o tempo de follow-up é relativamente curto, e seria interessante seguir estas mulheres por um período mais longo para confirmar esta tendência.

Fazer a quantificação dos oncogenes E6/E7, traria talvez resultados mais consistentes uma vez que se poderia verificar se o ADN do vírus já se encontrava integrado no genoma da mulher.

## **Abstract**

Cervical carcinoma accounts for 6% of all types of cancer in women, being the second most frequent type of cancer in Portugal.

The *Human papillomavirus* (HPV) is present in about 90% of all high grade lesions and/or cervical carcinoma. There are two main groups of HPV: the ones that cause high grade lesions and/or cervical cancer (high risk strains, such as 16, 18, 31, 33, etc) and the ones who are unlikely to cause any kind of lesion.

Herein, we aimed to verify if patients with negative gynaecological smears and positive high risk HPV results evolved to disease.

We studied 51 patients of Hospital Pedro Hispano, with normal gynaecological smear and a high risk HPV positive result. These women were divided into two groups, according to their age (under 35 and over 35 years old). Of the 51 patients, 72.6% of them had a follow-up gynaecological smear and of these 37.8% didn't have a follow-up HPV test.

Statistical analysis was made using descriptive statistic tests, specifically frequency tests.

In 23 of the second samples DNA was extracted and it was analysed in a specific equipment in order to detect the presence of high risk HPV.

Of the tested samples, 43.5% remained positive for high grade HPV, and of these, 8.7% had already developed to a high grade lesion. In spite of the number of cases that developed into lesion, this sample is fairly small, which restricts the conclusions.

On the other side, the follow-up period is quite short, and it would be interesting to have longer follow-up periods in order to confirm this trade.

The quantification of the oncogenes E6/E7 might also be enlightening, because we could establish if the virus DNA was already integrated into the human genome.

## ***Palavras-chave:***

PCR em tempo real, HPV, cancro do colo do útero, citologia negativa, oncogenes E6/E7

# Índice

I. Introdução.....	1
1. Cancro do colo do útero .....	2
a) Epidemiologia .....	2
b) Principais causas .....	2
c) Rastreio.....	2
d) Caracterização dos tumores.....	3
f) Tratamento .....	4
2. HPV .....	4
3. Cuidados no laboratório de Biologia Molecular .....	8
4. <i>Polimerase ChainReaction (PCR)</i> .....	8
II. Objectivos .....	11
III. Material e Métodos.....	13
1. Caracterização da Amostra.....	14
2. Extracção de ADN .....	14
3. PCR em tempo real .....	14
4. Analise de resultados.....	14
5. Ética.....	15
IV. Resultados .....	16
V. Discussão .....	19
VI. Conclusão .....	22
VII. Bibliografia .....	24

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

## **I. Introdução**

## 1. Cancro do colo do útero

### a) Epidemiologia

Em Portugal, o cancro do colo de útero é o mais comum do sistema reprodutor da mulher, representa cerca de 6% de todos os cancros nas mulheres. <sup>(Franco, E.L., et al.,1999)</sup> Tem-se que os tumores malignos do colo do útero são mais frequentes nas mulheres que tenham tido filhos e nas que mantêm uma vida sexual activa, sobretudo, caso tenham tido vários parceiros sexuais. Esta maior incidência deve-se em parte às várias infecções sexualmente transmissíveis, sobretudo infecções provocadas pelo vírus do Herpes tipo II e o Vírus Papiloma Humano, *Human papillomavirus* (HPV). Todavia, é especialmente frequente em mulheres com antecedentes familiares.

### b) Principais causas

O cancro do colo do útero tem diversas causas, como por exemplo a predisposição genética, os hábitos tabágicos com uso simultâneo de contraceptivos orais, sendo que a causa principal é a infecção pelo HPV, estado este presente em cerca de 90% das lesões de alto grau e cancro cervical. <sup>(Thomas, T. J., et al., 1999)</sup>

