

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Toni Ricardo Martins

**DETECÇÃO MOLECULAR DO DNA E RNA_m DO HPV E SUA
APLICABILIDADE NA TRIAGEM DO CÂNCER CERVICAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na área de concentração em Análises Clínicas.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M386d Martins, Toni Ricardo
Detecção molecular do DNA e RNAm do HPV e sua
Aplicabilidade na triagem do câncer cervical [dissertação] /
Toni Ricardo Martins ; orientadora, Maria Luiza Bazzo.
- Florianópolis, SC, 2011.
130 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Vírus do papiloma. 3. Neoplasias do
Colo. 4. Tipagem. I. Bazzo, Maria Luiza. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Dedico este trabalho à minha filha Bettina e
aos meus pais Antônio e Irene Martins.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À professora Maria Luiza Bazzo pela oportunidade oferecida, orientação e enriquecimento, além da amizade nesta etapa de mudança e crescimento pessoal. Minha especial gratidão, obrigado pelo desafio!

Ao professor Edison Natal Fedrizzi pela coleta das amostras que possibilitaram o trabalho, além da colaboração científica.

À professora Rosemeri Maurici pela colaboração científica.

À professora Cidônia Vituri pela indicação e apoio para essa conquista.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias pela ajuda e ótima convivência durante o tempo de trabalho: Carine, Christiane, Letícia, Simone, Susie, Eduardo, Gabriel e Luciana, há vocês muito obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias pelo auxílio e convivência, em especial a Ana Carolina, Manoela e Marley e a Profa. Maria Cláudia.

Aos professores José Eduardo Levi e Jaquelline Germano de Oliveira pela colaboração enviando os controles positivos do trabalho, além do apoio científico.

Ao Fabrício Branco pelo convívio e amizade durante este período.

Às minhas irmãs Karla e Rafaela e meu sobrinho Kaio pelo companheirismo e incentivo.

Ao Eugênio, Marli e família pela acolhida na chegada a Florianópolis.

Por fim, meu agradecimento a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*
(Albert Einstein)

RESUMO

O câncer de colo uterino representa o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres. As estimativas mundiais sobre incidência e mortalidade por este câncer são de 493.000 casos/ano e 288.000 óbitos/ano, sendo a incidência maior em países em desenvolvimento. No Brasil, para o ano de 2010, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou-se 18.430 novos casos. O rastreamento do câncer cervical é baseado na citologia oncótica, entretanto este é um método subjetivo, com um grau variável de resultados falso-negativos e falso-positivos. Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram importante associação entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o câncer de colo uterino, observando que este agente está presente em 99,7% dos casos. Este estudo detectou o DNA do HPV pela PCR (PCR-HPV) utilizando os iniciadores consenso MY09/MY11 e *nested* PCR com os iniciadores GP5+/GP6+, a expressão de E6/E7 RNAm dos tipos de HPVs de alto risco 16, 18, 31, 33 e 45 pela metodologia NASBA (NucliSens® HPV EasyQ 1.0-BioMérieux, France) e identificou os principais tipos virais: 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 45 pela PCR-HPVte. Os resultados foram comparados com a citologia oncótica para estimar o rendimento da PCR e a contribuição da expressão de E6/E7 RNAm ao diagnóstico precoce do câncer cervical na população do estudo. Foram estudadas 162 amostras cervicais de mulheres atendidas em Florianópolis. A sensibilidade encontrada para a detecção do DNA-HPV pela PCR foi de 90,6%, especificidade de 74,6%, VPP de 46,8% e VPN de 97%. O DNA do HPV pela PCR foi detectado em 38,3% (62/162) das amostras, em 90,6% (29/32) das citologias classificadas como positivas (ASC-US +) e em 25,4% (33/130) das citologias classificadas como negativas. A expressão de E6/E7 RNAm foi detectada em 13,6% (22/162) das amostras, dessas 6,9% (9/130) foram classificadas como citologia negativa. A PCR-HPVte identificou o tipo viral em 37,1% (23/62) das amostras. Os tipos de HPVs mais frequentes do estudo considerando-se a expressão de E6/E7 RNAm e a PCR-HPVte foram: HPVs: 16 (12,5%), 33 (10,9%), 18 (7,8%), 6 (6,3%), 31 (4,7%), 45 (4,7%) e 11 (1,6%). Das 22 amostras que expressaram E6/E7 RNAm 15 eram de pacientes com idade inferior a 30 anos. De acordo com os dados encontrados neste estudo, consideramos importante, no Brasil, a mudança das estratégias de rastreamento com a associação da PCR-HPV à citologia oncótica, pois esta parece ser uma alternativa economicamente viável. A identificação das pacientes com DNA HPV positivas seguidas da determinação do tipo viral pelo método da PCR-

HPVte, ou realização da expressão de E6/E7 RNAm poderá contribuir com o diagnóstico precoce do câncer cervical, assim como na elaboração e no desenvolvimento de vacinas anti-HPV. A possibilidade de intervenção precoce, além de salvar vidas pode ser uma medida de economia para o SUS.

Palavras-chave: HPV, Câncer cervical, PCR, E6/E7 RNAm, tipagem.

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION OF HPV DNA AND THE mRNA: APPLICABILITY IN CERVICAL CANCER SCREENING

The Cervical cancer is the second more frequent type of cancer in women worldwide. The majority of cases occur in the developing world and it is the leading cause of cancer mortality in women. In Brazil, was estimated the occurrence of 18.430 new cases for 2010. The cervical screening is based on cytology; however it is subject of a substantial degree of false-negative and false-positive results. Epidemiological and experimental studies have demonstrated an important association between Human Papilloma Virus (HPV) and cervical cancer, noting that this agent is present in 99.7% of cases. This study detected HPV DNA by PCR (PCR-HPV), the expression of mRNA E6/E7 by the NASBA method (NucliSens ® HPV EasyQ 1.0-BioMérieux, France) and identified major viral types 6, 11, 16, 18 31, 33 and 45 by PCR-HPVte. The results were compared with cytology to estimate the yield of PCR and mRNA E6/E7 expression contribution to early diagnosis of cervical cancer in the study population. We studied 162 cervical samples of women from Florianopolis city, Brazil using the consensus primers MY09/MY11 and nested PCR with the primers GP5+/GP6+ to detect generic HPV, the oncogene expression of proteins E6/E7 mRNA to high-risk 16, 18, 31, 33 and 45 HPV types by NASBA (NucliSens ® HPV EasyQ 1.0-bioMérieux, France) and identified major viral types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 45 by PCR-HPVte. Our study found to PCR-HPV a sensitivity of 90.6%, a specificity of 74.6%, a PPV of 46.8% and a NPV of 97%. HPV DNA was detected in 38.3% (62/162) of samples, corresponding to 90.6% (29/32) of cytology positive (ASC-US +) and 25.4% (33/130) of cytology negative. The mRNA E6/E7 expression was detected in 13.6% (22/162), 6.9% (9/130) of these with negative cytology. The PCR-HPVte identified viral type in 37.1% (23/62) of samples. The most frequent HPV types found, considering the expression of mRNA E6/E7 and PCR-HPVte were: 16 (12.5%), 33 (10.9%), 18 (7.8%), 6 (6.3%), 31 (4.7%), 45 (4.7%) e 11 (1.6%). Of the 22 samples that expressed mRNA E6/E7 15 were from patients younger than 30 years. According to the data found in this study, we consider important in Brazil, change the screening strategies with the combination of PCR-HPV with the cytological analysis, as this seems to be an economically viable alternative. The identification of patients with positive HPV DNA followed by the determination of viral type by the

PCR-HPV^{te} or detection of the E6/E7 oncogene expression may contribute to the early diagnosis of cervical cancer, as well as in formulating and developing strategies for vaccine-HPV. The possibility of early intervention, save lives and can be a cost-saving measure for the Brazilian Unified Health System.

Keywords: HPV, Cervical cancer, PCR, mRNA E6/E7, typing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética dos tipos de PV identificados.....	31
Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV.....	34
Figura 3: Ilustração do ciclo celular da infecção e principais etapas do ciclo do HPV.....	37
Figura 4: Esquema da degradação da p53 mediada pela E6.....	38
Figura 5: Associação de E7 à proteína do retinoblastoma (pRb)..	39
Figura 6: Progressão mediada pelo HPV ao câncer cervical.....	41
Figura 7: Principais etapas da infecção pelo HPV, evolução para câncer ou resolução da infecção.....	43
Figura 8: Percentual estimado de casos de câncer cervical atribuídos aos tipos de HPV mais freqüentes em todas as regiões do mundo.....	46
Figura 9: Representação da forma linear do genoma do HPV composto pelos genes E, L e da região não traduzida (UTR).....	57
Figura 10: Gel representativo da amplificação do fragmento de 110pb para verificação da presença de inibidores da PCR com os iniciadores para o gene da beta globina.....	71
Figura 11: Gel representativo da amplificação do fragmento genérico de 450pb da região L1 do genoma do HPV com os iniciadores MY09/MY11.....	72
Figura 12: Gel representativo da amplificação do fragmento genérico de 150pb da região L1 do genoma do HPV com os iniciadores GP5+/GP6+.....	73
Figura 13: Representação dos resultados de amostras testadas para expressão de E6/E7 RNAm de HPV.....	76
Figura 14: Distribuição das amostras positivas pelos testes moleculares PCR-HPV (DNA) e expressão de E6/E7 RNAm de acordo com o resultado da citologia oncótica segundo a classificação de Bethesda 2001.....	78
Figura 15: . Gel representativo da amplificação do fragmento de 247pb com os iniciadores para o HPV 18.....	79
Figura 16: Resultados das amostras testadas pela PCR-HPVte....	80
Figura 17: Resultados das amostras positivas na metodologia de expressão de E6/E7 RNAm.....	81
Figura 18: Freqüência dos tipos de HPV identificados.....	82

LISTA TABELAS

Tabela 1. Classificação filogenética e risco dos HPV's anogenitais.....	32
Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação para detecção dos tipos específicos de HPV.....	67
Tabela 3. Distribuição das 162 amostras, segundo a classificação de Bethesda 2001.....	70
Tabela 4. Resultados da citologia oncótica estratificados por faixa etária nas 162 amostras do estudo.....	70
Tabela 5. Resultados da PCR-HPV estratificados por faixa etária nas 162 amostras do estudo.....	74
Tabela 6. Comparação dos resultados da citologia oncótica e da PCR-HPV.....	74
Tabela 7. Distribuição dos resultados das 162 amostras para PCR-HPV segundo a classificação de Bethesda 2001, na citologia oncótica.....	75
Tabela 8. Resultados da expressão de E6 e E7 RNAm estratificados por faixa etária nas 162 amostras do estudo.....	75
Tabela 9. Comparação dos resultados da citologia oncótica e expressão de E6/E7 RNAm.....	77
Tabela 10. Distribuição dos resultados das 162 amostras para RNAm E6/E7 segundo a classificação do Sistema de Bethesda 2001, na citologia oncótica.....	77
Tabela 11. Comparação dos resultados entre os métodos de PCR-HPV e expressão de E6/E7 RNAm.....	78
Tabela 12. Resultado da citologia oncótica comparados com a presença dos tipos de HPV identificados através da PCR-HPVte.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AGUS	Células Glandulares Atípicas
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
ASC-US+	Diagnóstico citológico positivo (ASC-US ou mais)
ASC-H	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau.
°C	Graus Celsius
CE	Comunidade Européia
CEPSH	Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
E1 a E7	Proteínas não estruturais da região precoce (E)
E6-AP	Proteína associada a E6
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
CH2	Captura Híbrida de segunda geração
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISH	Hibridização Molecular <i>in situ</i>
JEC	Junção Escamo-Colunar
L1 e L2	Proteínas do capsídeo da região tardia (L)
LCR	Longa Região de Controle
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro

MS	Ministério da Saúde do Brasil
NASBA	<i>Nucleic Acid Specific Based Amplification</i> - Amplificação baseada na seqüência de ácidos nucléicos
nm	Nanômetro
ORFs	Fases Abertas de Leitura
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
pb	pares de bases
p53	proteína 53
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pRb	proteína do Retinoblastoma
PV	Papiloma Vírus
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Análise de polimorfismos baseada no comprimento dos fragmentos de restrição
RLU	Unidade de Luz Relativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SCC	Carcinoma de Células Escamosas
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris Acetato EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification</i> - Amplificação Mediada por Transcrição
UIA	<i>Human UI small nuclear ribonucleoprotein specific mRNA</i> – Ribonucleoproteína específica para RNA _m
µg	Micrograma
µL	Micro litro
VLPs	<i>Virus-Like Particles</i> - Partículas semelhantes a vírus
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1. PAPILOMA VÍRUS HUMANO.....	29
2.1.1. Histórico.....	29
2.1.2. Classificação do HPV.....	30
2.1.3. Biologia do vírus.....	34
2.1.4. Ciclo da infecção.....	35
2.1.5. Mecanismos da carcinogênese do HPV.....	37
2.1.6. História natural do câncer cervical.....	41
2.1.7. História natural da infecção pelo HPV.....	42
2.1.8. HPV e o câncer cervical.....	44
2.1.8.1. Tipos de HPV e o câncer cervical.....	45
2.1.9. Epidemiologia do câncer cervical.....	46
2.2. VACINAS ANTI-HPV.....	48
2.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV.....	50
2.3.1. Diagnóstico Morfológico do HPV.....	50
2.3.1.1. Citologia Oncótica ou Citopatologia.....	51
2.3.1.2. Histopatologia.....	52
2.3.1.3. Biomarcadores.....	53
2.3.2. Colposcopia.....	53
2.3.3. Diagnóstico Molecular do HPV.....	54
2.3.3.1. Captura Híbrida.....	55
2.3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56
2.3.3.3. PCR em Tempo Real.....	57
2.4. SISTEMAS DE GENOTIPAGEM DO HPV.....	58
2.4.1. PCR tipo específica.....	58
2.4.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism.....	59
2.4.3. Método de detecção da expressão de E6/E7 RNAm....	59
2.5. APLICAÇÕES CLÍNICAS DA TIPAGEM DO HPV.....	60
3. JUSTIFICATIVA.....	62
4. OBJETIVOS.....	63
4.1. OBJETIVO GERAL.....	63
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
5. METODOLOGIA.....	64
5.1. COMITÊ DE ÉTICA.....	64
5.2. AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	64
5.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	64
5.4. EXTRAÇÃO DO DNA.....	65
5.5. PCR PARA O GENE DA BETA GLOBINA.....	65

5.6. PCR PARA HPV (PCR-HPV).....	66
5.7. <i>NESTED</i> PCR.....	66
5.8. PCR TIPO ESPECÍFICA (PCR-HPVte).....	66
5.9. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DO DNA E DOS PRODUTOS DA PCR.....	67
5.10. EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm PELO MÉTODO NASBA.....	68
5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5.12. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA.....	69
6. RESULTADOS	70
6.1. CITOLOGIA ONCÓTICA OU CITOPATOLOGIA.....	70
6.2. PCR DA BETA GLOBINA HUMANA.....	71
6.3. PCR PARA HPV (PCR-HPV).....	72
6.4. <i>NESTED</i> PCR.....	72
6.5. POSITIVIDADE GLOBAL DA PCR-HPV.....	73
6.6. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA COM A PCR-HPV....	74
6.7. EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm.....	75
6.8. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA COM A EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm.....	76
6.9. COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E6/E7 COM A PCR-HPV.....	77
6.10. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA COM A PCR-HPV E A EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm.....	78
6.11. IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE HPV.....	79
6.11.1. PCR-HPVte	79
6.11.2. Expressão de E6/E7 RNAm	80
6.12. TIPOS VIRAIS MAIS FREQUENTES NO ESTUDO.....	81
6.13. COMPARAÇÃO DA PCR-HPVte COM A CITOLOGIA ONCÓTICA.....	82
6.14. COMPARAÇÃO DA PCR-HPVte COM A EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm.....	83
7. DISCUSSÃO	84
8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS	101
9. CONCLUSÕES	102
10. PERSPECTIVAS	103
11. REFERÊNCIAS	104
12. ANEXO	128

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino representa o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres. As estimativas mundiais sobre incidência e mortalidade por este câncer são de 493.000 casos/ano e 288.000 óbitos/ano, sendo a incidência maior em países em desenvolvimento (PARKIN & BRAY, 2006; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; MONSONEGO et al., 2010). No Brasil, para o ano de 2010, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou-se 18.430 novos casos, com um risco aproximado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Contudo, o câncer de colo uterino é uma doença que pode ser prevenida, se as lesões pré-cancerosas forem detectadas em estágios precoces (INCA, 2010).

Estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram importante associação entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o câncer de colo uterino, observando que este agente está presente em 99,7% dos casos (BURD, 2003; FREITAS et al., 2007; CASTELLSAGUÉ, 2008; zur HAUSEN, 2009; INCA, 2010; MOODY & LAIMINS, 2010).

O HPV é o vírus sexualmente transmissível mais comum no mundo, frequente na população sexualmente ativa, uma vez que a maioria das pessoas se expõe ao vírus em algum momento de suas vidas. Apresenta elevada prevalência em ambos os sexos e pode causar verrugas e câncer anogenital (NADAL & MANZIONE, 2006; ROSENBLATT et al., 2005; WOODMAN et al., 2007). Estima-se que pelo menos 50% dos indivíduos adultos sexualmente ativos irão adquirir algum tipo de HPV durante a vida e que 80% das mulheres entrarão em contato com algum HPV até os 50 anos de idade (CASTELLSAGUÉ et al., 2002).

As lesões intraepiteliais cervicais de alto ou de baixo grau que poderão evoluir para o carcinoma estão associadas aos diferentes tipos de HPV de alto risco (oncogênicos), sendo a persistência da infecção destes vírus o principal fator responsável pelo desenvolvimento, pela manutenção de uma neoplasia cervical e progressão para o câncer invasor (KJAER et al., 2002; MOLDEN et al., 2005a). O diagnóstico morfológico da infecção pelo HPV, por meio de esfregaços cervicais (citologia oncológica), conhecidos popularmente como exame preventivo de Papanicolaou, é amplamente utilizado para o rastreamento de populações com a finalidade de detectar as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. O exame de Papanicolaou consiste no estudo das células descamadas, esfoliadas da parte externa (ectocérvice)

e interna (endocérvice) do colo do útero. Atualmente é a estratégia preventiva (rastreamento) mais utilizada na rede de atenção básica à saúde por ser indolor, de baixo custo e eficaz. A coleta da amostra pode ser realizada por diferentes profissionais de saúde treinados (INCA, 2010). Entretanto, é um método que apresenta grande variação de resultados intra e inter-observadores, baixa sensibilidade, aproximadamente 15% a 50% de resultados falso-negativos (FARTHING et al., 1994; ALTIOK, 2003; CARESTIATO et al., 2006a).