### c) Rastreio

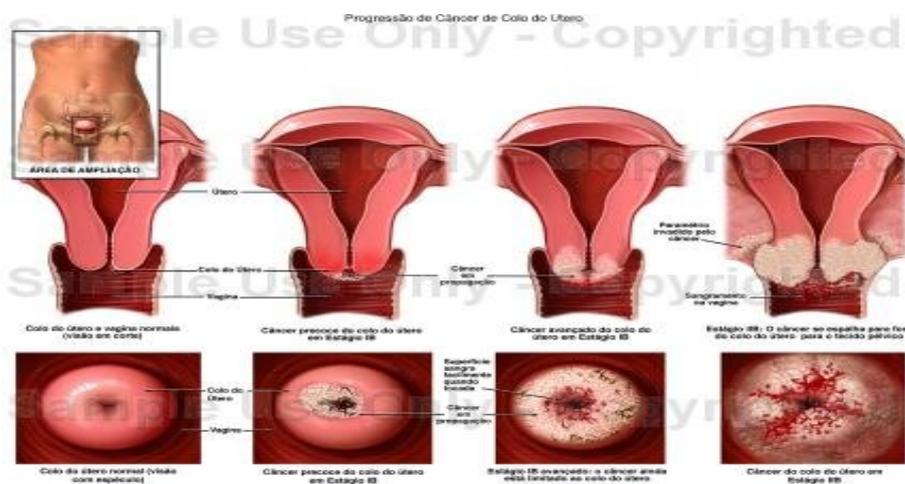
O cancro do colo do útero ocorre quando as células do colo do útero são infectadas por um ou mais tipos de HPV de alto risco. O rastreio é usado para detectar as mulheres que têm células anormais no colo do útero num momento pré-neoplásico precoce, numa altura em que ainda podem ser removidas de forma a não evoluírem para cancro. Devem fazer parte do rastreio todas as mulheres com idades compreendidas entre os 25 e os 65 anos.

Inicialmente, o rastreio deve ser feito uma vez por ano, depois de ter dois resultados de exame de Papanicolaou normais, deve fazer o rastreio de três em três anos. O rastreio do colo do útero proporciona a melhor protecção possível se for repetido com regularidade.

(www.ipoport)

#### d) Caracterização dos tumores

O cancro do colo do útero tem vários estádios de evolução conforme se ilustra na figura 1, que são: estadio 0- o cancro é detectado apenas na camada celular superior do tecido que reveste o colo do útero. O estadio 0 também é designado por carcinoma *in-situ*; estadio I- o cancro invadiu o colo do útero abaixo da camada superior das células. É apenas detectado no colo do útero; estadio II- o cancro disseminou-se para os tecidos adjacentes. Estendeu-se até à parte superior da vagina. O cancro não invadiu o terço inferior da vagina ou a parede pélvica; estadio III- o cancro atingiu a parte inferior da vagina. Também pode ter-se disseminado para a parede pélvica e para os gânglios linfáticos adjacentes; estadio IV- o cancro disseminou-se para a bexiga, recto ou outras regiões; cancro recorrente – significa que o cancro foi tratado, mas ocorreu uma recidiva após um período de tempo durante o qual não foi possível detectá-lo. O cancro pode reaparecer no colo do útero ou noutras regiões do organismo. (Bibbo, M. , 1998)



**Figura 1. Representação esquemática dos diferentes estádios do cancro do colo do útero**

#### e) Classificação da citologia Ginecológica segundo Bethesda

A classificação segundo Bethesda, é a usada actualmente para classificar a citologia ginecológica.

A citologia pode ter as seguintes classificações: negativa para lesões intraepiteliais malignas, *negative for intraepithelial lesion or malignancy* (NILM); células pavimentosas atípicas de significado indeterminado, *atypical squamous cells of undetermined significance* (ASC-US) Atipia das células glandulares, *Atypical glandular cells* (AGC);

Lesão intraepitelial de baixo grau, *low-grade squamous intraepithelial lesion* (LIEBG); células pavimentosas atípicas de não excluir alto grau, *atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion* (ASC-H); lesão intraepitelial de alto grau, *high-grade squamous intraepithelial lesion* (LIEAG); Adenocarcinoma endocervical *in situ*, *adenocarcinoma in situ of endocervix* (AIS); carcinoma *in situ*, *carcinoma in situ* (CIS); neoplasia cervical intraepitelial, *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). <sup>(Solomon, 2003)</sup>

Existem outras classificações que não estão aqui representadas, sendo estas as mais comuns.

Ao realizar o screening são tidos em conta várias características presentes nas células que levam a um destes diagnósticos.

#### f) Tratamento

A maioria das células cervicais anormais irá desaparecer espontaneamente, sem tratamento. Por vezes, quando isso não acontece ou quando as alterações são graves, as células cervicais anormais devem ser removidas, de forma a não haver progressão para cancro do colo do útero. Existem vários métodos de tratamento disponíveis, que são: a crioterapia que consiste em colocar uma pequena placa de metal congelada no colo do útero de modo a congelar as células anormais. A crioterapia pode ser realizada em consultas de ginecologia. Quase não provoca dor e, em regra, não precisa de um anestésico local; o laser, neste procedimento, é usado um laser para aquecer as células anormais, de modo a que estas se evaporem. A terapêutica por laser é, em regra, realizada nas consultas de ginecologia. Em alguns casos é necessário recorrer a um anestésico local porque pode provocar dor; outro modo de tratamento é a realização da conização, que consiste em retirar um fragmento de tecido com a forma de um cone, da zona de transição do colo do útero. Isto pode ser feito recorrendo a uma ansa metálica, ao laser ou a uma faca especial. Este tratamento pode ser feito com um anestésico local ou com anestesia geral. Se administrada uma anestesia geral, pode ser necessário ficar uma noite no hospital.

([www.ecca.info/pt](http://www.ecca.info/pt))

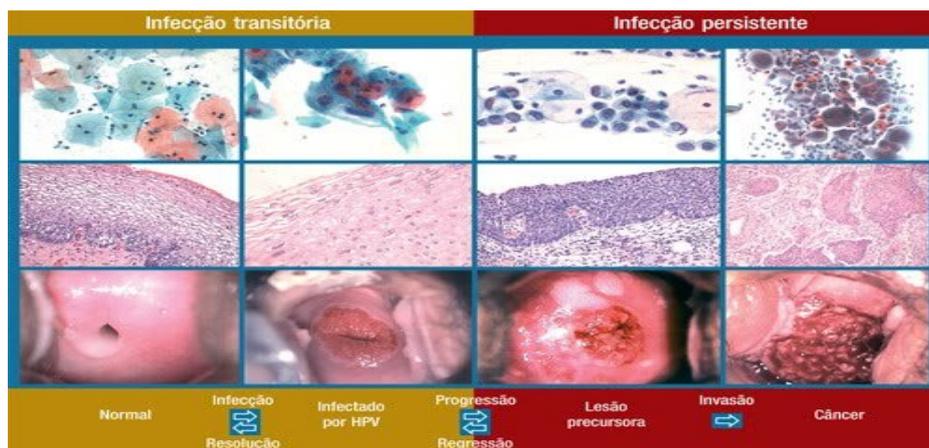
## **2. HPV**

Alguns tipos de HPV estão associados a lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, designados de tipos de HPV de alto risco, como por exemplo, 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68. Outros tipos que a probabilidade de causarem cancro é baixa são designados por tipos de HPV de baixo risco, sendo estes como exemplo, 6,11,42,44,53,54,62 e 66. O tipo HPV

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

16 é responsável por cerca de 50% dos carcinomas do colo do útero e o tipo de HPV 18 por cerca de 15%.<sup>(Thomas, T. J., et al., 1999, Bechtold, V., et al., 2003)</sup>

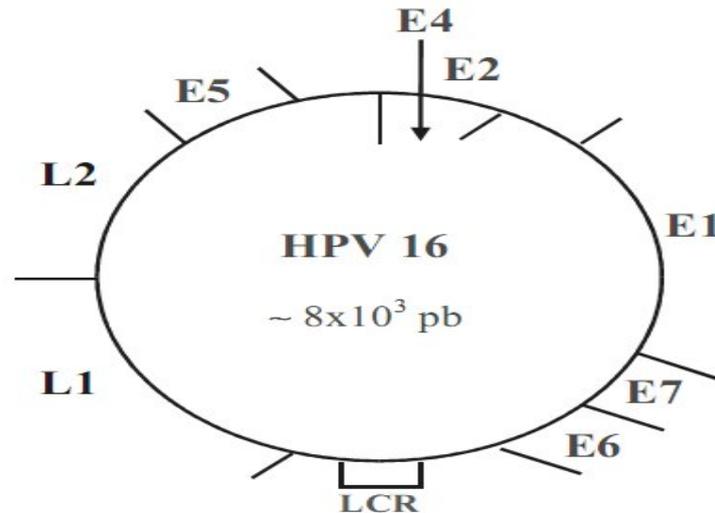
Muitas infecções causadas por tipos de HPV de baixo risco, são benignas, transitórias, e resolvem-se espontaneamente no espaço de 1 a 2 anos. Normalmente as infecções por HPV de alto risco persistem, e são a causa das lesões pré-neoplásicas, e se não forem detectadas e tratadas a tempo podem evoluir para cancro como mostra a figura 2.<sup>(Thomas, T. J., et al., 1999, Bechtold, V., et al., 2003)</sup>



**Figura 2. Progressão do cancro do colo do útero infectado pelo HPV**

Os vírus do papiloma humano são classificados na família Papillomaviridae.<sup>(Nelson, L.M., et al., 2002, Fehrman, F., et al. 2003)</sup> São vírus não capsulados, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadeia dupla circular, constituído aproximadamente de 6.800 a 8.400 pares de bases.<sup>(Nelson, L.M., et al., 2002, ZurHausen, H., et al., 2000)</sup>

O genoma do HPV é constituído por aproximadamente oito *open readingframes* (ORF), possuindo pelo menos seis genes que se expressam precocemente, (*Early*) E e dois genes que se expressam tardiamente, (*Late*) L, representado na figura 3.<sup>(Rosenstierne, M.W., et al., 200, Sails, A.D., 2009)</sup>



**Figura 3. Genoma do HPV 16. Genoma circular de dupla-fita, mostrando organização e localização dos genes. LCR: Região Longa de Controle.**