Para minimizar a baixa sensibilidade da citologia oncótica, tem-se empregado métodos alternativos com o intuito de identificar mulheres com risco aumentado para o desenvolvimento do câncer cervical e infecções em estágio de latência nas citologias normais ou inflamatórias. Os testes moleculares para detectar o DNA do HPV, ou o RNAm (a expressão gênica das proteínas oncogênicas E6/E7) do vírus têm sido propostos. Esses testes se apresentam como novas estratégias de triagem e uma alternativa na prevenção do carcinoma cervical e suas lesões precursoras (GRCE et al., 1997, SILVA FILHO & LONGATTO FILHO, 2000; ARBYN et al., 2004; MOLIJN et al., 2005; JEANTET et al., 2009). No presente trabalho foram estudadas amostras cervicais de pacientes atendidas em Florianópolis, para detectar o DNA de HPV, o RNA mensageiro das proteínas oncogênicas virais (E6 e E7), os principais tipos virais e comparar os resultados com a citologia oncótica para estimar a contribuição dos testes moleculares ao diagnóstico precoce do câncer cervical na população do estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PAPILOMA VÍRUS HUMANO

2.1.1. Histórico

Até o final da década de 1970 os Papilomavírus (PVs) eram conhecidos apenas como agentes causais de “verrugas” e lesões benignas cutâneas em alguns mamíferos e seres humanos (BERNARD et al., 2005), contudo em 1976 zur Hausen sugeriu a associação entre o vírus e o câncer cervical ampliando o interesse pelo HPV (zur HAUSEN, 1976).

As verrugas genitais, também conhecidas como condilomas, são descritas desde a antiguidade (CLARCK et al., 1965). Registros da Grécia antiga já faziam referência às lesões verrugosas ou papilomatosas em algumas regiões corporais, como as áreas genitais, palmares e plantares, sendo denominadas de *Ficus*, *Thymus*, *Thimion* ou *Condyloma acuminatum*. Os relatos sugeriam a conotação de doença sexualmente transmissível por estar associada a sexo entre indivíduos homossexuais masculinos (BAFVERSTEDT, 1967).

No final do século XV no continente Europeu crescia o interesse pela investigação das doenças genitais devido à alta incidência da sífilis e da gonorréia. De maneira equivocada as verrugas foram associadas a manifestações destas doenças, ou também a irritações da epiderme provocadas pelos agentes de sujeira, decomposição do esmegma e secreções genitais (ORIEL, 1971).

Mesmo sem o conhecimento do agente etiológico, a primeira descrição de alterações morfológicas celulares relacionadas aos HPVs, no epitélio vaginal, foi realizada na década de 1950 através do exame Papanicolaou. Nesta década surgiram suspeitas da transmissão sexual quando se observou verrugas vulvares em mulheres de soldados americanos que retornavam da guerra na Coréia, e tinham verrugas penianas (BARRET et al., 1954 *apud* ROSENBLATT et al., 2005).

Teokharov em 1969 relatou a possibilidade de contato sexual como via de transmissão do vírus, quando observou que mais da metade de suas pacientes que tiveram relação sexual com portadores de verrugas genitais apresentaram as mesmas formações (TEOKHAROV, 1969).

A associação da progressão da infecção pelo papiloma vírus ao câncer foi demonstrada em experimentos com coelhos infectados, nos quais as lesões benignas induzidas por papilomavírus progrediam para um carcinoma invasivo em células escamosas. Observou-se também a participação de cofatores não virais na aceleração do processo de

malignização (SHOPE & HURST, 1933 *apud* CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

Contudo, o interesse no estudo do HPV aumentou de forma realmente expressiva a partir da década de 1970 quando foram descritas, nos exames Papanicolau e em biópsias cervicais, alterações celulares e morfológicas displásicas extremamente relacionadas à presença deste vírus na cérvix uterina (MEISELS, 1976). Naquele mesmo período pesquisas com técnicas de hibridização molecular possibilitaram a detecção e a identificação do DNA dos papilomavírus, permitindo a distinção de vários tipos de HPVs e sugerindo este vírus como os mais importantes agentes na etiologia do câncer cervical (zur HAUSEN, 1977).

Com o uso das técnicas de biologia molecular no século XX, a pesquisa da presença do material genético dos Papilomavírus humanos (HPVs) em amostras de câncer cervical foi sendo ampliada e possibilitou uma classificação dos tipos de HPVs nas lesões. Este fato contribuiu para a elaboração das políticas e dos protocolos para a prevenção do câncer cervical, uma vez que foi possível traçar o risco real de oncogênese numa dada população (DEPUYDT et al, 2007; CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

2.1.2. Classificação do HPV

Os Papilomavírus (PVs) pertencem a um grupo de vírus encontrados em mais de 20 espécies de mamíferos, além de aves e répteis, sendo os Papilomavírus Humanos (HPVs) os mais estudados (de VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005).

De acordo com o *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV), o HPV é membro da família *Papillomaviridae*, gêneros papilomavírus Alfa, Beta, Gama, Delta, Kappa, Lambda, Um, Nu e Zeta entre outros. É capaz de infectar células epiteliais (pele ou mucosa) podendo causar lesões (Figura 1). O gênero *Alfapapillomavirus* é clinicamente mais importante, pois compreende os vírus associados às lesões da mucosa anogenital (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2005; DOORBAR, 2005).

A classificação dos tipos de HPV é realizada por meio da análise da heterogeneidade de suas sequências específicas de DNA juntamente com a associação às lesões clínicas, podendo ser agrupados em tipos cutâneos e mucosos. Os tipos cutâneos infectam a pele e os mucosotrópicos infectam as mucosas urogenitais, anais e

oro respiratórias (SCHEURER et al., 2005; CASTELLSAGUE, 2008). Os tipos mucosotrópicos são classificados em alto e baixo risco de acordo com sua relação com as lesões proliferativas benignas ou malignas (MACMURRAY et al., 2001; PASSOS et al., 2008).

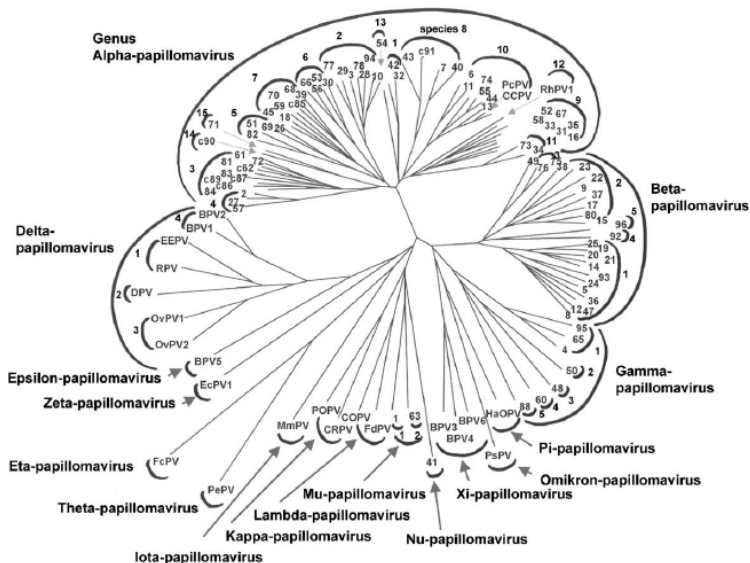


Figura 1. Árvore filogenética dos tipos de PV identificados (de VILLIERS et al., 2004).

Mais de 100 tipos de HPV já foram descritos e tiveram seus genomas completamente sequenciados e caracterizados. Aproximadamente 40 tipos podem infectar a região anogenital, no entanto a variação da prevalência nas diferentes populações é de 1,4% a 25,6% e se observa grande variação na frequência dos diferentes tipos virais (MUNÓZ et al., 2006; RAMA et al., 2008a).

Os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 de HPV são considerados oncogênicos ou de alto risco, por estarem associados em aproximadamente 95% dos casos de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) ou câncer uterino (WALBOOMERS et al., 1999; CLIFFORD et al., 2003; HAWS et al., 2004; WOODMAN et al., 2007; CASTELLSAGUÉ, 2008; CHERYL et al., 2008).

Os tipos 26, 53 e 66 são, provavelmente, carcinogênicos, enquanto os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e *canHPV89/Cp6108* estão associados ao baixo risco de lesões e estão

comumente relacionados aos condilomas acuminados, condilomas planos ou lesões intraepiteliais de baixo grau, conhecidas como neoplasias intraepiteliais cervicais grau I (MUNÕZ et al., 2003, VILLA e DENNY, 2006; MUNÕZ et al., 2006). A Tabela 1 demonstra a classificação filogenética e epidemiológica dos HPVs anogenitais

Tabela 1. Classificação filogenética e risco dos HPVs anogenitais da espécie Alfa (Munõz et al., 2006).

Localização na árvore filogenética	Genótipo	Risco
9	HPV 52	Alto
	HPV 67	Indeterminado
	HPV 33	Alto
	HPV 58	Alto
	HPV 16	Alto
	HPV 31	Alto
	HPV 35	Alto
11	HPV 34	Indeterminado
	HPV 73	Provável Alto
7	HPV 59	Alto
	HPV 18	Alto
	HPV 45	Alto
	HPV 70	Baixo
	HPV 39	Alto
	HPV 68	Provável Alto
5	HPV 85	Indeterminado
	HPV 26	Provável Alto
	HPV 69	Indeterminado
	HPV 51	Alto
6	HPV 82	Provável Alto
	HPV 30	Indeterminado
	HPV 53	Provável Alto
	HPV 56	Alto
10	HPV 66	Provável Alto
	HPV 6	Baixo
	HPV 11	Baixo
	HPV 13	Baixo
	HPV 74	Indeterminado
	HPV 44	Baixo

	HPV 55	Indeterminado
8	HPV 91	Indeterminado
	HPV 7	Indeterminado
	HPV 40	Baixo
	HPV 43	Baixo
1	HPV 32	Indeterminado
	HPV 42	Baixo
13	HPV 54	Baixo
4	HPV 57	Indeterminado
	HPV 2a	Indeterminado
	HPV 27	Indeterminado
15	HPV 71	Indeterminado
	HPV 90	Indeterminado
3	HPV 61	Baixo
	HPV 72	Baixo
	HPV 62	Indeterminado
	HPV 81	Baixo
	HPV 83	Indeterminado
	HPV 89	Baixo
	HPV 84	Indeterminado
	HPV 86	Indeterminado
HPV 87	Indeterminado	
2	HPV 28	Indeterminado
	HPV 3	Indeterminado
	HPV 10	Indeterminado
	HPV 29	Indeterminado
	HPV 77	Indeterminado

A classificação está baseada na análise das sequências de nucleotídeos do gene L1, altamente conservado no vírus. Um novo tipo é descrito quando as variações de nucleotídeos são superiores a 10%, variações entre 2 e 10% determinam subtipos de HPV. Os papilomavírus humano são nomeados pela abreviação HPV e recebem um número sequencial à medida que diferentes tipos são descobertos (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2005; WHEELER, 2008).

2.1.3. Biologia do vírus

Os Papilomavírus são pequenos, de formato icosaédrico não envelopado com diâmetro de 52 a 55nm. O genoma do HPV é composto por uma molécula de DNA de dupla fita circular com aproximadamente 8 mil pares de bases (pb), sendo o conteúdo de guanina-citosina correspondente a 41 Mol% do DNA (ROSENBLATT et al., 2005; PASSOS et al., 2008).

Estes vírus apresentam três regiões principais: precoce “E” (do inglês *early*) que codifica as proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) envolvidas na replicação viral e transformação; a região tardia “L” (do inglês *late*) responsável pela síntese das proteínas do capsídeo L1 e L2 e uma região regulatória “LCR” (do inglês *Long Control Region*) que contém uma variedade de elementos *cis* reguladores da replicação viral e da expressão gênica (Figura 2), além das regiões *open reading frames* (ORFs) ou fases abertas de leituras que codificam proteínas, geralmente são 8 ORFs que expressam RNA mensageiros policitrônicos transcritos por uma única fita de DNA (BURD, 2003; LONGWORTH & LAIMINS, 2004; MUNGER et al., 2004; SCHEURER et al., 2005; MUNÓZ et al., 2006; VILLA, 2006).

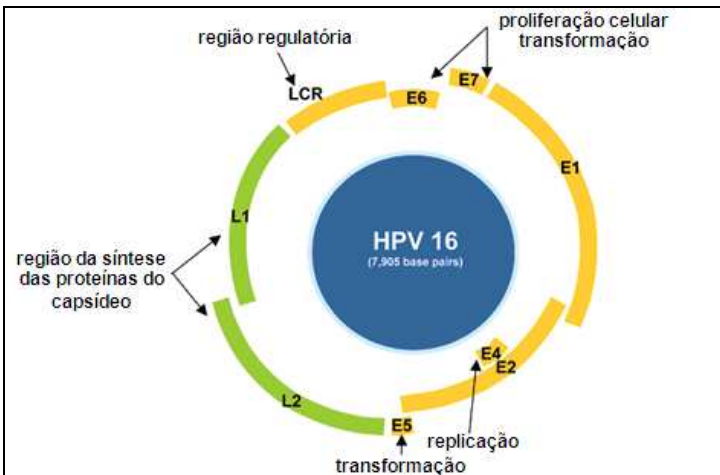


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV (VILLA, 2006).

2.1.4. Ciclo da infecção

O ciclo de vida dos HPVs está diretamente relacionado à diferenciação celular epitelial, a infecção inicia-se quando o vírus penetra nas células da camada basal do epitélio através de microlesões (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; MOODY & LAIMINS, 2010). O receptor para a entrada do vírus na célula ainda é desconhecido, mas estudos sugerem que o sulfato de heparina proporciona a fixação inicial (LONGWORTH & LAIMINS, 2004; KANODIA et al., 2007).

Seguido da entrada do vírus nas células da camada basal, o núcleo é desnudado e o genoma viral é mantido na forma episomal em baixo número, de aproximadamente 50 a 100 cópias por célula (MUNÓZ et al., 2006; ROSENBLATT et al., 2005). O genoma do HPV não codifica polimerases ou outras enzimas necessárias para a replicação viral, portanto, o vírus se replica em sincronia com o DNA do hospedeiro e acompanha o processo de maturação celular que ocorre com a diferenciação e migração das células em direção a superfície (DOORBAR, 2005; MOODY & LAIMINS, 2010).

As proteínas estruturais L1 e L2 são expressas nas camadas superiores do epitélio, onde ocorre o empacotamento do vírus em capsídeos e a liberação da progênie viral para que o ciclo possa ser reiniciado (zur HAUSEN 2002; MUNÓZ et al., 2006). Quando se dividem, as células infectadas pelo HPV distribuem o DNA viral entre as duas células filhas, enquanto o processo de diferenciação e maturação é iniciado por uma delas, a outra serve como um reservatório do DNA viral permanecendo indiferenciada na camada basal (DOORBAR, 2005; SCHEURER et al., 2005). As primeiras proteínas a serem expressas são E1 e E2; E1 codifica uma ou mais proteínas necessárias para regular a replicação do DNA episomal e E2 codifica duas ou mais proteínas que regulam positiva ou negativamente a transcrição viral (ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006).

A função da proteína E4 ainda não foi bem determinada, mas ela está presente tanto na fase precoce quanto na fase tardia da infecção viral produtiva e, provavelmente por interagir com a citoqueratina, pode estar relacionada às alterações estruturais no citoplasma das células infectadas o que leva à formação dos coilócitos - células atípicas com uma cavitação perinuclear no citoplasma que indica alterações citopáticas devidas a infecção pelo HPV (BRENTJENS et al., 2002; STOLER, 2003, IARC, 2010). A proteína E5 é expressa nos estágios iniciais da infecção viral, tem baixa atividade oncogênica, e aumenta as

propriedades oncogênicas da E7, pois sua expressão modifica a transdução de sinal para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e bloqueia a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I (MHC I) na membrana plasmática (zur HAUSEN, 2002; LEYKAUF et al., 2004; ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006). A proteína E6 interage com as proteínas p53 do ciclo celular e a E7 com a proteína do retinoblastoma (pRb) estas interações são fundamentais para o processo de replicação viral, pois induzem a proliferação, a eventual imortalização e a transformação maligna das células (MOODY & LAIMINS, 2010).

Estudos sugerem que um importante passo na carcinogênese do HPV pode ser a coexistência de epissomos virais com cópias integradas. A expressão das proteínas de replicação viral E1 e E2 dos epissomos podem iniciar a replicação do DNA viral de origem integrado, resultando na sua amplificação e na indução de anormalidades cromossômicas (MOODY & LAIMINS, 2010). A Figura 3 ilustra o ciclo celular do HPV demonstrando a arquitetura das células escamosas do epitélio cervical e a expressão das proteínas não estruturais do papilomavírus humano (HPV) após a infecção. As células filhas dividem-se ao longo da camada basal e seu processo de maturação é acompanhado da migração em direção à superfície. As proteínas virais são expressas em sequência diferenciando-se e os vírions maduros são produzidos somente nas células da camada superficial do epitélio escamoso (FRAZER, 2004).

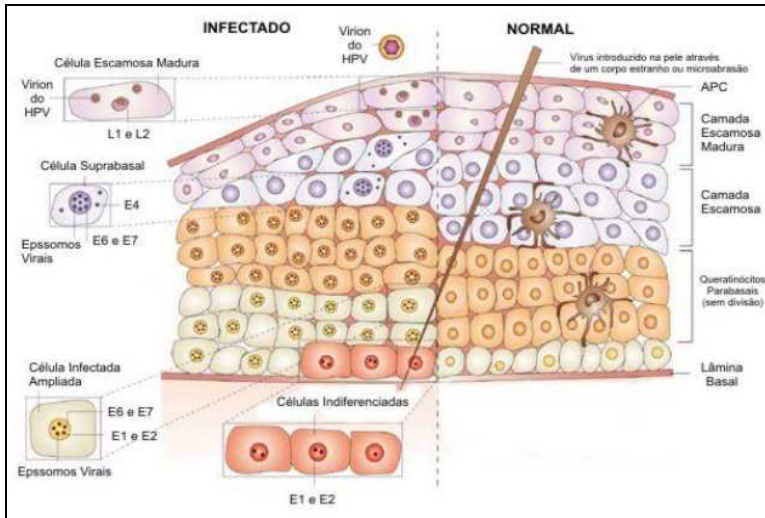


Figura 3. Ilustração do ciclo celular da infecção e principais etapas do ciclo do HPV (adaptado de FRAZER, 2004).

2.1.5. Mecanismos da carcinogênese do HPV

Até o momento não está claramente definido por que a infecção pelo HPV evolui com resolução em alguns indivíduos e resulta em lesões mais graves em outros. Estudos indicam que a transformação maligna envolve os produtos dos genes virais E6 e E7, os quais podem exercer seus efeitos interferindo nas proteínas que regulam o crescimento celular (RIVOIRE et al., 2001; BRENTJENS et al., 2002; HOORY et al., 2008; LIE & KRISTENSEN, 2008; MOODY & LAIMINS, 2010; PIM & BANKS, 2010). Nos casos de infecções persistentes, distúrbios no controle da replicação dos HPVs de alto risco podem levar à integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, o que causa transformação celular e sugere que a integração possa contribuir para a progressão à malignidade. O mecanismo de indução à carcinogênese mediada pela infecção persistente por tipos oncogênicos do HPV é o resultado da ação conjunta das proteínas virais E6, E7 e E5 (oncoproteínas). As proteínas E6 e E7, dos principais tipos de HPVs oncogênicos, formam complexos com proteínas celulares supressoras de tumor, a p53 e a pRb inativando as suas funções como controladoras do ciclo celular (ROSENBLATT et al 2005; MOODY & LAIMINS, 2010).