A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, dentro destes, E1 está envolvido na replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular. (Rosenstierne, M.W., et al., 2003, Lee, D., et al., 2000, Berkhout, R. J. M. et al., 2000, Silva, A. M. T. C., et al., 2003)

A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo. Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora (*Long ControlRegion*) LCR ou (*UpstreamRegulatoryRegion*) URR, variando de 400 a 1000 pares de bases, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação. (Jacob SE, 1992, Lee, D., et al., 2000, Med06)

Actualmente considera-se um novo tipo de HPV quando as sequências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 diferirem em mais de 10% dos tipos conhecidos. Se esse percentual for menor que 2%, então, o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas cuja sequência nucleotídica nessas regiões genicas diferem entre 2% e 10% dos tipos já descritos. (Lee, D., et al., 2000, Stubenrauch, F., et al., 1999)

A diferença entre os tipos de HPV encontrados em tumores benignos e malignos permite classificá-los como HPV de baixo e alto risco. (Jacob SE, 1992, Med06, ESTSP,2004)

As diferenças genômicas, entre os HPV de alto e baixo risco, acabam por auxiliar no entendimento das acções virais junto ao genoma da célula hospedeira, e até justificam as diferenças na capacidade de transformação destes agentes. De forma contrastante, a presença do genoma viral extracromossomal (epissomal) nos tumores benignos ou normalmente a forma linear (integrada) nos tumores malignos acaba por determinar um

comportamento viral mais agressivo nas regiões infectadas por HPV. (García-Carrancá ,A., et al., 1993, Bosch, F.X., et al., 2001, ThomasCox, J., et al., 2009)

A integração do genoma viral parece ocorrer ao acaso. Se, por um lado, não há sítio preferencial de integração no genoma, por outro, há uma grande especificidade no local de clivagem do ADN circular do vírus, como no caso dos tumores malignos, onde a integração do ADN viral ocorre devido à clivagem na região dos genes E1/E2, com consequente interrupção do controle transcripcional exercido pelo gene E2. (FMUP,2007, Lamarq, L., et al., 2002)

A proteína codificada pelo gene E2 é um factor que regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7. (Rosenstierne, M.W., et al., 2003, Berkhout, R. J. M. et al., 2000)

A proteína E6 de HPV de alto risco associa-se à proteína p53, que regula a passagem pelas fases G1/S e G2/M. E6 recruta as proteínas celulares, como é o caso das proteínas da família AP1 (E6-AP) que funcionam como uma ubiquitina ligase, actuando no complexo p53, podendo impedir o efeito supressor tumoral da proteína no ciclo celular. A formação deste complexo proteico resulta na ubiquitinação do p53 seguido da sua rápida degradação mediada por um complexo proteossomático. E6, além de reprimir a acção do p53, também tem como função a actividade de telomerase, podendo associar-se com proteínas ligantes do cálcio ERC55, factores de resposta do Interferon, IRF3, ou, até mesmo, associar-se a proteínas de integração viral. (Jacob SE, 1992, Neves, D., et al., 2002, Burd, E. M., 2003, Cavalcanti , S.M.B., et al.,2000, Alvarez, I. A., et al., 1997)

A principal função do gene E7 dos HPV de alto risco é desregular o ciclo celular da célula infectada principalmente pela indução da transição da fase G0/S. Isto é efectuado através da activação de vários genes celulares pela E7 e pela interacção dessa proteína com as proteínas que regulam o ciclo celular.

A proteína E7 do HPV de alto risco liga-se às proteínas da família retinoblastoma (Rb). Esta interacção permite a libertação de factores de transcrição (E2F) o que levará a uma progressão do ciclo celular. E7 também forma complexos com ciclinas A e E, bem como provoca a inactivação de p21 e p27. (Burd, E. M., 2003)

Os genes E6 e E7 são considerados os genes de maior poder de transformação do vírus papiloma humano. Acredita-se que a expressão das proteínas E6 e E7 seja responsável pelo início e a manutenção do processo que culmina no cancro cervical.

### **3. Cuidados no laboratório de Biologia Molecular**

O manuseamento de ácidos nucleicos purificados, ou dos espécimes biológicos de onde estes serão extraídos requer alguns cuidados especiais. O manuseamento de espécimes biológicos requer cuidados no sentido de proteger o operador de quaisquer riscos microbiológicos e/ou químicos associados à amostra. É necessário proteger as amostras do operador, devido ao facto de todos os seres humanos possuírem nos dedos e palmas das mãos quantidades significativas de DNases e RNases. A função biológica destas enzimas consiste em atacar todo e qualquer DNA e RNA potencialmente viral e portanto com risco patológico. Assim, é essencial em todo o processo isolar os espécimes das mãos do operador, o que se consegue utilizando luvas durante todos os procedimentos. Também os equipamentos e superfícies de trabalho devem ser descontaminados, existindo para tal reagentes que degradam as DNases e RNases. O mesmo tipo de preocupações obriga a que as amostras biológicas sejam também processadas com recurso a reagentes e produtos descartáveis isentos de DNases e RNases. No entanto, as próprias amostras biológicas são potenciais fontes destas enzimas, pelo que se torna imperativo inactivá-las. Por este motivo, o processamento de ARN é bem mais difícil que o de ADN, já que as RNases são bem mais estáveis que as DNases, e ao contrário destas não necessitam de cofactores para funcionarem. Finalmente, é necessário proteger os espécimes a analisar de contaminações cruzadas provenientes de outros trabalhos em curso no mesmo laboratório e referentes a outras amostras. (ESTSP,2004)

### **4. *Polimerase ChainReaction* (PCR)**

O *Polimerase ChainReaction* (PCR) é um procedimento rápido para a amplificação enzimática *in vitro* de segmentos específicos de ADN. A base teórica do PCR é muito simples, baseando-se na propriedade das polimerases do ADN para catalisar a formação de uma cópia de uma cadeia de ADN, apenas quando encontram uma extremidade 3' livre. Desta forma, foi possível partir de uma molécula de ADN de cadeia dupla, desnaturá-la pelo calor, baixando de seguida a temperatura até um valor que permita a ligação específica de um oligonucleótido sintético, específico para a região 5' do segmento a amplificar. Depois desta hibridação específica, a polimerase inicia então a síntese da cadeia complementar ao “molde”. Entretanto, um processo semelhante deverá ter ocorrido em simultâneo para a restante cadeia da dupla hélice inicial, pelo que no fim deste ciclo,

efectivamente foi duplicada a quantidade de ADN da zona de interesse. O processo prossegue com nova desnaturação pela temperatura, repetindo-se este ciclo um número definido de vezes. Como em cada ciclo se duplica a quantidade de ADN de interesse que existia no início, no final do processo amplificamos 2<sup>n</sup> vezes o segmento de ADN.

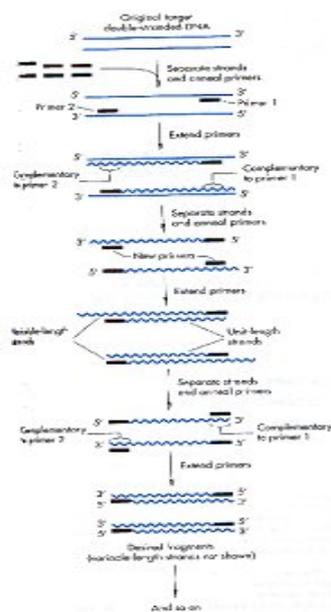


Figura 4. Esquema do funcionamento do PCR

Para implementar este procedimento é necessário incluir na mistura de reacção não só o ADN a estudar, mas também os oligonucleótidos específicos (primers), desoxinucleótidostrifosfatados (dNTP's), e uma polimerase do ADN termoestável (para resistir às flutuações de temperatura necessárias para realizar as várias fases da reacção). Outros componentes são adicionados, para que as condições de reacção sejam as ideais para a enzima utilizada. Um dos componentes que todas as enzimas até agora descobertas utilizam é o MgCl<sub>2</sub>, de cuja concentração depende da especificidade, e qualidade do DNA amplificado. Os primers são utilizados em excesso relativamente ao DNA a ser amplificado. Os primers são desenhados para que um tenha a sequência complementar invertida da extremidade 3' do segmento a amplificar (*primerforward*), o outro primer é desenhado de forma a ter a sequência da extremidade 5' do fragmento a amplificar (*primer reverse*). Scully C., 2002, Dhanasekaran, S.T., et al. 2010, Rivoire, A.W., et al., 2001, Silva, A. M. T. C., et al., 2003, Bibbo, M., 1998

É um facto que o cancro do colo do útero continua a ser um grave problema de saúde em Portugal. Sendo uma neoplasia provocada por um vírus, é possível agora fazer o seu

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

rastreio e a sua prevenção através da vacinação e da formação acerca dos vários factores de risco conhecidos.

Todos os estudos nesta área têm sempre em atenção a melhoria da qualidade de vida das mulheres, durante e após o tratamento, bem como a diminuição da probabilidade de morte por cancro do colo do útero.

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

## II. Objectivos

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

- Com este projecto tem-se como objectivo verificar se existe evolução para lesão em pacientes com resultado de citologia ginecológica normal e com tipagem de HPV de alto risco positiva.
- Demonstrar a vantagem da detecção da integração do vírus no genoma como meio de prognóstico de evolução da doença.