Nas lesões contendo o HPV na forma epissomal a proteína E2 funciona como reguladora positiva ou repressora da síntese das

proteínas da fase precoce do ciclo viral, incluindo as oncoproteínas E6 e E7. A perda da E2 leva à expressão desregulada e superexpressão dos genes E6 e E7, acelerando o processo de transformação e immortalização celular, o que resulta em danos ao DNA (FERHMAN & LAIMINS, 2003; MUNGER et al., 2004; ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006; KANODIA et al., 2007).

Para exercer a atividade transformadora, a oncoproteína E6 depende da ligação com a p53, degradando-a pela via ubiquitina-dependente, esta associação é mediada pela proteína associada a E6 (E6-AP) formando um complexo E6-E6AP-p53 que proporciona a inativação da função supressora da p53. Este complexo apresenta atividade anti-apoptótica e interfere nas funções reguladoras do ciclo celular da p53 como ilustra a Figura 4 (JO & KIM, 2005; ROSENBLATT et al, 2005).

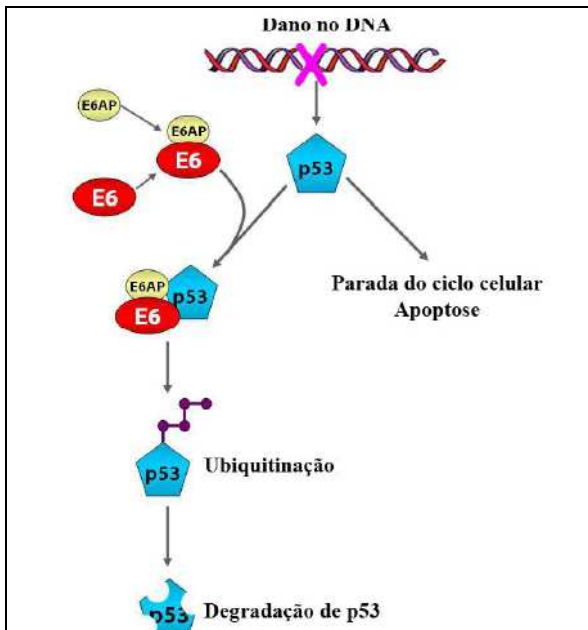


Figura 4. Esquema da degradação da p53 mediada pela E6. Danos no DNA induzem a ativação de p53 o que leva tanto à parada do ciclo celular quanto à apoptose. E6 se liga à E6-AP e o complexo formado se liga a p53. E6-AP ubiquitina a p53, que é rapidamente degradada pelo proteossomo (Modificado de JO&KIM, 2005).

A proteína E7 liga-se a pRb e induz a sua degradação, facilitando a liberação do fator E2F, o que permite que a célula entre na fase S do ciclo celular. Como consequência a síntese de DNA e a proliferação celular são estimuladas. Este fator atua nas fases de crescimento 1 e de síntese (G1 e S) do ciclo celular, prolonga a fase S, induz a instabilidade do DNA que leva à transformação das células, promove a proliferação de células epiteliais e a consequente replicação ativa de genes do HPV. Este processo pode favorecer o desenvolvimento do câncer (FERHMAN & LAIMINS, 2003; JO & KIM, 2005).

A pRb é uma proteína controladora negativa do ciclo celular na etapa de transição da fase G1 para S e seu estado de fosforilação é regulado durante o ciclo celular. Na forma ativa (estado hipofosforilado) a pRb se liga ao fator transcricional E2F durante a fase G1. Com a fosforilação da pRb por quinases dependentes de ciclina (CDK), em resposta a sinais de proliferação celular, o complexo pRb/E2F se dissocia e E2F é liberado para agir como um ativador transcricional de genes envolvidos na progressão do ciclo celular. A associação de E7 a pRb impede a ligação pRb-E2F, e promove a progressão prematura contínua para a fase S do ciclo celular e síntese de DNA, como demonstrado na Figura 5 (JO & KIM, 2005; HEBNER & LAIMINS, 2006).

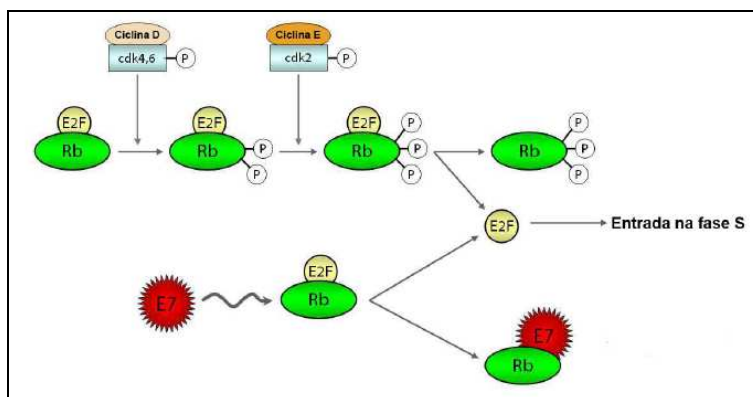


Figura 5. Associação de E7 à proteína do retinoblastoma (pRb). A fosforilação sequencial da proteína pRb por complexos ciclina/CDK inibe a atividade repressora de pRb. E7 se liga à pRb em sua forma hipofosforilada. Esta ligação desfaz o complexo entre pRb e o fator de transcrição celular E2F, resultado na liberação deste fator, o que permite que a célula entre na fase S do ciclo celular (JO & KIM, 2005).

A E7 pode também estar associada a outras proteínas envolvidas na proliferação celular, como as histonas diacetilases (HDACs), componentes do complexo de transcrição AP-1, os inibidores de ciclina dependente de quinase, e as proteínas p21 e p27 (JONES et al., 1997; ROSENBLATT et al., 2005, MOODY & LAIMINS, 2010).

Nos tipos de HPV de baixo risco a proteína E7 liga-se à pRb com baixa afinidade e, por isso, a degradação da pRb não é eficiente; enquanto que nos HPV de alto risco a afinidade a afinidade é alta e a degradação é eficiente (LEE et al., 1998; SANCLEMENTE & GILL, 2002; ROSENBLATT et al., 2005; LIE & KRISTENSEN, 2008).

A participação da proteína E5 nos processos de carcinogênese é controversa. Esta proteína é importante na fase precoce da infecção, insere-se na membrana da célula infectada e se complexa aos receptores do fator de crescimento epitelial (EGF), mimetiza a ação deste fator, com consequente estímulo da proliferação celular (ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006). Também tem sido demonstrado que a proteína E5 pode prevenir o dano ao DNA. No entanto, em células infectadas pelo HPV e que progridem para o câncer cervical o DNA episossomal frequentemente torna-se integrado ao DNA da célula hospedeira. Neste caso, uma parte substancial do genoma, incluindo a sequência da região E5 é deletada. Assim, a proteína E5 não é obrigatória nos eventos da carcinogênese mediada pelo HPV (zur HAUSEN, 2002).

Os oncogenes E6 e E7 dos HPVs de alto risco quando coexpressos influenciam fatores que controlam o ciclo e a proliferação celular, podem causar transtornos no crescimento celular e impedir os processos de reparação do DNA, além de promover instabilidade genética, modificações no rearranjo dos cromossomos, acúmulo de mutações e o desenvolvimento de neoplasias (MUNGER et al., 2004), como pode ser observado na Figura 6 (WOODMAN, 2007).

As alterações fenotípicas nas células são frequentemente observadas nos tumores epiteliais, incluindo o câncer cervical, nos quais mais da metade dos casos são positivos para os tipos HPV 16 e HPV 18. Entretanto, o comportamento biológico das lesões induzidas pelo HPV é pleomórfico, mostrando índices de remissão dependentes da competência imunológica individual, além do tipo e potencial oncogênico viral (VILLA, 2006; KANODIA et al., 2007; MOODY & LAIMINS, 2010).

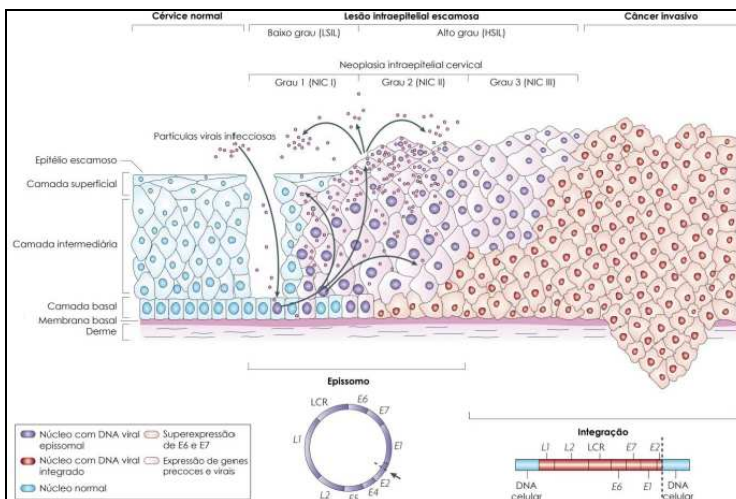


Figura 6. Progressão ao câncer cervical mediada pelo HPV. As células basais do epitélio do colo uterino estão apoiadas na derme, o HPV entra em contato com essas células e após a infecção, os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos pelo DNA viral. Nas camadas superiores do epitélio o genoma viral é replicado, os genes tardios L1 e L2, e o gene precoce E4 são expressos. A progressão das lesões não tratadas, ao câncer, está associada à integração do genoma do HPV ao do hospedeiro, representados na forma de núcleos vermelhos (WOODMAN, 2007).

2.1.6. História natural do câncer cervical

O câncer cervical é precedido por um longo período de lesões pré-malignas (MOYSÉS, et al., 2008). Estudos da história natural do câncer cervical demonstram que a infecção pelos tipos oncogênicos do HPV podem ocasionar lesões intraepiteliais de baixo ou de alto grau, e as lesões de alto grau quando não tratadas podem progredir para o carcinoma cervical. Entre os HPVs de alto risco, o tipo 16 é o mais frequente, presente em 50 a 60% dos carcinomas de células escamosas no mundo, o segundo mais frequente é o HPV do tipo 18, presente em 10 a 15% dos casos de câncer e em 40% a 30% dos adenocarcinomas (SASLOW et al., 2007). Embora tenha sido demonstrada a forte associação entre a progressão neoplásica relacionada ao HPV e o estado imunológico do indivíduo, os mecanismos que desencadeiam a resposta imunológica eficiente, contra as lesões provocadas pelo HPV, ainda não

são totalmente conhecidos (RAMA et al., 2008a; MOODY & LAIMINS, 2010).

Os HPV's oncogênicos têm tropismo por células do epitélio metaplásico na Junção Escamo Colunar (JEC), as infectam e podem induzir sua transformação a células neoplásicas. Além da cérvix uterina, os HPV's de alto risco também estão associados com câncer de pênis, vulvar, anal e contribuem em mais de 40% para o desenvolvimento do câncer oral (MOODY & LAIMINS, 2010).

As principais etapas para o desenvolvimento do câncer cervical incluem infecção do epitélio metaplásico na JEC da cérvix uterina, por um ou mais tipos oncogênicos do HPV, persistência viral, progressão para lesões pré-neoplásicas e carcinoma *in situ* ou invasor. No entanto, pode ocorrer uma reversão destas etapas, com eliminação da infecção pelo HPV e regressão das lesões pré-neoplásicas (ROSENBLATT et al., 2005; STEBEN & FRANCO, 2007).

2.1.7. História natural da infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV é uma doença sexualmente transmissível (DST) que acomete homens e mulheres. Apresenta prevalência em torno de 5% a 20% na população geral e de 20% a 40% entre as mulheres jovens (SANTOS et al, 2003, THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; WHO, 2009). Na maioria dos indivíduos é assintomática e a infecção transitória; 70% dos casos novos regredem em até um ano, e do restante, cerca de 90% em dois anos (STEBEN & FRANCO, 2007).

A infecção pelo HPV pode evoluir para uma das seguintes formas: infecção latente (sem crescimento ou evidência microscópica da presença do vírus), infecção subclínica (manifestação clínica discreta e sua visualização requer equipamento para melhor examinar a região) ou lesão clínica. A regressão espontânea pode ocorrer em qualquer fase da evolução (PASSOS et al., 2008).

Esta infecção é mais freqüente em mulheres jovens, sexualmente ativas, com idade entre 18 e 30 anos. A partir dos 30 anos ocorre uma acentuada diminuição na incidência da infecção. O câncer cervical é mais comum em mulheres acima dos 35 anos, atinge o pico de incidência na faixa etária de 45 a 49 anos, principalmente porque o tempo médio entre a infecção inicial e a manifestação do câncer cervical é de pelo menos 15 anos (MOSCICKI, 2005; CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006, NADAL & MANZIONE, 2006,).

As mulheres adolescentes e jovens com idade inferior a 30 anos são mais propensas a infecção pelo HPV por razões biológicas. Os estudos histológicos e colposcópicos mostram que a maioria das transformações epiteliais iniciais do colo desenvolve-se na zona de junção dos epitélios escamoso e cilíndrico, denominada zona de transformação. Na puberdade, o epitélio colunar transforma-se gradualmente em epitélio escamoso, processo denominado de metaplasia escamosa. Durante este processo, grandes áreas escamosas, glandulares e metaplásicas de transição são formadas e favorecem a infecção pelo HPV. Nesse período, não somente as células do colo uterino estão em proliferação, como favorecem a replicação do HPV e tornam-se susceptíveis ao desenvolvimento de alterações induzidas pelo vírus e, se a infecção persistir, podem levar ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau - HSIL (GOMPEL & KOSS, 1997; MOSCICKI, 2005).

A Figura 7 mostra, na forma esquemática, as principais etapas da transição da infecção do HPV para o câncer cervical.

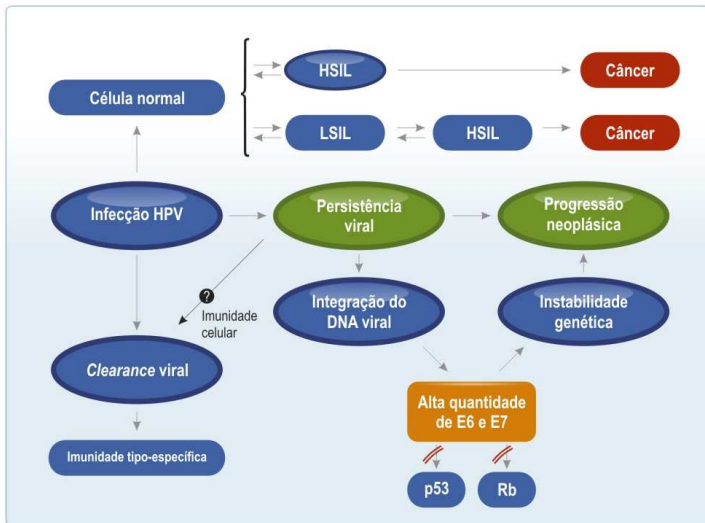


Figura 7. Principais etapas da infecção pelo HPV, evolução para câncer ou resolução da infecção (Modificado de BOSCH et al., 2002). HSIL, LSIL referem-se a nomenclatura para laudos de citologia oncológica, segundo a codificação do Sistema de Bethesda para citopatologia cérvico-vaginal, apresentada no item 2.3.1.1 desta dissertação (SOLOMON & NAYAR, 2004)

A infecção pelo HPV tipo oncogênico é uma causa, mas não um determinante exclusivo para o câncer cervical, pois se admite que outros fatores conjuntamente com o vírus modulem o risco de transição da infecção cervical para a malignidade (CASTELLSAGUÉ et al., 2002; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003). Estes fatores envolvem o início precoce da atividade sexual, o tabagismo, a baixa ingestão de vitaminas, o descaso no reconhecimento de sinais e sintomas da doença, a inflamação crônica da cérvix, a promiscuidade, o uso de contraceptivos orais e de DIU, em detrimento do condom, coinfeção por agentes infecciosos como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), infecção por *Chlamydia trachomatis* e Herpes Vírus simples tipo 2 (SILVA FILHO & LONGATTO FILHO, 2000; NONNENMACHER et al., 2002; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003; STEBEN E FRANCO, 2007; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; INCA, 2010).

Mulheres com infecção pelo HIV possuem três vezes mais probabilidade de ter uma infecção pelo HPV, quatro vezes e meia mais chances de desenvolver neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e de três a cinco vezes mais chances de desenvolver carcinoma cervical invasivo quando comparadas às mulheres HIV soronegativas (VIJAYARAGHAVAN et al., 2009).

O aumento do risco de desenvolvimento de lesões neoplásicas nas infecções persistentes causadas pelos HPV oncogênicos têm sido objeto de grande preocupação, pois constituem um fator de risco para a progressão da doença principalmente no período de imunossupressão. A imunossupressão pode resultar na reativação da infecção latente, ou na progressão e resistência quando os pacientes são submetidos ao tratamento de infecção ativa, como vem sendo demonstrado em pacientes infectados com o HIV ou naqueles com imunossupressão crônica (THOMISSON, THOMAS & SHROYER, 2008). No Brasil, em estudos realizados com mulheres infectadas pelo HIV, a frequência de casos de coinfeção por múltiplos genótipos de HPV foi de 45% (LEVI et al., 2004).

2.1.8. HPV e o câncer cervical

Nas mulheres com infecção persistente por HPV de alto risco, cerca de 10% a 20% progride para lesão intraepitelial de alto grau e cerca de 1% evolui para câncer invasor (CASTELLSAGUÉ et al., 2002; SANTOS et al., 2003; STEBEN & FRANCO, 2007; RAMA et al., 2008a).

O DNA viral é detectado na maioria dos casos (70%-90%) das lesões precursoras ou das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau – HSIL (NIC II e III), 20% a 50% das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau – LSIL (NIC I) e 50% nas atípias celulares escamosas e glandulares de significado indeterminado – ASCUS e AGUS (CASTELLSAGUÉ, 2008).

A detecção do DNA dos HPV's oncogênicos ocorre em praticamente 100% dos casos de câncer cervical, apontando claramente o HPV como principal causa do câncer cervical invasivo (CASTELLSAGUÉ, 2008).

2.1.8.1 Tipos de HPV e o câncer cervical

A frequência dos tipos de HPV's oncogênicos varia de acordo com a localização geográfica, os tipos 16 e 18 são mais comuns no carcinoma cervical, sendo que os dois juntos são responsáveis por 70% dos casos de câncer no mundo, seguidos dos tipos 31, 33, 45, 52 e 58. Destes, os tipos 18 e 45 possuem larga contribuição com os adenocarcinomas quando comparados aos carcinomas de células escamosas (DE CARVALHO et al., 2010). Nas lesões precursoras do epitélio glandular e nas lesões glandulares malignas o DNA do HPV tipo 18 é mais frequente, o que indica uma preferência deste tipo viral pelas linhagens celulares glandulares (MEIJER et al., 2006; WOODMAN, 2007; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

O HPV tipo 16 é mais prevalente nos carcinomas e adenocarcinomas cervicais. Estudos demonstraram que mulheres infectadas por este tipo viral apresentaram maior risco para o desenvolvimento de HSIL (NIC 3+) quando comparadas com mulheres infectadas por outros tipos oncogênicos (MEIJER et al., 2006; WOODMAN, 2007; THOMISON, THOMAS, SHROYER, 2008).

A cérvix uterina é infectada pelos vírus HPV's de alto risco tipo 16 (53%), 18 (15%), 45 (9%), 31 (6%) e 33 (3%) com maior frequência em comparação com os demais tipos (MUNÓZ et al., 2000; FREITAS et al., 2007), sendo estes os tipos mais frequentes nas Américas do Sul e Central (BOSCH et al., 1995; SILVA et al., 2006).

No Brasil o HPV tipo 18 é o segundo com maior prevalência na região Norte, Sul e Sudeste. Na região Nordeste o HPV tipo 31 é o segundo mais prevalente e na região Central o HPV tipo 33 (ELUF-NETO et al., 1994; NORONHA et al., 1999; RABELO-SANTOS, et al., 2003; FREITAS et al., 2007; SILVA et al., 2006). Aproximadamente

70,7% dos casos de carcinoma invasivo são atribuídos aos tipos 16 e 18 (WHO- BRAZIL, 2009).

A Figura 8 mostra a percentual de casos de câncer cervical atribuídos aos 15 tipos de HPV's mais frequentes em todo o mundo. Dentre eles, os cinco genótipos mais prevalentes foram 16, 18, 31, 33 e 45 encontrados em mais de 80% dos casos de câncer cervical (MUNÓZ et al., 2004; SMITH et al., 2007).

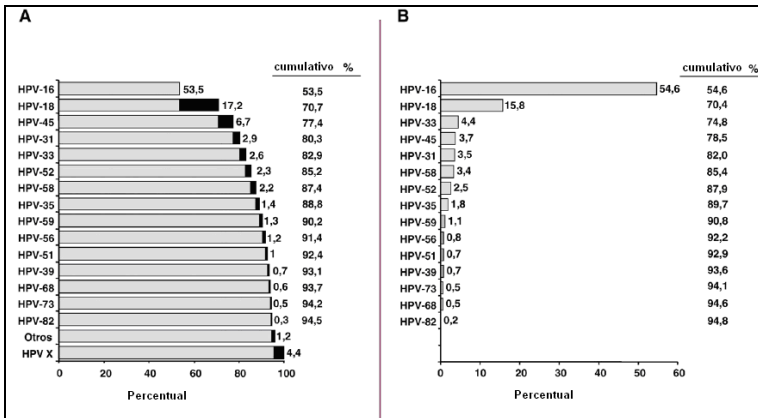


Figura 8. Percentual estimado de casos de câncer cervical atribuídos aos tipos de HPV mais frequentes em todas as regiões do mundo: (A) análise combinada da IARC (International Agency for Research on Cancer), com 3.085 casos (MUNOZ et al., 2004) e (B) meta-análise incluindo mais de 14.000 casos (SMITH et al., 2007, revisado por CASTELLSAGUÉ, 2008).

2.1.9. Epidemiologia do Câncer Cervical

O câncer do colo uterino é considerado um problema de saúde pública devido a sua elevada incidência e alta taxa de mortalidade. As estimativas mundiais para incidência e mortalidade por este câncer são, respectivamente, de 493.000 casos/ano e 288.000 óbitos/ano, com 2.274.000 mulheres infectadas. (PARKIN & BRAY, 2006, THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; MONSONEGO et al., 2010). Aproximadamente 83% dos casos ocorrem nos países em desenvolvimento, sendo o câncer de colo uterino responsável por 15% das neoplasias femininas, enquanto que nos países desenvolvidos é responsável por 3,6% dos novos cânceres (PARKIN & BRAY, 2006).

Na maioria dos casos, apresenta evolução lenta o que favorece sua prevenção que consiste na identificação precoce das lesões atípicas no epitélio cervical, e no tratamento eficaz antes da invasão local e da disseminação da doença (BEZERRA et al., 2005). A gênese e o desenvolvimento do câncer cervical são processos que se realizam em múltiplas etapas, sendo o HPV o agente etiológico mais importante (MUNÓZ et al, 2003).

Em países desenvolvidos a sobrevida média, estimada em cinco anos, varia de 51% a 66%. Nos países em desenvolvimento os casos são identificados em estágios relativamente avançados e a sobrevida média é de 41% após cinco anos (INCA 2010).

Aproximadamente 27% dos casos de câncer cervical do mundo são registrados na Índia, o segundo país mais populoso do mundo (Garcia et al., 2007), entretanto as maiores taxas de incidência são observadas na África sub-Saara (31/100.000 hab), Centro-Sul (26,5/100.000 hab) e Sudeste da Ásia (18,3/100.000 hab), América Latina (33,5/100.000 hab) e Caribe (33,5/100.000 hab); as mais baixas (menor de 15 por 100.000 hab) ocorrem na Europa (exceto em alguns países do leste europeu), América do Norte, Japão, China e na Ásia Ocidental. O menor índice, 0,4/100.000 hab, foi registrado em Ardabil, noroeste do Irã (PARKIN & BRAY, 2006). Nos próximos 20 anos está previsto um aumento de mais de 75% no número de casos de câncer do colo do útero na América Latina e no Caribe, caso não forem tomadas medidas mais eficazes para ampliar a cobertura dos testes de rastreio e do tratamento (DE CARVALHO et al., 2010).

Na Europa é apenas a décima causa de morte por câncer entre as mulheres, resultado de programas de rastreamento organizados (DEPUYDT et al., 2007). Nos Estados Unidos, a incidência do câncer cervical apresentou um decréscimo de 75% e a taxa de mortalidade de 74% após a introdução dos programas coletivos de prevenção em 1949 (SASLOW et al., 2007), passando da primeira para a décima terceira causa de morte em mulheres (SASLOW et al., 2002), em 2007, estimou-se 11.150 novos casos e 3.670 mortes por esta patologia nos Estados Unidos (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

No Brasil, o câncer de colo uterino é o terceiro mais comum, precedido apenas pelo câncer de pele do tipo não-melanoma e pelo câncer de mama (INCA, 2010). Entre os anos de 1979 e 2000, houve um aumento de 33,1% na mortalidade por câncer cervical (ROSEMBLATT et al., 2005) e as estimativas de incidência e mortalidade para o câncer do colo uterino em 2010 previram 18.430 novos casos, com risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. O câncer uterino é o

mais incidente na região Norte (23/100.000 hab) desconsiderando-se os tumores de pele não melanoma, nas regiões Centro-Oeste (20/100.000 hab) e Nordeste (18/100.000 hab) ocupa a segunda posição, e nas regiões Sul (21/100.000 hab) e Sudeste (16/100.000 hab) ocupa a terceira posição. No estado de Santa Catarina a previsão para o ano de 2010 foi de 610 novos casos (19/100.000), e em Florianópolis 40 casos novos (17,97/100.000) (INCA, 2010). Contudo, este é um tipo de câncer que pode ser evitado com o auxílio do diagnóstico precoce e do desenvolvimento de ações básicas organizadas de prevenção e políticas de proteção à saúde da mulher (SASLOW et al., 2002).

2.2. VACINAS ANTI-HPV

A prevenção da infecção é uma alternativa para o controle da incidência da doença. Na década de 90 foram iniciados os testes clínicos com várias vacinas potenciais que tinham como alvo os tipos mais comuns do HPV. Atualmente, estudos sobre vacinas profiláticas e terapêuticas contra o HPV estão sendo realizados. As vacinas terapêuticas estão baseadas na indução da imunidade celular contra células que expressam antígenos virais, visando a regressão das lesões associadas ao HPV. As proteínas E6 e E7 são alvos da maioria destas vacinas, uma vez que são expressas constantemente nas células de tumores associados ao HPV (MANTOVANI & BANKS, 2001; MUNGER, 2001; NADAL & MANZIONE, 2006).

A pesquisa das vacinas profiláticas iniciou-se há alguns anos nos Estados Unidos (EUA), com a participação da população feminina de vários países e no ano de 2006 a agência de regulamentação de medicamentos *Food and Drug Administration* (FDA-EUA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS) do Brasil, aprovaram para comercialização, uma vacina desenvolvida para a prevenção do câncer do colo de útero e de verrugas genitais (VESPA JÚNIOR, 2006).

As vacinas profiláticas têm como base a indução de anticorpos neutralizantes capazes de prevenir a infecção pelo HPV, para isso os antígenos utilizados baseiam-se na proteína estrutural do capsídeo viral L1, gerando uma estrutura semelhante àquela encontrada nos vírions. Estas estruturas, morfológicamente assemelhadas ao vírus, porém vazias, foram denominadas de *virus-like particles* (VLPs). As VLPs são destituídas de DNA ou produtos biológicos e consideradas seguras, pois induzem forte resposta imune sem o risco de infecção ou de produzir uma neoplasia. Outra grande vantagem das VLPs é o fato de serem

produzidas utilizando-se células de insetos, de bactérias recombinantes ou até mesmo de fungos, como as culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a tecnologia do DNA recombinante (VILLA et al., 2005; LOWY & SCHILLER, 2006; DERCHAIN, 2007).

A vacina quadrivalente, produzida pelo Laboratório Merck Sharp & Dohme (Gardasil®), é indicada para mulheres com idade entre 9 e 26 anos em um regime de três doses durante o período de 6 meses (1º dia, 2º mês e 6º mês), tem o objetivo de proteger contra HPVs tipos 6, 11, 16 e 18. Os HPVs 6 e 11 são responsáveis por aproximadamente 90% das verrugas genitais, e os HPVs 16 e 18 por 70% dos casos de câncer cervical (VILLA et al., 2005).

Estudos demonstraram a eficácia da vacina quadrivalente na prevenção da doença associada com os tipos virais, um estudo de meta-análise comprovou sua eficácia em aproximadamente 98% quando utilizada para prevenção dos tipos 16 e 18 relacionados com NIC II/III e 100% de eficácia na prevenção dos adenocarcinomas *in situ* (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008); outro estudo mostrou notável redução de 90% na incidência da infecção pelo HPV para os tipos 16 e 18, sugerindo que a vacinação em massa diminuirá o ônus provocado pelas doenças associadas ao HPV (NADAL & MANZIONE, 2006).

No ano de 2008 a ANVISA aprovou a comercialização de outra vacina contra o HPV: a vacina bivalente (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals) que confere proteção contra os tipos de HPVs oncogênicos 16 e 18, também sendo administrada em três doses (1º dia, 1º mês e 6º mês) (PASSOS et al., 2008). Esta vacina é indicada para mulheres entre 10 e 25 anos de idade e é composta por VLPs formadas pelas proteínas L1 dos HPVs 16 e 18 obtidas por sistemas de expressão em células de inseto *Spodoptera frugiperda* Sf-9 e do substrato celular *Trichoplusia ni* Hi-5 (HARPER et al., 2004).

A vacina bivalente mostrou eficácia de 91,6% contra infecção incidental e 100% contra as persistentes pelos HPVs 16 e 18. Além disso, a análise da imunidade provocada por esta vacina contra a infecção incidental por outros tipos oncogênicos indicou alto grau de proteção contra o HPV 45 e contra o HPV 31, que são tipos virais também comumente associados ao câncer cervical (NADAL & MANZIONE, 2006).

Até o presente momento essas vacinas têm se mostrado seguras, altamente imunogênicas e com grande eficácia contra os tipos de HPV que causam as verrugas genitais e em 70% dos casos de câncer de útero (LINHARES & VILLA, 2006), tendo sido recentemente aprovadas para

o uso em homens objetivando prevenir o desenvolvimento de câncer de pênis associado ao HPV. Podem também mostrar eficácia na prevenção de cânceres orais associados aos HPVs de alto risco. O desenvolvimento das vacinas é um avanço substancial para a prevenção do câncer cervical e da infecção pelo HPV em todo o mundo e futuros avanços contribuirão para torná-las ainda mais efetivas (MOODY & LAIMINS, 2010).

2.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV

A necessidade de se fazer a detecção e o tratamento precoces em lesões pré-cancerosas causadas pelo HPV podem perfeitamente prevenir a progressão ao câncer, uma vez que ocorre a elevação das taxas de progressão das lesões conforme o aumento do tempo das infecções: num prazo de um ano o risco de progressão da displasia moderada para displasia severa é de 1%; em dois anos o risco sobe para 16% e num prazo de cinco anos eleva-se para 25% (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

Muitos métodos para a triagem do câncer cervical e da infecção pelo HPV são utilizados, sendo empregados principalmente os exames citológicos, a colposcopia (infecção subclínica) e a biópsia cervical. Contudo, estes métodos apenas sugerem a existência de infecção pelo HPV, indicadas pelas alterações celulares morfológicas (efeito citopático) (NAMKOONG, 1995). Neste contexto, os testes moleculares passaram a ser uma importante ferramenta para confirmação da infecção pelo HPV.

2.3.1. Diagnóstico Morfológico do HPV

O diagnóstico morfológico das infecções pelo HPV é amplamente utilizado tanto em esfregaços celulares quanto em cortes de tecido. A presença inequívoca de coilócitos ou disqueratócitos indica uma infecção produtiva por estes vírus. Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas de detecção do DNA viral tornou-se evidente a baixa sensibilidade do diagnóstico morfológico, que geralmente resulta em um grande número de resultados falso-negativos (FARTHING et al., 1994; ROSEMBLATT et al., 2005).

2.3.1.1. Citologia Oncótica ou Citopatologia

É o principal método de rastreio do câncer cervical, embora o tecido necrótico, o sangramento e as células inflamatórias possam prejudicar a visualização de células neoplásicas (INCA, 2010). A primeira forma de detecção de alterações compatíveis com a infecção pelo HPV foi a coloração pelo método de Papanicolaou, introduzida no ano de 1949, antes mesmo da causa do câncer cervical ser conhecida (GOMPEL & KOSS, 1997; CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

O método utiliza esfregaços celulares que são fixados em lâmina e posteriormente corados. A observação de alterações celulares típicas como presença de coilócitos, disceratose, anomalias celulares compatíveis com a infecção pelo HPV é definida em graus variados. A classificação dos resultados do Papanicolaou sofreu algumas modificações desde a introdução do método. Atualmente, a classificação seguida é a do sistema Bethesda (2001), que separa as anormalidades das células escamosas em: - *ASC* (células escamosas atípicas) subdividida em *ASC-US* (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e *ASC-H* (células escamosas atípicas de significado indeterminado em que não é possível excluir uma lesão intraepitelial de alto grau); *LSIL* (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau), *HSIL* (lesão intraepitelial escamosa de alto grau) e *SCC* (carcinoma de células escamosas). Entre as atipias glandulares são consideradas aquelas de significado indeterminado, o adenocarcinoma *in situ* e invasor (SOLOMON & NAYAR, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde, em 1998 implantou o Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama denominado “Viva Mulher” que amplia a oferta do exame convencional de Papanicolaou, com o objetivo de reduzir as taxas de morbimortalidade por esta neoplasia. O programa prioriza mulheres de 25 a 65 anos. No entanto, muito ainda é preciso avançar para alcançar uma cobertura ampla das mulheres suscetíveis ao desenvolvimento do câncer cervical, ou seja, todas as que já iniciaram sua atividade sexual (NANDA et al, 2000; INCA 2010). A recomendação do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de que os dois primeiros exames devam ser feitos com um intervalo de um ano. Quando os resultados destes dois exames são normais, o rastreamento pela citologia deverá ser feita a cada três anos (INCA, 2010).

Entretanto, o teste apresenta um número elevado de resultados falso-negativos que variam em torno de 15% a 50% e percentuais de resultados falso-positivos de 10% em média (CAVALCANTI &

CARESTIATO, 2006). A citologia oncótica não tem sensibilidade aceitável para a detecção do adenocarcinoma cervical e seus precursores (LIE & KRISTENSEN, 2008). Assim, um esfregaço negativo em uma paciente sintomática nunca deve ser considerado como resultado definitivo (INCA, 2010). Cerca de 40% dos casos de câncer cervical ocorrem em mulheres que recentemente receberam um resultado negativo de citologia oncótica (ALTIOK, 2003).

Mesmo assim, nos últimos anos, os países desenvolvidos com programas de prevenção organizados e que empregaram, como medida preventiva, a citologia oncótica diminuíram muito os casos de cânceres cervicais (SASLOW, 2002; NELSON et al., 2000; MONSONEGO et al., 2010). Entretanto, pela baixa sensibilidade da citologia oncótica, métodos complementares vêm sendo estabelecidos ao longo dos anos, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce da doença cervical.

2.3.1.2. Histopatologia

O exame histopatológico do colo uterino é aceito como procedimento definitivo (padrão-ouro) para o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino (IARC, 2010). É um procedimento de grande importância, e é nele que se baseia a maioria das decisões terapêuticas até o momento. Além de auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HPV, o estudo histopatológico é capaz de graduar as lesões de acordo com seu potencial proliferativo (SOUZA, MELO & CASTRO, 2001).

As lesões neoplásicas invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva. Microscopicamente, isto se observa como uma gama de eventos que progredem da atipia celular a graus variados de displasia ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC) antes da progressão ao carcinoma invasivo (IARC, 2010). A classificação histopatológica vigente é a da Organização Mundial da Saúde na qual as lesões intraepiteliais são divididas em três graus, com gravidade crescente: NIC I, NIC II e NIC III (TRAVASSOLI & DEVILLE, 2003).

O parecer sobre a presença de NIC em uma amostra tecidual cervical e o seu grau depende das características histológicas relativas a diferenciação, maturação e estratificação das células e anomalias nucleares. A proporção da espessura das células do epitélio com células maduras e diferenciadas é empregada na classificação da NIC. Graus mais graves de NIC têm maior probabilidade de apresentar uma maior

proporção da espessura do epitélio composto de células indiferenciadas com apenas uma fina camada de células maduras e diferenciadas na superfície (IARC, 2010).

2.3.1.3 Biomarcadores

Determinar o risco de desenvolvimento e o prognóstico, bem como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores. Os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico (TERMINI & VILLA, 2008).

A infecção pelo HPV promove a replicação desregulada do genoma hospedeiro e, desta forma, variadas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular têm seus níveis aumentados ou diminuídos. Assim, diversos estudos analisam os quantitativos de proteínas relacionadas com este evento, entre elas, os principais exemplos descritos na literatura são p53, p16INK4a, MCM2-7, EGFR, ciclina D, ciclina E, p21WAF1, p27KIP1 (von KNEBEL-DOEBERITZ, 2002; von KNEBEL-DOEBERITZ & SYRJANEN, 2006; TERMINI & VILLA, 2008).

Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, a localização, o estadiamento do tumor, bem como fornece uma avaliação prognóstica (SRINIVAS & KRAMER, 2001). A utilização destes marcadores complementarará o resultado de outros exames de triagem na identificação de lesões com maior risco de progressão maligna (von KNEBEL-DOEBERITZ & SYRJANEN, 2006).

2.3.2. Colposcopia

A colposcopia é um exame visual especializado do colo uterino, da vagina, e da vulva (parte externa da vagina). Hinselmann (1925) foi o primeiro a descrever o equipamento colposcópico básico e estabeleceu os fundamentos para a prática da colposcopia. Um colposcópico é um microscópio de campo estereoscópico, binocular, de baixa potência,

com uma fonte de iluminação de intensidade variável que ilumina a área sob exame (IARC, 2010).

O colposcópio tem uma lente que amplia de 4 a 40 vezes o epitélio, no qual se aplica uma solução de ácido acético com concentração entre 3% e 5%, e onde houver anormalidades histológicas o epitélio torna-se esbranquiçado (acetobranco) devido a precipitação de proteínas. A vascularização também pode ser observada com o auxílio de uma luz com filtro verde. Durante o exame amostras das regiões suspeitas podem ser coletadas e biopsiadas. É um exame de extremo valor para a detecção das lesões causadas pelos HPV, entretanto, outras situações como, por exemplo, inflamações intensas, mosaicismos, também expressam um epitélio branco. Logo, existe um risco de se tratar uma alteração epitelial que não é causada pelo HPV (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

2.3.3. Diagnóstico Molecular do HPV

A detecção do ácido nucleico viral por métodos moleculares tem se mostrado uma ferramenta com grande acurácia diagnóstica; (HUBBARD, 2003; MOLIJN et al., 2005). A forte associação entre HPV e câncer cervical levou ao desenvolvimento de sistemas de detecção moleculares, que têm grande potencial de utilização neste campo (MOLIJN et al., 2005; GASPEROV et al., 2008). Os testes podem apresentar um papel importante na triagem do câncer cervical e muitas aplicações têm sido propostas, como a detecção da infecção latente, a triagem de mulheres com resultados citológicos duvidosos, o seguimento para avaliação do tratamento de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e a triagem para os tipos oncogênicos juntamente com o exame citológico (DEPUYDT et al., 2007; LEE et al., 2005; CASTELLSAGUÉ, 2008).

O diagnóstico molecular do HPV começou a ser utilizado na década de 1980, quando as sondas de ácidos nucleicos foram disponibilizadas comercialmente (HUBBARD, 2003). A utilização de métodos mais acurados para a detecção do HPV em investigações epidemiológicas permitiu a confirmação da importância do vírus, principalmente dos tipos oncogênicos, como fator principal de risco para o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais e do câncer cervical (SCHIFMAN et al. 1993; BOSCH et al., 1995; BOSCH et al., 2002).

A detecção direta do HPV nas células cervicais tornou-se o foco de interesse para triagem primária do câncer cervical, com isso, desde o

ano de 2003 o FDA (*Federal Drug Administration* – EUA) aprova e recomenda o uso dos testes moleculares para detecção do HPV em: - triagem de pacientes com resultados de ASC-US para determinar a necessidade de encaminhamento para a colposcopia; - em mulheres com idade superior a 30 anos em combinação com a citologia para avaliar a presença ou ausência dos tipos de HPVs de alto risco, uma vez que a infecção que acomete mulheres mais jovens tende a curar espontaneamente (CASTELLSAGUÉ, 2008; CASTLE et al., 2008; MONSONEGO et al., 2010).

Entre os métodos utilizados para a detecção do material genético do HPV encontram-se: a hibridização molecular com sondas de ácidos nucleicos (Southern blot, dot blot, hibridização *in situ* [ISH], hibridização *in situ* com fluorescência [FISH]); a amplificação de sinal como a Captura Híbrida II (CH2); a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o RNAm viral das proteínas oncogênicas E6 e E7 (HUBBARD, 2003; HAWS et al., 2004; LIE et al., 2005; MOLIJN et al., 2005; VILLA & DENNY, 2006; GASPEROV et al., 2008; JEANTET et al., 2009).

2.3.3.1. Captura Híbrida

O teste de Captura Híbrida (CH2, Qiagen®), aprovado e reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo FDA dos EUA, é muito utilizado em estudos clínicos no mundo, demonstra boa reprodutibilidade nos ensaios de triagem (MOLIJN et al., 2005; CASTLE et al., 2008). Este método é baseado na reação de hibridização, que utiliza sondas sintéticas de RNA, não radioativas, complementares às sequências genômicas de 18 tipos de HPVs que comumente infectam o trato anogenital, sendo 13 tipos de HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e cinco tipos de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44). Esses tipos representam 95% dos vírus que infectam o trato anogenital, sendo que os HPVs de alto risco estão presentes em 99% dos casos de câncer cervical. Essas sondas são utilizadas na preparação das misturas A e B, para alto e baixo risco, respectivamente, utilizadas em duas reações separadas, que permitem a detecção por grupos de risco e avaliação da carga viral (CASTLE et al., 2002; CASTLE et al., 2008).

O DNA presente na amostra é hibridizado com cada uma das misturas de sondas permitindo a formação de híbridos específicos DNA/RNA da sonda. Os híbridos DNA/RNA são capturados na

superfície da microplaca e são detectados por anticorpo monoclonal específico e um substrato quimioluminescente, determinando uma medida semiquantitativa da carga viral. O limite de detecção do teste é de 1pg/mL de DNA-HPV, equivalente a 5.000 cópias do genoma por amostra, o que o faz ter uma sensibilidade menor quando comparado à PCR que pode detectar a partir de 10 cópias por amostra. A possibilidade de apresentar reações cruzadas entre os dois coquetéis das probes (A e B) pode reduzir a relevância clínica de um resultado positivo; e além de não especificar o tipo viral, não detecta tipos que possam estar presentes na amostra e que não tenham homologia com as sondas testadas (FARTHING et al., 1994; MOLIJN et al., 2005; CARESTIATO et al., 2006b).

2.3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica da PCR, utilizada a partir do final da década de 1980 (Saiki et al., 1988) tem sido comumente empregada para a detecção do DNA de HPV (NELSON et al., 2000). A reação consiste na utilização de uma enzima responsável pela replicação do DNA, a DNA polimerase, além de uma molécula de DNA fita simples como molde para a síntese de uma nova fita complementar, e de pequenos segmentos de DNA, também fita simples, conhecidos como oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* (SAIKI et al., 1988; ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006). A utilização da PCR como método diagnóstico do HPV tem se mostrado sensível na identificação do DNA viral existente nos diversos materiais clínicos, bem como na resolução de infecções duvidosas no diagnóstico citohistopatológico e colposcópico, não apenas nas lesões pré-neoplásicas, mas também nas infecções latentes ou subclínicas, tanto na mulher como no homem (CHOW et al., 2000; NELSON et al., 2000; ROSENBLATT et al., 2005).

O sistema que emprega os oligonucleotídeos iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+, que amplificam parte do gene L1 (Figura 9), é o mais frequentemente utilizado para a detecção do HPV em estudos clínicos e epidemiológicos. Tais iniciadores são eficazes em amplificar um amplo espectro de genótipos de HPV, em células obtidas por raspado cervical (MANOS et al., 1989; VAN den BRULE et al., 1990; de RODA HUSMAN et al., 1995; WALBOOMERS et al., 1999; ROSENBLATT et al., 2005; PAYAN et al., 2007; PANNIER-STOCKMAN et al., 2008). O aumento significativo da sensibilidade e especificidade da PCR para HPV é obtido quando os iniciadores

MY09/MY11 são utilizados em uma PCR inicial e o produto desta amplificação é utilizado como molde para *nested* PCR com os iniciadores GP5+/GP6+, como ilustra a Figura 9 (SOTLAR et al., 2004; FREITAS et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

A sensibilidade e a especificidade dos métodos baseados na PCR podem variar dependendo do conjunto de iniciadores utilizados, do tamanho do produto obtido, das condições da reação, da eficiência da DNA polimerase empregada, e da habilidade para a detecção de vários tipos virais.

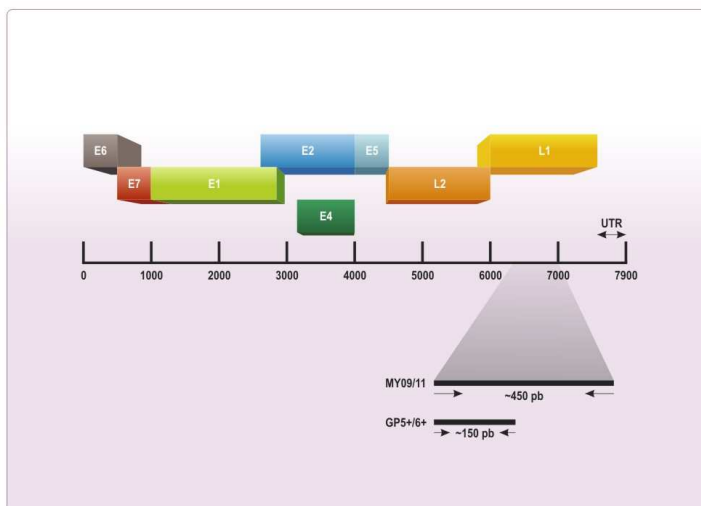


Figura 9. Representação da forma linear do genoma do HPV composto pelos genes E, L e da região não traduzida (UTR). Indicação dos dois conjuntos de iniciadores mais utilizados MY09/11 (HILDESHEIM et al., 1994), GP5+/6+ (JACOBS et al., 1997) (Modificado de MOLIJN et al 2005).

2.3.3.3. PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de monitorar a amplificação do material genético enquanto a reação acontece e tem sido utilizada para detectar ou quantificar o DNA do HPV. Este método utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo ultrapassa um limite (*cutoff/threshold*), ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Existem vários sistemas para detecção dos produtos de PCR, entre estes os mais empregados são o

sistema TaqMan[®] e o sistema do corante SYBR[®] Green I (KUBISTA et al., 2006). Os iniciadores tipo específicos podem ser combinados com sondas fluorescentes complementares a mais de um genótipo de HPV em reações de *multiplex* PCR em tempo real (MOLIJN et al., 2005).

2.4. SISTEMAS DE GENOTIPAGEM DO HPV

A diversidade dos genótipos e a incidência de infecções múltiplas tornaram necessário o estabelecimento de métodos confiáveis para identificação dos vários tipos virais, não somente para estudos epidemiológicos como também para o acompanhamento de pacientes (SOTLAR et al., 2004).

Devido a sua versatilidade e altíssima sensibilidade, vários sistemas baseados em PCR encontram-se disponíveis. A identificação do tipo viral pode ser realizada pela PCR tipo específica, e a análise dos produtos amplificados pode ser feita por diversas técnicas, entre elas, a hibridização com sondas, hibridização reversa, digestão do DNA viral por enzimas de restrição (RFLP), sequenciamento direto do DNA, microarranjos de DNA (DNA *microarray*) e revelação por microfluorometria, além do método de detecção do RNAm viral das proteínas E6/E7 (CASTLE et al., 2002; YAMAGUSHI et al., 2002; SOTLAR et al., 2004; MOLIJN et al., 2005; LIE & KRISTENSEN, 2008; NOBRE et al., 2008).

2.4.1. PCR tipo específica

A PCR com iniciadores específicos para cada tipo viral é uma estratégia para genotipagem do HPV. Trata-se de método altamente sensível, fácil de interpretar e que permite a caracterização dos tipos nos casos de infecção múltipla (SOTLAR et al., 2004, GASPEROV et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

Este é um método laborioso, pois cada conjunto de *primers* tipo-específicos deve ser validado, e além do custo, sua principal limitação é a incapacidade de identificar genótipos virais na maioria das amostras clínicas, uma vez que depende de pesquisar, em cada reação, cada um das dezenas de tipos infectantes. A seleção dos tipos virais pesquisados deve estar baseada nos estudos epidemiológicos e de prevalência, já que existe grande variação na distribuição dos genótipos em diferentes regiões do mundo (MOLIJN et al., 2005).

2.4.2. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A técnica de análise de polimorfismos baseada no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) é um método molecular bastante utilizado para a tipagem do HPV em estudos epidemiológicos. O método consiste na obtenção de produtos amplificados, preferencialmente com os iniciadores MY09/11, seguido pela digestão do produto de 450pb com enzimas de restrição. Uma amostra deve ser digerida com diversas enzimas. O perfil de restrição para cada tipo viral é obtido pela análise conjunta dos produtos gerados com cada enzima. Porém, em se tratando de amostras clínicas, que apresentam múltiplos tipos de HPVs, a eficácia dessa técnica de tipagem tem limitações, pois as enzimas digerem todos os produtos de PCR presentes na amostra, gerando um perfil de bandas misto em que, algumas vezes, não se consegue diferenciar os tipos virais (MOLIJN et al., 2005), sendo portanto, um bom método para detecção de infecções únicas pelo HPV (GASPEROV et al., 2008).

2.4.3. Método de detecção da expressão de E6/E7 RNAm

NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*)

As proteínas E6 e E7 do genoma viral do HPV são oncogênicas e sua expressão precede e é essencial para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (MOLDEN et al, 2005a; MOLDEN et al., 2006.; JEANTET et al, 2009, RATNAM et al, 2010).

O método NASBA utiliza a amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos e está disponível comercialmente nos testes PreTect HPV-Proofer (Norchip AS[®], Klokkarstua, Noruega) e NucliSENS EasyQ HPV (bioMérieux[®]S.A., Marcy l'Etoile, França). É uma reação de amplificação isotérmica (41°C), *multiplex* com detecção em tempo real, que utiliza as enzimas AMV-RT (Transcriptase Reversa do Vírus da Mieloblastose Aviária), a Rnase-H e a T7 RNA polimerase. Tem como alvo o RNAm de E6 e E7, é capaz de detectar de forma qualitativa através de oligonucleotídeos sintéticos (*beacons*) cinco genótipos de HPVs: 16, 18, 31, 33 e 45, que são os tipos mais prevalentes em carcinomas cervicais (LIE et al., 2005; MOLDEN et al., 2005a; LIE & KRISTENSEN, 2008; JEANTET et al., 2009; HALFON et al., 2010; RATNAM et al., 2010).

A metodologia NASBA é uma importante ferramenta para a detecção e a identificação dos tipos virais dos carcinomas cervicais. Quando comparada à PCR, tem mostrado igual sensibilidade para lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), bem como uma maior especificidade clínica, o que sugere que o ensaio baseado na detecção dos transcritos de RNAm possa ser importante na triagem de mulheres com resultados de citologias duvidosas (ASC-US) e com lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), nas quais o teste de DNA do HPV tem baixa especificidade (KRAUS et al., 2004).

O risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC 2+), para aquelas mulheres que apresentaram expressão positiva para RNAm E6/E7 em um período de 2 anos, foi de 68,9 vezes. Em contrapartida, o risco foi de 5,7 vezes para as mulheres com resultado positivo para o DNA do HPV amplificado com iniciadores consenso (MOLDEN et al., 2006). A expressão de E6 e E7 parece ser melhor indicadora da infecção pelo HPV quando associada com o aumento do risco de progressão para neoplasia, do que somente a detecção do DNA do HPV, podendo ser um marcador molecular útil no *screening* do câncer cervical (MOLDEN et al, 2006; CASTLE et al., 2007; LIE & KRISTENSEN, 2008; DOCTER et al., 2009a; HALFON et al., 2010).

Foi lançado em 2008, na Europa e aprovado pela Comunidade Européia (CE), mais um método para a detecção do RNAm E6/E7, o APTIMA HPV Assay (Gen-Probe[®], San Diego, CA, USA), o qual é baseado na amplificação do RNAm E6/E7 sem discriminar os tipos envolvidos. Utiliza a técnica da Amplificação Mediada por Transcrição - *Transcription Mediated Amplification* (TMA), detecção por quimiluminescência sendo capaz de identificar um *pool* de 14 genótipos de HPVs de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (DOCTER et al., 2009b; GEN PROBE[®], 2010; SNIDJERS et al., 2010).

2.5. APLICAÇÕES CLÍNICAS DA TIPAGEM DO HPV

A identificação do genótipo do HPV tem importante valor prognóstico e terapêutico, que pode ser aplicada em casos duvidosos de citologia e histopatologias, é um componente importante na abordagem do câncer cervical, pois possibilita a distinção dos tipos virais de baixo e de alto risco (NANKOONG, 1995).

A persistência de tipo específico de papilomavírus humano oncogênico (HPV), ou seja, dois ou mais testes de DNA positivos para HPV realizados em diferentes momentos, é considerado o verdadeiro precursor do câncer cervical; a transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 é necessária para a transformação maligna e manutenção do estado neoplásico (KOSHIOL et al., 2008; VARNAI et al., 2008), o que torna, portanto, muito importante o papel da identificação dos genótipos na evolução do caso.

Outra aplicabilidade da identificação do tipo viral, é a elaboração e o desenvolvimento de estratégias de vacinas. A identificação dos tipos oncogênicos mais prevalentes nas diferentes regiões geográficas e em diferentes populações, possibilita avaliar o benefício da implementação das vacinas tipo-específicas (FREITAS et al., 2007; LIN et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

O conhecimento do tipo viral permite selecionar e acompanhar as pacientes com maior potencial para o desenvolvimento do câncer cervical, e pode contribuir para conhecer o potencial evolutivo da infecção (NANKOONG, 1995; NELSON et al., 2000; LEE et al., 2005).

3. JUSTIFICATIVA

O câncer do colo uterino está diretamente relacionado à infecção persistente causada pelos tipos virais de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV). Evidências moleculares e epidemiológicas indicam claramente que certos tipos de HPV representam a principal causa de câncer cervical.

A efetividade da citologia oncótica no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo do colo do útero tem sido reconhecida pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), porém a incidência da doença mantém-se como uma das mais altas entre as neoplasias malignas que ocorrem em mulheres brasileiras. Portanto, o aperfeiçoamento dos métodos de detecção do HPV representa notável avanço e a introdução de novas abordagens diagnósticas, principalmente as moleculares, estão contribuindo enormemente para o esclarecimento dos casos.

Com o acesso cada vez mais frequente ao uso das técnicas de biologia molecular, esta ferramenta de diagnóstico está se tornando fundamental na resolução do diagnóstico de rotina, principalmente, pela possibilidade de identificar os diferentes tipos de HPV, além de contribuir com os estudos epidemiológicos da infecção na população, os quais são importantes para o controle e prevenção da doença.

O Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/ACL/CCS/UFSC possui ampla infraestrutura na área de biologia molecular e se propõe a validar métodos diagnósticos para serem disponibilizados ao SUS e empregados imediatamente na rotina do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

No presente trabalho foram estudadas amostras cervicais de pacientes atendidas em Florianópolis, para detectar o DNA de HPV, o RNA mensageiro das proteínas oncogênica virais E6 e E7, identificar os principais tipos virais e comparar os resultados com a citologia oncótica para estimar a contribuição dos testes moleculares ao diagnóstico precoce do câncer cervical na população do estudo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a aplicabilidade da detecção molecular do DNA e RNAm do HPV na triagem do câncer cervical e comparar os resultados com a citologia oncótica

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica da PCR com iniciadores consenso para o HPV (PCR-HPV);
- Padronizar a técnica da PCR com os iniciadores tipo específicos 16, 18, 31, 33 e 45 (de alto risco) e iniciadores tipo específicos 6 e 11 (de baixo risco) (PCR-HPVte) ;
- Estudar amostras cervicais de pacientes atendidas em Florianópolis para:
 - Detectar o DNA do HPV;
 - Detectar o RNAm das proteínas oncogênicas virais E6 e E7;
 - Identificar os principais tipos virais;
 - Comparar os resultados com a citologia oncótica para estimar o rendimento da PCR e a contribuição da expressão gênica ao diagnóstico precoce do câncer cervical na população do estudo.
- Analisar e publicar os dados.

5. METODOLOGIA

5.1. COMITÊ DE ÉTICA

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina, em 27/04/2009, sob número 072/2009.

5.2. AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para o estudo foram analisadas 162 amostras cervicais, com e sem suspeita clínica coletadas consecutivamente por um médico ginecologista, durante o período de maio a julho de 2009 em Florianópolis, Santa Catarina.

As amostras foram coletadas durante a rotina do exame ginecológico. Pacientes que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo), tiveram o material cervical coletado para os testes moleculares e análise citopatológica convencional. As análises citopatológicas foram encaminhadas para um laboratório de citopatologia. O diagnóstico citológico foi feito por dois citopatologistas, e quando houve discordância, um terceiro citopatologista foi consultado. As amostras para detecção da infecção pelo HPV foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM). Os testes moleculares foram realizados sem o conhecimento prévio dos resultados da citopatologia.

5.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta do material cervical foi realizada utilizando-se o *kit* ThinPrep/PreservCyt (Cytic Corp.-USA). Para a região ectocervical foi realizado o raspado celular com espátula de Ayre, e para a região endocervical foi utilizada escova do tipo *Cytobrush*.

As amostras foram armazenadas e conservadas a 4°C e enviadas no dia seguinte para o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias – LBMM do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Tiago da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC para o processamento e estudo molecular do material.

5.4. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Sistema Nuclisens® Mini Mag – BioMérieux-France. De cada amostra conservada na solução ThinPrep® PreservCyt foram retirados 5 mL e transferidos para um tubo cônico de 15 mL com tampa, que foi centrifugado durante 12 minutos a 400 x g. O sobrenadante foi descartado, deixando-se 1 mL no qual o precipitado foi ressuspensão. As células em suspensão foram transferidas para outro tubo contendo 2 mL de tampão de lise (NucliSens Lysis Buffer), a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente (20°C a 26°C). Após, foi adicionada a sílica magnética, e o material homogeneizado em vórtex. Em seguida a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 400 x g, e o sobrenadante foi descartado. Seguiram-se etapas de lavagem, e ao final o RNA/DNA foi ressuspensão em 55 µL do tampão de eluição, armazenado a -20°C até a sua utilização. O restante das amostras conservadas na solução ThinPrep® PreservCyt ficou armazenado a -70°C para novas extrações.

5.5. PCR COM INICIADORES PARA O GENE DA BETA GLOBINA HUMANA

O DNA de todas as amostras foi submetido primeiramente à amplificação para o gene da beta globina humana, que foi utilizado para o controle da presença de inibidores da PCR. O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores PCO3 e PCO4 (Saiki et al., 1988), 5'-ACACAAGTGTGTTCACTAGC - 3' e 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC - 3', do gene da beta globina humana que geram um produto de 110 pares de base (pb). A PCR foi realizada em 20µL de volume final contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador; Tampão de Taq polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 1uL a 3 uL do DNA molde. As condições da amplificação feitas em um termociclador Mastercycle Personal® (Eppendorf) foram: 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos em 39 ciclos e um ciclo final de 72°C por 7 minutos.

5.6. PCR PARA HPV COM INICIADORES CONSENSO (PCR-HPV)

O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores consenso MY09 e MY11 (Manos et al., 1989) da região L1 vírus que geram um produto de 450 pares de base (pb), 5'-CGTCCMARRGGAWACTGTC - 3' e 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG - 3', M corresponde às bases A/C, W às bases A/T e R às bases A/G. A PCR foi realizada em 20µl de volume final contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador; Tampão de Taq polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 1µL a 3 µL do DNA molde. As condições da amplificação feitas em um termociclador Mastercycle Personal[®] (Eppendorf) foram: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto em 39 ciclos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

5.7. NESTED PCR

Nas amostras não amplificadas com os iniciadores MY09 e MY11 foi realizada uma reação *nested* PCR utilizando-se os iniciadores consenso GP5+ e GP6+ (de Roda-Husman et al., 1995) que geram um produto de 150 pb, 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC - 3' e 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC - 3'. A PCR foi realizada em 20µl de volume final contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador; Tampão de Taq polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 1µl do produto da PCR amplificada com iniciadores MY09 e MY11 como molde. As condições da amplificação feitas em um termociclador Mastercycle Personal[®] (Eppendorf) foram: 94°C por 1 minuto, 40°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto em 39 ciclos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

5.8. PCR TIPO ESPECÍFICA (PCR-HPVTE)

As amostras positivas na PCR-HPV foram submetidas a PCR com iniciadores específicos para a identificação dos tipos virais: HPV16A e HPV16B, HPV18A e HPV18B, HPV31A e HPV31B, HPV33A e HPV33B, HPV45A e HPV45B tipo específicos para os vírus de alto risco oncogênico e os iniciadores HPV6A e HPV6B, HPV11A e

HPV11B tipo específicos para os vírus de baixo risco 6 e 11 (ARNDT et al, 1994; DUGGAN et al, 1994; ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006; CARVALHO et al., 2010).

O DNA extraído foi amplificado com cada um dos pares de iniciadores tipo específico, que geram produto de PCR com tamanho variável dependendo do par de iniciador utilizado, conforme apresentado na Tabela 2. A PCR foi realizada em 20µl ou 50µl de volume final contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador; Tampão de Taq polimerase 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 1uL a 5 uL do DNA molde. As condições da amplificação feitas em um termociclador Mastercycle Personal[®] (Eppendorf) foram: 94°C por 1 minuto seguido de 30 ciclos de 90°C por 30 segundos, temperatura de pareamento específica para cada um dos tipos de HPV por 2 minutos (Tabela 2), 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação para detecção dos tipos específicos de HPV.

Iniciadores	Sequência Nucleotídeos	Temperatura de pareamento	Produto amplificado
HPV6A	5'TAGGGGACGGTCTCTATTC-3'	62°C	258-361 pb
HPV6B	5'-GCAACAGCCTCTGAGTACA-3'		
HPV11A	5'-GAATACATGCGCCATGTGGA-3'	64°C	356 pb
HPV11B	5'-AGCAGACGTCCGTCCTCGAT-3'		
HPV16A	5'-TCAAAGCCACTGTGTCCTG-3'	62°C	150 pb
HPV16B	5'-CGTGTCTTGATGATCTGCAA-3'		
HPV18A	5'-TGGTGTATAGAGACAGTATACCCCA-3'	65°C	247 pb
HPV18B	5'-GCCTCTATAGTGCCAGGTATGT-3'		
HPV31A	5'-TGAACCGAAAACGGTTGGTA-3'	63°C	613 pb
HPV31B	5'-CTCATCTGAGCTGTCGGGTA-3'		
HPV33A	5'-AGTAGGGTGTAACCGAAAGC-3'	61°C	411 pb
HPV33B	5'-CTTGAGGACACAAAGGTCCT-3'		
HPV45A	5'-CCCGACGACCCGAACCACAG-3'	66°C	100 pb
HPV45B	5'-TCTAAGTCTCTGCGGAGC-3'		

Fonte: ARNDT et al, 1.994; DUGGAN et al, 1994; ROSSETI, SILVA, RODRIGUES, 2006; CARVALHO et al., 2010).

5.9. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DO DNA E DOS PRODUTOS DA PCR

A separação eletroforética dos produtos de PCR foi feita com aplicação de 5 μ L de cada um destes materiais acrescidos de 1 μ L de tampão de amostra 6X (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 10% 10X TAE) em gel de agarose a 2% (p/v), em tampão TAE 1X (Tris acetato 40 mM/EDTA 1 mM) a 100 V durante 30 minutos. Para visualização das bandas, o gel foi corado por 10 minutos em solução contendo brometo de etídio a 1,0 ug/mL. Para o gene da beta globina a concentração do gel de agarose foi de 2,5%, e o fracionamento eletroforético ocorreu a 80 V por 40 minutos.

Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320nm (HOEFER-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de tamanho molecular 50 pb (*ladder* 50 pb).

5.10. EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAM PELO MÉTODO NASBA

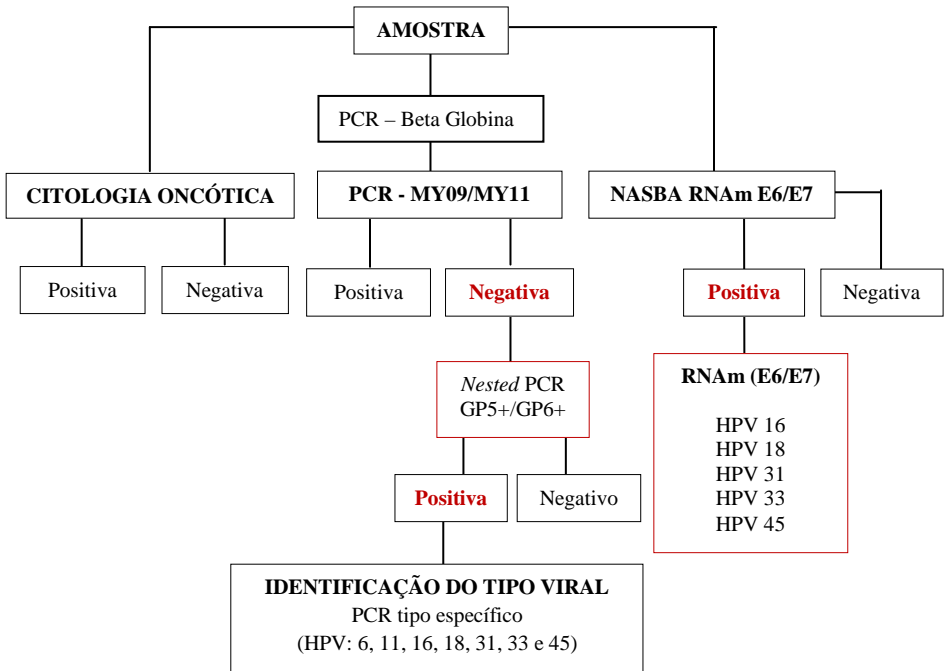
Os testes de amplificação do RNAm para as proteínas oncogênicas E6 e E7 foram feitos rigorosamente de acordo com as instruções do fabricante do *kit* NucliSENS EasyQ HPV®. Em resumo: foram utilizadas seis diferentes sondas moleculares capazes de detectar os HPVs tipos 16, 18, 31, 33, 45 e a ribonucleoproteína U1A (controle interno da reação). A detecção multiplex foi revelada com dois corantes fluorescentes: 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM) para os HPVs tipos 16, 31 e 33; 6-carboxi-X-rodamina (6-ROX) para o controle interno e para os HPVs tipos 18 e 45. A análise da cinética da reação foi feita pela medida do sinal fluorescente que revela a taxa de transcrição do controle interno e de cada um dos cinco tipos de RNAm alvos, expressos na forma de gráficos.

5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A elaboração do banco de dados e a análise dos resultados foram realizadas por meio do Software SPSS 16.0®. As variáveis nominais foram sumarizadas como números absolutos e percentuais. As variáveis numéricas foram sumarizadas como média, valores máximos e mínimos e desvio padrão. A associação entre variáveis foi avaliada pelo teste de qui quadrado, em um nível de significância de 95%. As técnicas de PCR e expressão de E6/E7 RNAm foram avaliadas, tomando-se como padrão

aéreo a citológica oncológica, calculando-se a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivo e negativo e a acurácia.

5.12. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA



6. RESULTADOS

Foram analisadas 162 amostras de raspado cervical obtidas de mulheres com média de idade de 37 anos, desvio padrão 12. A faixa inferior ou igual a 30 anos ($<$ ou $=$ a 30 anos) representou 55 (33,9%) amostras enquanto a faixa etária acima de 30 anos ($>$ 30 anos) 107 (66,1%).

6.1. CITOLOGIA ONCÓTICA OU CITOPATOLOGIA

As amostras que apresentaram atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US e ASC-H), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL – NIC2 e NIC3) foram consideradas positivas. Não houve na nossa amostragem casos de carcinoma invasivo. As amostras que apresentaram um padrão normal ou alterações celulares reacionais/inflamatórias foram consideradas negativas.

Das amostras analisadas, 80,2% (130/162) apresentaram resultados normais na citologia oncológica, tendo sido classificadas como negativas e 19,8% (32/162) foram positivas. A Tabela 3 apresenta a distribuição dos resultados das 162 amostras na citologia oncológica, segundo a classificação pelo Sistema de Bethesda 2001.

Tabela 3: Distribuição das 162 amostras, segundo a classificação de Bethesda 2001.

Citologia Oncótica	Número de amostras (%)
Negativa	130 (80,2%)
ASC-US	9 (5,6%)
ASC-H	4 (2,5%)
LSIL	9 (5,6%)
HSIL (NIC2 e NIC3)	10 (6,1%)
Total	162 (100%)

Quando estratificados por idade os resultados da citologia oncológica mostraram 12,4% (20/162) de positividade na faixa etária $<$ ou $=$ a 30 anos e 7,4% (12/162) na faixa etária $>$ 30 anos ($p=0,001$), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da citologia oncológica estratificados por faixa etária nas 162 amostras do estudo.

Faixa etária	Citologia Oncótica		
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	Total n (%)
< ou = 30	35 (21,6%)	20 (12,4%)	55 (34%)
> 30	95 (58,6%)	12 (7,4%)	107 (66%)
Total	130 (80,2%)	32 (19,8%)	162 (100%)

p= 0,001

6.2. PCR DA BETA GLOBINA HUMANA

A amplificação das amostras do estudo com o gene da beta globina humana, utilizada como o controle da presença de inibidores da PCR, apresentou 100% de amplificação (110 pb), indicando que todos os DNAs poderiam ser utilizados no estudo. A Figura 10 apresenta um gel ilustrativo de agarose com amostras amplificadas das pacientes do estudo para o gene da beta globina.

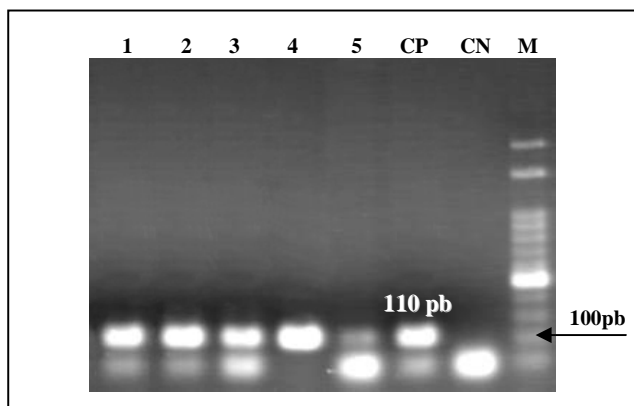


Figura 10. Gel representativo da amplificação do fragmento de 110pb para verificação da presença de inibidores da PCR com os iniciadores para o gene da beta globina. Os números de 1 a 5 representam as amostras clínicas positivas 100, 101, 102, 103 e 104; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação e M: Marcador de tamanho molecular 50pb (Invitrogen).

6.3. PCR PARA HPV (PCR-HPV)

As amostras foram submetidas à amplificação com os iniciadores consenso MY09 e MY11 para a pesquisa do DNA do HPV, destas 35 (21,6%) foram positivas. A Figura 11 apresenta um gel ilustrativo de agarose contendo amostras positivas e negativas para HPV. Embora esta seja uma reação qualitativa, pode-se observar diferença de intensidade no produto de 450pb, provavelmente por haver diferença na concentração do DNA molde de cada amostra.

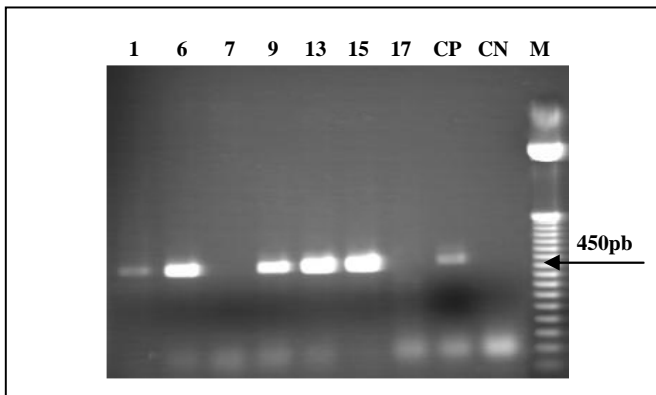


Figura 11. Gel representativo da amplificação do fragmento genérico de 450pb da região L1 do genoma do HPV com os iniciadores MY09/MY11. Os números 1, 6, 9, 13, e 15 correspondem a amostras clínicas cervicais positivas; os números 7 e 17 correspondem a amostras clínicas cervicais negativas; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: Marcador de tamanho molecular 50pb (Invitrogen).

6.4. NESTED PCR

Para aumentar a sensibilidade e especificidade da detecção do DNA de HPV, as amostras das PCRs com os iniciadores MY09/MY11 que não apresentaram DNA detectável, foram submetidas a uma reação *nested* PCR, com os iniciadores internos GP5+/GP6+.

Das 127 amostras submetidas à reação de *nested* PCR 27(16,7%) amplificaram o produto esperado de 150 pb. A Figura 12

apresenta um gel ilustrativo com amostras positivas e negativas na amplificação pela *nested* PCR.

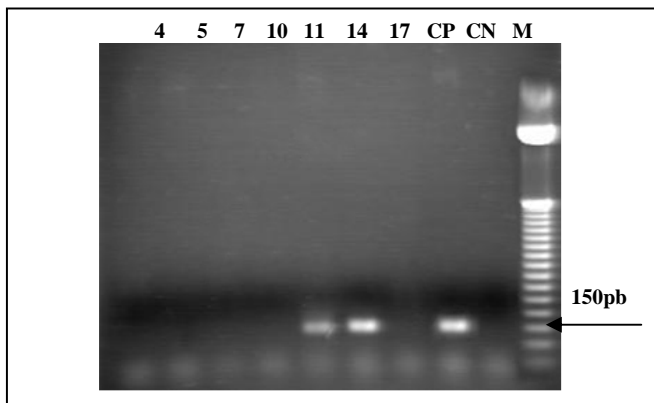


Figura 12. Gel representativo da amplificação do fragmento genérico de 150pb da região L1 do genoma do HPV com os iniciadores GP5+/GP6+. Os números 11 e 14 correspondem a amostras clínicas cervicais positivas; os números 4, 5, 7, 10 e 17, correspondem a amostras clínicas cervicais negativas; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: Marcador de tamanho molecular 50pb (Invitrogen).