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

### **III. Material e Métodos**

### **1.Caracterização da Amostra**

Para este estudo foram usados 51 casos de arquivo pacientes do Hospital Pedro Hispano. A amostra foi seleccionada a partir dos seguintes critérios: a citologia ginecológica ser negativa (NILM) e positiva para HPV de alto risco, sendo que o intervalo de tempo para recolha de amostra é desde o início de 2009 até ao final de 2010. Os resultados da citologia ginecológica considerados foram os elaborados pelo serviço. A positividade para HPV de alto risco foi considerada nos casos em que se registou uma amplificação até aos 40 ciclos, segundo as indicações na bula do método utilizado. Em dezasseis casos destas 51 mulheres também foi feita colheita de fragmentos para análise histológica.

A média de idades é de 35 anos, sendo o limite mínimo de 22 e o máximo de 58 anos.

### **2.Extracção de ADN**

As amostras de citologia ginecológica líquida chegaram ao Serviço no meio de colheita *Papspin-Collection Fluid* da *ThermoScientific*.

Das amostras de citologia ginecológica que entraram no Serviço de Anatomia Patológica, foram usadas as positivas para HPV de alto risco e com um resultado citológico NILM pela classificação de Bethesda, num total de 51 casos. Da segunda colheita e após a realização dos procedimentos de rotina do serviço, foi retirado 1mL de cada amostra para a realização da extracção de ADN, esta técnica foi realizada no aparelho *MagCore HF16*, da marca *Texas BioGeneInc.* seguindo os passos do manual do utilizador do *EZmag<sup>tm</sup> Genomicviral Nucleic Acid Extraction Kit*.

### **3.PCR em tempo real**

Findada a extracção, retirou-se uma pequena quantidade de amostra extraída e seguiu-se o procedimento para a realização do PCR em tempo real, no aparelho *StepOne* da *AppliedBiosystems*, seguindo o manual de utilização do Kit de PCR em tempo real para 13 HPV de alto risco, da marca *HybriBio*. Em todos os procedimentos foram usados controlos negativos e positivos de modo a tornarem a técnica mais fiável e precisa.

### **4.Analise de resultados**

No final após a realização de todos os procedimentos necessários, fez-se a interpretação dos resultados. Para avaliação dos resultados foram usados os testes de estatística descritiva, nomeadamente os de frequência.

## **5.Ética**

As amostras utilizadas são de pacientes do sexo feminino, do Hospital Pedro Hispano, do Serviço de Anatomia Patológica. O Serviço autorizou a utilização de amostras de citologia ginecológica em meio líquido, em que já tivessem sido realizados os procedimentos de rotina do serviço. Este projecto não comprometeu os procedimentos de rotina do Serviço.

Foi respeitada a confidencialidade, anonimato e pressupostos éticos conforme a Lei nº67/98, de 26 de Outubro e a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996, Edimburgo 2000; Washington 2002, Tóquio 2004, Seul 2008).

## **IV. Resultados**

A amostra inicial é constituída por 51 casos, com idades variadas, sendo a média de idades de 35 anos.

Durante o estudo foram analisados tantos os dados citológicos como alguns dados de análise histológica. Verificou-se que em 26 pacientes, após a primeira e segunda colheita, foram retirados fragmentos para análise histológica, sendo que 13 eram biopsias e 13 eram peças de conização.

Na tabela seguinte observa-se, a distribuição e frequência dos resultados obtidos nas colheitas de fragmentos efectuadas.

**Tabela 1. Resultados do diagnóstico histológico da 1ª e 2ª colheita de fragmentos**

<b>Diagnóstico Histológico</b>	<b>1ª colheita de fragmentos</b>	<b>2ª colheita de fragmentos</b>
<b>Negativa</b>	2	0
<b>CIN 1</b>	11	5
<b>CIN 2</b>	1	3
<b>CIN 3/CIS</b>	2	2
<b>Total</b>	16	10

**Legenda:** CIN1 - neoplasia cervical intraepitelial 1 (baixo grau); CIN2 - neoplasia cervical intraepitelial 2 (alto grau); CIN3/CIS - neoplasia cervical intraepitelial 3/ carcinoma *in situ*.

Verifica-se, ao analisar a tabela 1, que a primeira colheita de fragmentos foi realizada em 16 pacientes. Destes, 2 casos são negativos, 11 casos são CIN1, 1 caso CIN2 e 2 casos são CIN3/CIS. Constata-se também que em 10 casos foi realizada uma 2ª colheita de fragmentos, sendo que 5 destes casos são CIN1, 3 casos CIN2 e 2 casos CIN3/CIS.

Dos 26 casos em que se realizou análise histológica, 4 casos tiveram 1ª e 2ª colheita de fragmentos. Ao comparar os resultados verificou-se que a 2ª colheita de fragmentos confirmou a primeira.

Ao contabilizar os números de casos onde se efectuou uma segunda colheita, de modo a acompanhar a evolução para lesão, verificou-se que houve 14 casos que se perderam para follow-up, como mostra a tabela 2.