6.5. POSITIVIDADE GLOBAL DA PCR-HPV

O resultado global da PCR-HPV, que inclui o somatório dos resultados da PCR com os iniciadores consenso MY09/MY11 e da *nested* PCR foi de 38,3% (62/162) de amostras positivas e 61,7% (100/162) de amostras negativas.

Quando estratificados por faixa etária os resultados da PCR-HPV mostraram 22,3% (36/162) de positividade na faixa etária \leq 30 anos e 16% (26/162) na faixa etária >30 anos ($p=0,001$), conforme apresentado na (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados da PCR-HPV estratificados por faixa etária nas 162 amostras do estudo.

Faixa etária	PCR-HPV		
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	Total n (%)
< ou = 30	19 (11,7%)	36 (22,3%)	55 (34%)
> 30	81 (50%)	26 (16%)	107 (66%)
Total	100 (61,7%)	62 (38,3%)	162 (100%)

p= 0,001

6.6. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA ONCÓTICA COM A PCR-HPV

A análise estatística do resultado global da PCR-HPV tendo como referência a citologia oncótica, por ser o método recomendado pelo Programa Nacional de Prevenção ao Câncer de Colo de Útero e de Mama, mostrou sensibilidade de 90,6%, especificidade de 74,6%, valor preditivo positivo (VPP) de 46,8%, valor preditivo negativo (VPN) de 97% e acurácia de 77,8%. Os resultados comparativos da citologia oncótica e da PCR-HPV estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6: Comparação dos resultados da citologia oncótica e da PCR-HPV.

PCR-HPV	Citologia Oncótica		
	Negativa	Positiva	Total
Negativa	97 (59,8%)	3 (1,9%)	100 (61,7%)
Positiva	33 (20,4%)	29 (17,9%)	62 (38,3%)
Total	130 (80,2%)	32 (19,8%)	162 (100%)

O DNA do HPV foi detectado em 66,7% (6/9) dos casos de ASC-US e em 100% dos casos de ASC-H, LSIL e HSIL. Entre os casos de citologia negativa, a detecção da PCR-HPV ocorreu em 25,4% (33/130) das amostras. A Tabela 7 permite verificar a distribuição dos resultados das PCR-HPV segundo a classificação de Bethesda 2001, nas 162 amostras do estudo.

Tabela 7: Distribuição dos resultados das 162 amostras para PCR-HPV segundo a classificação de Bethesda 2001, na citologia oncocítica.

Citologia Oncocítica	PCR HPV DNA		Total N
	Negativo n %	Positivo n %	
Negativa	97 (74,6%)	33 (25,4%)	130
ASC – US	3 (33,3%)	6 (66,7%)	9
ASC – H	-	4 (100%)	4
LSIL	-	9 (100%)	9
HSIL (NIC 2 e NIC 3)	-	10 (100%)	10
Total	100	62	162

6.7. EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm

A expressão de E6/E7 RNAm foi encontrada em 13,6% (22/162) das amostras analisadas.

Quando estratificados por faixa etária, conforme Tabela 8, os resultados da expressão gênica de E6 e E7 mostraram 9,3% (15/162) de positividade na faixa etária < ou = a 30 anos e 4,3% (7/162) na faixa etária >30 anos ($p=0,001$).

Tabela 8: Resultados da expressão de E6 e E7 RNAm estratificados por faixa etária nas 162 amostras do estudo.

Faixa etária	E6/E7 RNAm		Total n (%)
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
< ou = 30	40 (24,7%)	15 (9,3%)	55 (34%)
> 30	100 (61,7%)	7 (4,3%)	107 (66%)
Total	140 (86,4%)	22 (13,6%)	162 (100%)

$p=0,001$

A Figura 13 representa, de forma ilustrativa, os resultados de amostras testadas para expressão de E6/E7 RNAm pela tecnologia NASBA - NucliSENS EasyQ HPV (bioMérieux® S.A., Marcy l'Etoile, França).

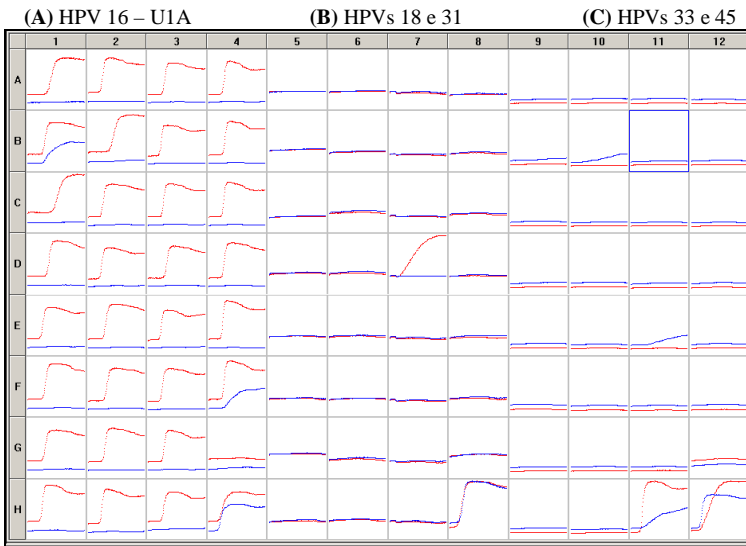


Figura 13. Representação ilustrativa dos resultados de amostras testadas para expressão de E6/E7 RNAm de HPV. Reação multiplex em tempo real: (A) U1A está representada em vermelho e HPV 16 em azul; (B) HPV-18 em vermelho e HPV-31 em azul; (C) HPV-45 e HPV-33. As linhas B1 e F4 são positivas para HPV-16; H4 representa o controle positivo (CP) do HPV-16; D7 amostra positiva para HPV-18; H8 representa o CP do HPV-18 e 31; B10 e E11 em azul são positivas para o HPV-33. H11 positiva para o HPV-33 e HPV-45 e H12 representa o CP do HPV-33 em azul e HPV-45 em vermelho; G4 e G12 são controles negativos.

6.8. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA ONCÓTICA COM A EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm.

A análise estatística dos resultados da expressão de E6/E7 RNAm tendo como referência a citologia oncótica, por ser o método recomendado pelo Programa Nacional de Prevenção ao Câncer de Colo de Útero e de Mama, mostrou sensibilidade de 40%, especificidade de 93%, valor preditivo positivo (VPP) de 59%, valor preditivo negativo (VPN) de 86% e acurácia de 83%. Na comparação dos resultados da citologia oncótica com a expressão de E6/E7 RNAm, houve concordância dos resultados em 74,7% (121/162) das amostras negativas e em 8% (13/162) das amostras positivas. Os resultados

comparativos da citologia oncótica e da expressão de E6/E7 RNAm estão sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9: Comparação dos resultados da citologia oncótica e expressão de E6/E7 RNAm.

E6/E7 RNAm	Citologia		Total n %
	Negativa n %	Positiva n %	
Negativa	121 (74,7%)	19 (11,7%)	140 (86,4%)
Positiva	9 (5,6%)	13 (8%)	22 (13,6%)
Total	130 (80,2%)	32 (19,8%)	162 (100%)

A expressão de E6/E7 RNAm, foi encontrada em 11,1% (1/9) dos casos de ASC-US; em 44,4% (4/9) dos casos de LSIL, em 75% (3/4) dos casos de ASC-H, em 50% (5/10) dos casos de HSIL. Entre os casos de citologia normal, a expressão de E6/E7 RNAm foi de 6,9% (9/130). A Tabela 10 permite verificar a distribuição dos resultados das 162 amostras para expressão de E6/E7 RNAm segundo a classificação de Bethesda 2001, na citologia oncótica.

Tabela 10: Distribuição dos resultados das 162 amostras para RNAm E6/E7 segundo a classificação do Sistema de Bethesda 2001, na citologia oncótica.

Citologia Oncótica	RNAm E6/E7		Total
	Negativo n %	Positivo n %	
Normal	121 (93,1%)	9 (6,9%)	130
ASC – US	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9
ASC – H	1 (25%)	3 (75%)	4
LSIL	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9
HSIL (NIC2 e NIC3)	5 (50%)	5 (50%)	10
Total	140	22	162

6.9. COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAM COM A PCR-HPV

Considerando-se a somatória dos resultados das metodologias PCR-HPV e expressão de E6/E7 RNAm empregadas no estudo, a infecção pelo HPV foi detectada em 39,5% (64/162) das amostras.

Os resultados da PCR-HPV foram positivos em 38,3% (62/162) das amostras, enquanto a expressão de E6/E7 RNAm foi positiva em 13,6% (22/162) das amostras. Das 22 amostras que apresentaram

positividade para a expressão de E6/E7 RNAm, 20 concordaram com os resultados da PCR-HPV. Duas amostras com expressão de E6/E7 RNAm positivas não tiveram o DNA detectado na PCR-HPV (Tabela 11). Os resultados da PCR-HPV e da expressão gênica de E6/E7 concordaram em 60,5% (98/162) das amostras com resultados negativos.

Tabela 11: Comparação dos resultados entre os métodos de PCR-HPV e expressão de E6/E7 RNAm.

E6/E7 RNAm	PCR-HPV		
	Negativo n %	Positivo n %	Total n %
Negativo	98 (60,5%)	42 (25,9%)	140 (86,4%)
Positivo	2 (1,2%)	20(12,4%)	22 (13,6%)
Total	100 (61,7%)	62 (38,3%)	162 (100%)

6.10. COMPARAÇÃO DA CITOLOGIA ONCÓTICA COM A PCR-HPV E A EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAM

A Figura 14 apresenta a distribuição das amostras positivas pelos métodos moleculares em relação aos resultados das citologias oncóticas.

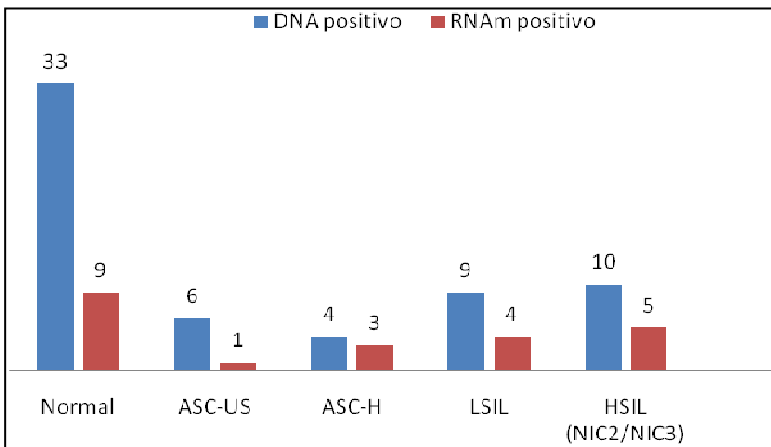


Figura 14: Distribuição das amostras positivas pelos testes moleculares PCR-HPV (DNA) e expressão de E6/E7 RNAm de acordo com o resultado da citologia oncótica segundo a classificação de Bethesda 2001.

6.11. IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE HPV

As amostras positivas na PCR-HPV foram submetidas à tipagem pela PCR-HPVte. Todas as amostras foram testadas para a expressão de E6/E7 RNAm, que ao determinar a reatividade de uma amostra já especifica o tipo ou os tipos virais presentes.

6.11.1. PCR-HPVte

Na PCR-HPVte foram utilizados iniciadores para os tipos de baixo risco 6 e 11 e para os tipos oncogênicos 16, 18, 31, 33 e 45. A Figura 15 apresenta os resultados de uma PCR-HPVte para o tipo viral 18 com um produto de amplificação de 247pb.

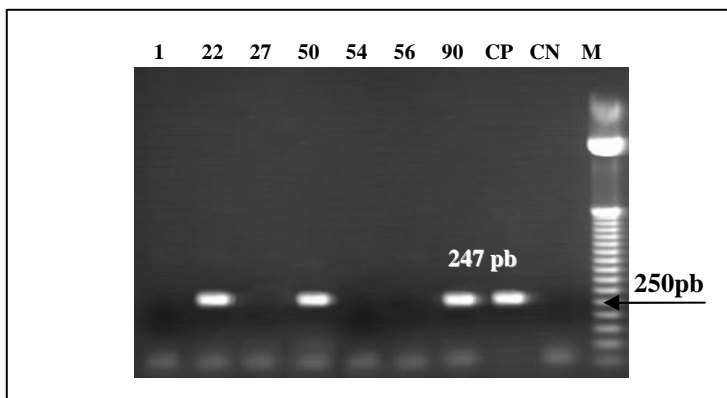


Figura 15. Gel representativo da amplificação do fragmento de 247pb com os iniciadores para o HPV 18. Os números 22, 50 e 90 correspondem a amostras clínicas cervicais positivas; os números 1, 27, 54, 56 correspondem a amostras clínicas cervicais negativas; CP: controle positivo da reação para o HPV 18; CN: controle negativo da reação; M: Marcador de tamanho molecular 50pb (Invitrogen).

A PCR-HPVte, com os iniciadores utilizados no estudo, possibilitou a identificação de 37,1% (23/62) das amostras, sendo que das 23 amostras tipadas, três (13%) apresentaram coinfeção com dois

tipos virais cada uma. Utilizando-se a PCR-HPVte como estratégia, o tipo viral não foi identificado em 62,9% (39/62) das amostras.

Os tipos oncogênicos foram identificados em 29% (18/62) das amostras. Os tipos de HPVs de baixo risco foram identificados em 8,1% (5/62) das amostras positivas na PCR-HPV.

O HPV 16 foi encontrado em 11,3% (7/62) das amostras positivas, o HPV 33 em 11,3% (7/62), o HPV 18 em 6,5% (4/62), o HPV6 em 6,5% (4/62), o HPV 31 em 3,2 % (2/62), o HPV 45 em 1,6 % (1/62) e o HPV 11 em 1,6 % (1/62). Os tipos virais identificados nas co-infecções foram: HPVs tipos 16 e 33 em duas amostras, e os HPVs tipos 33 e 45 em uma amostra. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos pela PCR-HPVte.

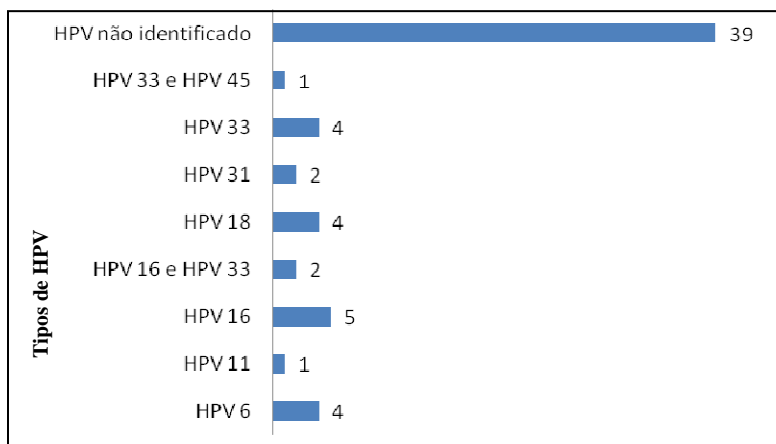


Figura 16: Resultados das amostras testadas pela PCR-HPVte.

6.11.2 Expressão de E6/E7 RNAm

O método NASBA para a expressão de E6/E7 RNAm é capaz de detectar apenas os cinco tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33 e 45) que são os mais prevalentes em carcinomas cervicais.

Um total de 22 amostras apresentou expressão de E6/E7 RNAm, sendo que três delas apresentaram coinfecção com dois tipos virais, por isso o cálculo da frequência dos tipos virais com esta metodologia foi feito no total de 25.

O HPV 16 foi encontrado em 28% (7/25) das amostras positivas, o HPV tipo 33 em 28% (7/25), o HPV 18 em 20% (5/25), o

HPV 31 em 12% (3/25) e o HPV 45 em 12% (3/25). Das 22 amostras positivas para a expressão gênica, três (13,6%) estavam coinfectadas, dessas: duas apresentaram os HPVs tipos 16 e 33 e uma os HPVs tipos 33 e 45, conforme apresentado na Figura 17.

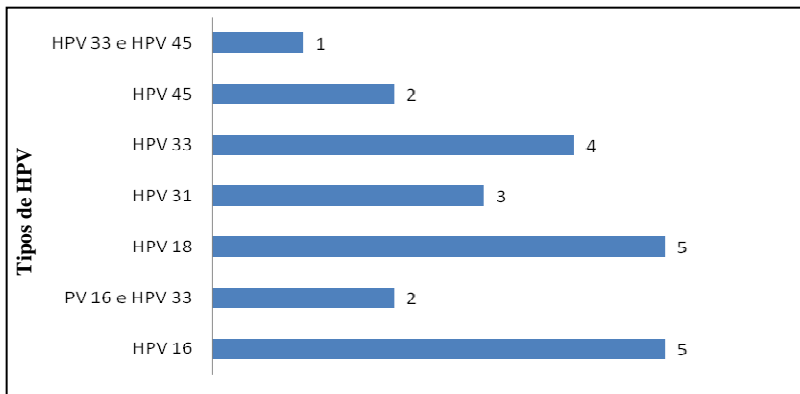


Figura 17: Resultados das amostras positivas na metodologia de expressão de E6/E7 RNAm.

6.12. TIPOS VIRAIS MAIS FREQUENTES

Os tipos virais mais frequentes no estudo em ordem decrescente, considerando-se 64 amostras, ou seja, 62 positivas na PCR-HPV e ou na expressão de E6/E7 RNAm e duas positivas somente na expressão de E6/E7 RNAm, foram: HPV 16 em 12,5% (8/64) das amostras, HPV 33 em 10,9% (7/64), HPV 18 em 7,8% (5/64), HPV 6 em 6,3% (4/64), HPV 31 em 4,7% (3/64), HPV 45 em 4,7% (3/64) e HPV 11 em 1,6% (1/64) das amostras. Dentre as duas amostras que foram positivas somente na expressão de E6/E7 RNAm, uma apresentou o HPV 45 e a outra o HPV 31. Em 4,7% (3/64) das amostras foi identificado mais de um tipo viral, dessas 66,7% (2/3) estavam coinfectadas com os HPVs 16 e 33. Em 56,2% (36/64) das amostras o tipo viral não foi identificado (Figura 18).

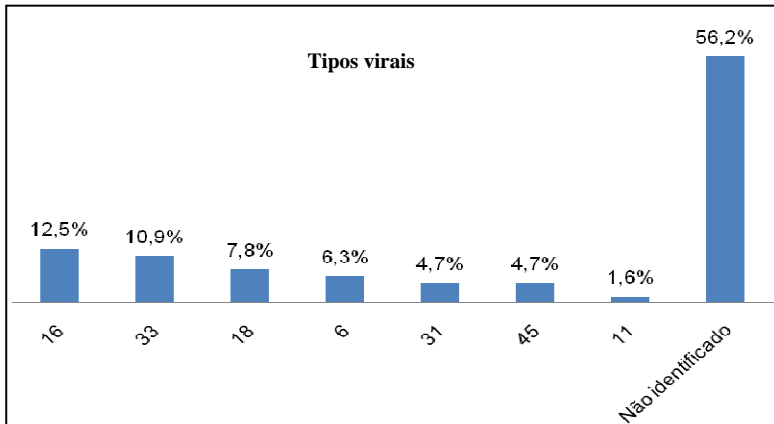


Figura 18. Frequência dos tipos de HPV identificados em 64 amostras.