**Tabela 2. Número de casos onde foi efectuada 2ª colheita e tipagem de HPV**

	<b>Com 2ª Colheita</b>	<b>Sem 2ª Colheita</b>	<b>Total</b>
<b>n</b>	37	14	51
<b>Com Tipagem de HPV</b>	23	0	23
<b>Sem Tipagem de HPV</b>	14	0	14

Verifica-se ainda que dos 37 casos em que se efectuou a 2ª colheita, em 14 não foi feita a tipagem de HPV de alto risco e em 23 fez-se a tipagem de HPV de alto risco.

Como é possível verificar, o nosso número total de casos em que existe dados tanto de citologia ginecológica como da tipagem de HPV de alto risco ficou reduzido a 23.

Destes 23 casos, analisou-se tanto o resultado da citologia ginecológica como o resultado da tipagem de HPV de alto risco, como é possível observar na tabela 3.

**Tabela 3. Resultados de tipagem de HPV de alto risco e diagnóstico citológico na 2ª colheita**

<b>Diagnóstico Citológico</b>	<b>HPV (+)</b>		<b>HPV (-)</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Negativas (NILM, ASC-US e ASC-H)</b>	7	30,43	10	43,48
<b>LIEBG</b>	1	4,35	3	13,04
<b>LIEAG</b>	2	8,70	0	0,00
<b>Total</b>	10	43,48	13	56,52

**Legenda:** NILM - negativa para lesões intraepiteliais malignas; ASC-US - células pavimentosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H - células pavimentosas atípicas de não excluir alto grau; LIEBG - Lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG - Lesão intraepitelial de alto grau.

Na tabela acima verifica-se que dos 23 casos, 13 foram negativos para HPV de alto risco e destes 10 têm uma citologia normal e 3 casos têm lesão de baixo grau (LIEBG). Dos restantes 10 casos que foram positivos para HPV de alto risco, 7 casos continuaram negativos na citologia ginecológica, 1 caso tem lesão de baixo grau (LIEBG) e 2 casos têm uma lesão de alto grau (LIEAG).

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

## **V. Discussão**

Através da análise destes resultados verifica-se que ao longo do estudo a nossa amostra inicial foi sendo reduzida. Em muitos dos casos iniciais não foi realizada uma segunda colheita para análise da citologia ginecológica, isto pode ser devido aos métodos que a clínica aplica tendo em conta o historial das pacientes, outro motivo é que as mulheres podem ter continuado a ser seguidas noutra instituição.

Nos casos em que não houve evolução para lesão, a causa pode ter a ver com o tratamento aplicado, sendo este decidido pela clínica levando em conta a opinião esclarecida da paciente.

De entre os casos (37) onde existe uma segunda colheita mas não se realizou a detecção do HPV de alto risco, observou-se que houve dois casos que evoluíram para uma lesão de baixo grau. Nestes casos seria importante a realização da tipagem de HPV, uma vez que pode estar presente um tipo de vírus de alto risco, e continuar a seguir estas duas pacientes para avaliar a evolução que teriam, ou a sua regressão, uma vez que este tipo de lesão pode regredir devido a resposta do organismo ou então através de um tratamento.

Ao realizar-se a detecção de HPV de alto risco nas amostras em que se fez segunda colheita (23), obtiveram-se três casos negativos. Algumas das justificações possíveis para estes resultados, podem estar no facto de estas amostras serem positivas para um tipo de HPV de baixo risco, ou então serem positivas para um tipo de HPV de alto risco que não está incluído no painel de tipos detectado pelo método aplicado no estudo, uma vez que só faz screening de treze tipos. Para este resultado seria importante fazer a genotipagem do HPV, uma vez que evoluíram para uma lesão de baixo grau.

Nos casos em que se obteve uma evolução para lesão e com persistência da positividade do HPV de alto risco, foi revista a lâmina da primeira colheita e o diagnóstico foi alterado um deles para lesão de baixo grau e o outro para uma lesão de baixo grau não excluindo alto grau. Foi também analisado o tempo de follow-up, e verificou-se que num deles foi de dois anos e no outro três meses. Uma vez que o resultado da primeira colheita não se confirmou após a revisão da lâmina, seria importante fazer a genotipagem do HPV para verificar se o vírus presente é um dos mais agressivos descritos na literatura. Nestes casos também seria interessante fazer outros tipos de técnicas que conseguissem quantificar a expressão dos oncogenes E6/E7, tendo-se assim uma ideia da quantidade de ADN viral integrado no genoma da mulher.

Podemos verificar ainda que 17 casos, dos vinte e três que têm segunda colheita e detecção de HPV de alto risco, foram considerados normais (NILM) na avaliação citológica, o que

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

ainda é um número significativo, o que vem corroborar os estudos já realizados, segundo os quais o rastreamento através do screening da citologia ginecológica continua a ser o método de eleição.

## **VI. Conclusão**

Com este trabalho não foram obtidos resultados significativos, devido ao número reduzido de amostras, e à variabilidade do número de casos ao longo do estudo, dificultando o alcance do objectivo principal proposto.

Podemos concluir ainda que dos casos que têm segunda colheita e detecção de HPV de alto risco, ainda houve um número significativo de normais (NILM), o que vem corroborar os estudos já realizados, que o rastreio através do screening da citologia ginecológica continua a ser o método de eleição, por aliar o menor custo à eficácia do mesmo.

Como conclusão, podemos ainda dizer que o facto de haver poucos casos (2) que evoluíram para lesão de alto grau, quer dizer que o acompanhamento, e o tratamento aplicado se está a mostrar eficaz.

Com um tempo mais prolongado de acompanhamento e com um número mais elevado de amostras poder-se-á chegar a uma conclusão mais significativa.

Para trabalhos futuros fica em aberto a realização de testes genotipagem dos tipos de HPV presentes nas amostras em que houve evolução para lesão de alto grau, assim como a quantificação dos oncogenes E6/E7.

Estudo da evolução do estado clínico de mulheres com amostras de citologia ginecológica negativa e teste para HPV de alto risco positivo

## **VII. Bibliografia**

Alvarez IA, Lazo PS, Gonzales SR, Tapia PR, Batalla FN, Nieto CS. Using polymerase chain reaction to human papillomavirus in oral and pharyngolaryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol.* 1997;18(6):375-81.

Bechtold V, Beard P, Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.* 2003;77(3):2021-8.

Berkhout RJM, Bavink JNB, terScheget J. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J ClinMicrobiol.* 2000;38(6):2087-96.

Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.

Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J ClinPathol.* 2001;54:163-75.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *ClinMicrobiol Rev.* 2003;16(1):1-17.

Cavalcanti SMB, Zardo LG, Passos MRL, Oliveira LHS. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect.* 2000;20:80-7.

Escola Superior de Saúde do Vale do Sousa, Aulas de Biologia Molecular, 2004

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Seminário de Biopatologia, HPV e carcinoma do colo do útero, , 2007

Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 2003;22:5201-7.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P., et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical Human Papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infec Disea,* 180:1415:23. 1999.

García-Carrancá A, Gariglio P. Aspectos moleculares de lospapillomavirushumanos y surelación com el câncer cervicouterino. *Rev Invest Clín.* 1993;45:85-92.

Jacob SE, 1992. Amplificação e deteção simultâneas de seqüências específicas do ADN

J.ThomasCox,AnnT.Moriarty and Philip E. Castle, 2009

Laurence Lamarq, James Deeds, David Ginzinger, Jean Perry, Siddhartha Padmanabha and Karen Smith-McCune, 2002

Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2 dependent transcription. *J BiolChem*. 2000;275(10):7045-51.

Mackay, I.M. et al.2002.Real- Time PCR in Virology. IN: Nuclaeic Ácids Research 30(6): 1292-1305

medicina.med.uo.pt/bcm/trabalhos/2006/sempr.ppt, consultado em 12 de Setembro de2010

Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23958-64.

Neves D, Camara GNL, Alencar TR, da Cruz MR, Martins CRF, Carvalho LGS. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. *Braz J Urol*. 2002;28(3):221-6.

Rivoire AW, Capp E, Carleta EH, Silva BSI. Bases biomoleculares da oncôgenese cervical. *Rev Bras Cancerol*. 2001;47(2);179-84.

Rosenstierne MW, Vinther J, Hansen CN, Prydsoe M, Norrild B. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 2003;84:2909-20.

S. Dhanasekaran,T. Mark Doherty, John Kenneth and TB Trials Study Group. (2010 Mar). "Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification". *ImmunolMethods*.354 (1-2): 34–9.

Sails AD (2009). "Applications in Clinical Microbiology". *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press

Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol*. 2002;38:227-34.

Silva AMTC, Amaral MVT, da Cruz AD. O papel do papiloma vírus humano no câncer. *BiotechnolCiêncDesenvol*. 2003;29:48-54.

Stubenrauch F, Laimins LA. Human Papillomavirus life cycle: active and latent phases. *CancerBiol*. 1999;9:379-86.

Thomas TJ, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:8449-54.

Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavirus. In: Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 51-8.

[www.ipoportorito.min-saude.pt/formacaoeensino](http://www.ipoportorito.min-saude.pt/formacaoeensino), consultado a 29 de Setembro de 2011 31.  
[www.ecca.info/pt/cervical-cancer-prevention/vacinacao-contra-o-hpv.html](http://www.ecca.info/pt/cervical-cancer-prevention/vacinacao-contra-o-hpv.html), consultado a 29 de Setembro de 2011

ZurHausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):690-8.