6.13. COMPARAÇÃO DA PCR-HPVTE COM A CITOLOGIA ONCÓTICA

Comparando os resultados da PCR-HPVte com a citologia oncológica, observou-se que o HPV tipo 16 foi identificado em 2,3% (3/130) das amostras com citologias normais, em 22,2% (2/9) dos casos de LSIL e em 20% (2/10) dos casos de HSIL. Enquanto que o HPV tipo 33 foi identificado em 2,3% (3/130) dos casos das citologias normais, em 11,1% (1/9) dos casos de LSIL, em 20% (2/10) dos casos de HSIL e em 25% (1/4) dos casos de ASC-H. A Tabela 12 apresenta a distribuição dos tipos de HPVs incluídos neste estudo, de acordo com a classificação da citologia oncológica.

Tabela 12. Resultado da citologia oncológica comparados com a presença dos tipos de HPV identificados pela PCR-HPVte.

Citologia	Total	Tipos de HPV								Total
		6	11	16	18	31	33	45	NI	
Normal	130	2	-	3	1	-	3	-	121	9
ASC-US	9	2	1	-	-	-	-	-	6	3
ASC-H	4	-	-	-	-	2	1	-	1	3
LSIL	9	-	-	2	2	-	1	-	4	5
HSIL(NIC2/NIC3)	10	-	-	2	1	-	2	1	4	6
Total	162	4	1	7	4	2	7	1	136	26

NI: Não identificados

6.14. COMPARAÇÃO DA PCR-HPVTE COM A EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAM

Quando comparados os resultados da PCR-HPVte com a expressão de E6/E7 RNAm, considerando-se somente os cinco tipos pesquisados pela metodologia NASBA (16, 18, 31, 33 e 45), observou-se que a PCR-HPVte detectou 77,3% (17/22) dos casos positivos na expressão de E6/E7 RNAm.

Em duas amostras, o DNA do HPV não foi detectado pela PCR-HPV, e em outras três amostras positivas pela PCR-HPV e expressão de E6/E7 RNAm não houve amplificação com nenhum dos iniciadores da PCR-HPVte. Nessas três amostras, os tipos identificados pela expressão de E6/E7 RNAm foram: HPV 16, 18 e 45. Uma amostra para o tipo oncogênico 16 amplificou pela PCR-HPVte e não apresentou expressão de E6/E7 RNAm.

7. DISCUSSÃO

CITOLOGIA ONCÓTICA E PCR-HPV

Durante os últimos 40 anos o exame de Papanicolaou (citologia oncótica) tem sido o principal meio de rastreamento para a prevenção do câncer cervical (SALMERON et al., 2003). A prevenção deste tipo de câncer é possível, pois sua evolução em geral ocorre de forma lenta, com fases pré-clínicas detectáveis, e expressivo potencial de cura. Apesar de existirem estratégias eficazes para sua prevenção, o câncer do colo do útero continua sendo um importante problema de Saúde Pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a cobertura do diagnóstico precoce não é universal. No Brasil, o diagnóstico ocorre em uma grande parcela das mulheres em fase avançada da doença, o que limita a possibilidade de cura (BEZERRA et al., 2005; RAMA et al., 2008b).

A efetividade da citologia oncótica no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo do colo do útero tem sido reconhecida pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), porém, a incidência da doença se mantém como uma das mais altas entre as neoplasias malignas que ocorrem em mulheres brasileiras. Mesmo após a implementação do Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama – Viva Mulher, na segunda metade da década de 90, as taxas de mortalidade por câncer de colo uterino, continuam altas, ao contrário do que ocorre em países desenvolvidos (VINCE et al., 2001; BEZERRA et al., 2005; INCA, 2010).

A citologia oncótica vem sofrendo uma série de críticas devido aos índices de resultados falso-negativos, que variam de 5% a 70%, e de falso-positivos, 10% a 30% de acordo com Santos e colaboradores (2003). Outros autores consideram que essa variação ocorre em torno de 15% a 50% para os resultados falso-negativos, e em média de 10% para falso-positivos (FARTHING et al., 1994; ALTIOK, 2003; CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

Existem várias limitações comprovadas na citologia oncótica, como a possibilidade de preparação inadequada dos esfregaços, a leitura incorreta das lâminas, a falta de controle de qualidade e a falta de dados clínicos (SANTOS et al., 2003).

Em um estudo transversal realizado com 5.485 mulheres nas cidades de São Paulo e Campinas, os autores analisaram a história do rastreamento citológico de pacientes que apresentaram alterações citológicas e confirmação histológica para câncer cervical. A realização

de exame citológico anterior foi referido por 100% das mulheres com citologia compatível com carcinoma, 97,6% das que apresentaram lesões intraepiteliais de alto grau, 100% daquelas com confirmação histológica de carcinoma cervical, e 92,6% das mulheres com neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC3). A realização de citologia anterior em período inferior a três anos foi referida, respectivamente, por 86,5% e 92,8% das participantes com alterações citológicas e histológicas. Esses achados, evidenciam a necessidade de estudos especialmente desenhados para avaliação da qualidade dos programas de rastreamento para o câncer cervical no país (RAMA et al., 2008b).

Estudos sugerem que a sensibilidade da citologia, como rastreio primário, para neoplasia cervical varia entre 50 e 80% (Lorenzato et al., 2000), enquanto a detecção do DNA do HPV se mostra mais sensível, pois consideram que os diagnósticos realizados por microscopia são propensos a subjetividade e equívocos, sobretudo quando pequenas alterações morfológicas estão presentes (SCHIFFMAN et al., 2003).

Atualmente, há evidências de que a detecção do DNA do HPV é significativamente mais sensível, porém menos específica para a detecção de lesões pré neoplásicas e neoplásicas do câncer do colo uterino em relação à citologia, principalmente para a detecção de infecções transitórias que ainda não produziram alterações morfológicas (CUZICK, et al., 2006a; CASTLE et al., 2007). Os testes moleculares mais utilizados são a reação em cadeia da polimerase (PCR) com utilização de iniciadores consenso, a PCR com iniciadores específicos e a Captura Híbrida 2 (de CREMOUX et al., 2003).

O interesse no uso dos testes de HPV como metodologia de rastreamento, se baseia no fato de que o DNA do vírus está presente em quase todos os casos de câncer cervical, na disponibilidade e fácil execução destes testes, os quais apresentam maior sensibilidade do que a citologia oncológica em vários estudos para os casos de lesões intraepiteliais cervicais de alto grau – NIC2+ (CUZICK, et al., 2006a).

Em média, a sensibilidade do teste de DNA HPV é 27% maior do que a da citologia oncológica em termos absolutos, e a especificidade 8,4% mais baixa (VILLA & DENNY, 2006). Salmeron e colaboradores (2003) demonstraram uma sensibilidade de 93,1% e especificidade de 91,8% para o teste de DNA do HPV e para a citologia oncológica, sensibilidade de 59,4% e especificidade de 98,3% quando comparados a histologia.

Nosso estudo encontrou sensibilidade de 90,6% para a detecção do DNA-HPV pela PCR, especificidade de 74,6%, valor preditivo positivo de 46,8% e valor preditivo negativo de 97%. A diferença

observada entre os nossos resultados e o de outros autores, especialmente em relação à especificidade, pode ser explicada pelo fato de termos utilizado como padrão áureo a citologia oncótica. Nossa decisão em considerar este padrão foi porque se trata do método recomendado no país para o rastreamento e representa a realidade de laboratórios clínicos nos quais, muitas vezes, são testadas amostras sem qualquer informação clínica. O elevado valor preditivo negativo do nosso estudo pode indicar que a PCR é um excelente teste de rastreio uma vez que pode excluir, com segurança, os casos negativos e manter em acompanhamento apenas os positivos

No presente estudo, 80,2% (130/162) das amostras analisadas pela citologia foram classificadas como negativas e 19,8% (32/162) como positivas (ASC-US+). A distribuição dos casos de ASC-US e LSIL foram equivalentes, nove casos cada, enquanto 10 amostras apresentaram HSIL e quatro amostras foram classificadas como ASC-H, Tabela 3.

Quando estratificadas por idade, as mulheres com faixa etária inferior ou igual a 30 anos (< ou = a 30 anos) representaram 55 (33,9%) amostras, enquanto a faixa etária acima de 30 anos (> 30 anos) foi composta por 107 (66,1%) amostras. Em relação aos resultados da citologia oncótica, 20 (12,4%) amostras foram positivas para a faixa etária inferior ou igual a 30 anos, e 12 (7,4%) amostras foram positivas para a faixa etária acima de 30 anos ($p=0,001$), Tabela 4.

O índice de detecção da infecção pelo HPV depende da população estudada, do método de detecção, do tipo de amostra e de como é obtida (FREITAS et al., 2007). Os pares de iniciadores consensos MY09/MY11 e GP5+/GP6+, que amplificam parte do gene estrutural, a proteína L1 do capsídeo viral, têm sido descritos desde 1990, e apresentam como vantagem a capacidade de identificar um grande número de tipos de HPV. O uso de mais de um par de iniciadores consenso, aumenta a taxa de detecção da infecção pelo HPV em amostras cervicais (CARRILO et al., 2004). O par de iniciadores consenso GP5+/GP6+ inclui uma modificação no final da sequência 3' em relação ao par de iniciadores GP5/GP6 e possibilita um aumento na detecção da infecção pelo HPV (de RODA HUSMAN et al., 1995).

Provavelmente a amplificação de um fragmento gênomico menor (142-150pb) obtida com os iniciadores GP5+/GP6+ pode ser mais eficiente e aumentar a sensibilidade da reação, quando comparada a um produto de amplificação maior (450pb), obtido com os iniciadores MY09/MY11, (HUSNJAK et al., 2000; FREITAS et al., 2007).

Os iniciadores consenso MY09/MY11 possuem a capacidade de detectar 39 tipos de HPV, enquanto o sistema GP5+/GP6+ pode detectar 20 tipos. No entanto, nem todos os tipos tendem a ser amplificados da mesma forma do que quando esses iniciadores são utilizados isoladamente (ROSENBLATT et al., 2005; PANNIER-STOCKMAN et al., 2008). O uso de MY/GP em sistema *nested* PCR tem sido proposto como um meio para diminuir esta limitação, além de aumentar a sensibilidade de detecção, com positividade 38,8%, maior em relação ao uso apenas dos iniciadores MY (EVANDER et al., 1992; HUSNJAK et al., 2000).

A detecção do DNA do HPV neste estudo, utilizando-se a PCR, ocorreu em 38,3% das amostras, maior do que os relatos de Ayres & Silva (2010) que analisaram a prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil, por meio de uma revisão sistemática, e reportaram uma variação de 16,8% a 28,6% na prevalência do HPV em mulheres brasileiras. Já na Alemanha foi encontrada uma frequência de 32,5% do DNA do HPV em amostras citológicas analisadas pela PCR (SPEICH et al., 2004).

No presente estudo, foi observado um aumento na sensibilidade de 16,7% da detecção da infecção pelo HPV quando utilizado o sistema *nested* PCR. O DNA do HPV foi detectado em 62 amostras, 35 com os iniciadores MY09/MY11 e 27 pelo sistema *nested* PCR.

Nas 162 amostras analisadas, 33 (20,4%) apresentaram resultados positivos na PCR-HPV e negativos na citologia oncológica, 29 (17,9%) amostras foram positivas nas duas metodologias e três (1,9%) amostras foram negativas na PCR-HPV e positivas na citologia oncológica (Tabela 6). Observamos que o sistema *nested* PCR aumentou a detecção da infecção nas amostras negativas na citologia, 20 (74,1%) das 27 amostras positivas pelo sistema *nested* PCR, apresentaram resultados negativos para a citologia oncológica. Comparando-se os resultados obtidos com os iniciadores MY e GP em relação às citologias negativas, os iniciadores MY09/MY11 detectaram a presença do DNA do HPV em 13 amostras. Esses dados confirmam os achados de outros estudos, que por meio da *nested* PCR aumentaram a taxa de detecção do DNA HPV de 5,6% para 19,2% nas amostras classificadas citologicamente como negativas (EVANDER et al., 1992).

Segundo Cuzick e colaboradores (2006b), existem decisões a serem tomadas a respeito do rastreamento primário. Nos países onde a citologia tem boa qualidade, a solução mais interessante seria fazer o rastreamento com teste molecular e reservar a citologia para as mulheres com positividade para o DNA do HPV. Entretanto, nos países com menor

infraestrutura, a detecção do DNA isoladamente pode ser interessante, caso se faça o tratamento imediatamente para minimizar o número de consultas e exames e racionalizar o uso de recursos públicos (CUZICK, et al., 2006b).

A detecção do DNA de HPV em amostras com resultados negativos na citologia é importante para a prevenção do câncer de colo uterino. Nossos dados indicam que as pacientes com estes resultados devem ser acompanhadas para avaliar a resolução espontânea da infecção ou uma possível evolução para o câncer, uma vez que o achado do DNA do HPV integrado, pela expressão de E6/E7 RNAm nas amostras com citologia negativa possibilita verificar a fragilidade da citologia oncológica como padrão áureo no rastreamento e pode reforçar a importância em se valorizar a presença do DNA (ou RNA) do HPV nas amostras.

Em nosso estudo, a proporção da infecção pelo HPV foi maior no grupo de faixa etária até 30 anos, com 36 (22,3%) amostras. Para o grupo de mulheres acima dos 30 anos, o DNA viral foi encontrado em 26 (16%) amostras, Tabela 6. Esse dado corrobora com o que se conhece sobre a história natural da doença, que mostra decréscimo da infecção nos grupos etários após os 30 anos (CASTELLSAGUÉ, 2008). Molden e colaboradores (2006), em estudo realizado na Noruega, com mulheres na faixa etária inferior a 30 anos, utilizando os iniciadores GP5+/GP6+, detectaram a presença da infecção pelo HPV em 32,5% das amostras.

Neste estudo, o DNA do HPV foi detectado em 90,6% dos casos de citologia oncológica positivas. De acordo com a Tabela 7, o DNA do HPV foi encontrado em 100% das citologias com diagnóstico de ASC-H, LSIL e HSIL e em 66,7% (6/9) dos casos de ASC-US, evidenciando o aumento da frequência do DNA do vírus de acordo com o aumento do grau de severidade das lesões. Esses achados coincidem com relatos da literatura (MEIJER et al., 1992; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003; NAUCLER et al., 2009). Meijer e colaboradores (1992) relatam que há uma relação clara entre a positividade do HPV e o grau de severidade da doença. O grau de discariose está associado à infecção persistente pelo HPV, enquanto que as anormalidades menores são mais frequentemente associadas às lesões ou infecções transitórias. Considerando-se somente as citologias oncológicas classificadas como negativas (Tabela 7), 25,4% (33/130) foram positivas para o DNA do HPV. Essa frequência é maior do que o observado em estudos de Nonnenmacher e colaboradores (2002) e Krambeck e colaboradores (2008) que utilizando a PCR reportaram respectivamente 13,8% e 18%

da presença do DNA do HPV nos casos de citologias normais e igual aos dados reportados por Freitas e colaboradores (2007) que encontraram a taxa 25,4%. De acordo com Naucler e colaboradores (2009), a taxa de prevalência do DNA viral do HPV encontrada variou de 5,4% nos casos de citologias normais a 86,5% para os casos com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC2+).

Molden e colaboradores (2005a), em estudo realizado na Noruega, acompanhando mulheres com mais de 30 anos, encontraram uma positividade no teste de DNA com os iniciadores consenso GP5+/GP6+ de 47,4% (27/57) para os casos de ASC-US e de 75% (15/20) para as amostras com diagnóstico citológico de LSIL. Comparando aos resultados do presente estudo, a diferença nas taxas de identificação do DNA do HPV nesses casos, pode estar associada ao fato de termos utilizado o sistema *nested* PCR, o qual permitiu um aumento em nosso estudo na sensibilidade da PCR.

EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm, CITOLOGIA E PCR-HPV

A literatura é rica em relatos que demonstram que a infecção pelos HPVs de alto risco, e a persistência dessas infecções, são as principais causas de quase todos os casos de câncer cervical (WALBOOMERS et al., 1999; ZUR HAUSEN, 2002; MUNOZ et al., 2003). A maioria das infecções por HPVs de alto risco regridem espontaneamente entre seis e 12 meses após o aparecimento, persistindo em apenas um pequeno percentual de casos. Sem tratamento cirúrgico, essas infecções remanescentes podem progredir para lesões de alto grau e carcinomas escamosos ou adenocarcinomas do colo do útero (CATTANI et al., 2009).

A citologia apresenta dificuldades em prever quais lesões de baixo grau irão progredir para lesões de alto grau e até mesmo para o câncer; além disso, uma elevada taxa de falso-negativos no rastreamento citológico enfatiza a necessidade de se utilizar melhores marcadores prognósticos para a detecção precoce de lesões pré-cancerosas (MOLDEN et al., 2006; LIE e KRISTENSEN, 2008).

Mulheres com infecção ativa pelo HPV irão expressar os oncogenes E6/E7 de HPV. Estes oncogenes expressam as proteínas E6 e E7 que são necessárias para a transformação maligna, por inibição das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, as quais desempenham papel importante no controle do ciclo celular e no reparo do DNA (LIE et al., 2005; CATTANI et al., 2009).

Os transcritos de RNAm são detectados por métodos moleculares, e a superexpressão de E6/E7 dos tipos oncogênicos pode ser um marcador muito específico de lesões pré-cancerosas que precisam de atenção clínica (LIE et al., 2005; CASTLE et al., 2007).

Embora a eficácia dos testes de RNA ainda tenha que ser avaliada em ensaios clínicos de grande escala, estudos são encorajadores (CUSCHIERI, WHITLEY, CUBIE, 2004; CUSCHIERI E WENTZENSEN, 2008; CATTANI et al., 2009), sugerindo que os ensaios baseados na expressão de E6/E7 RNAm poderiam ter maior valor prognóstico do que os testes baseados em DNA, e que poderiam desempenhar um importante papel em futuros programas de triagem (LIE et al., 2005; CASTLE et al., 2007; BOULET et al., 2008; CUSCHIERI E WENTZENSEN, 2008).

A maioria dos protocolos propostos para a triagem do HPV emprega os iniciadores MY09/MY11, PGMY09/PGMY11 e GP5+/GP6+, que amplificam parte do gene estrutural, a proteína L1 do capsídeo viral, identificando presença do DNA viral. A PCR, entretanto, não distingue entre infecções transitórias e as potencialmente transformantes (CUSCHIERI et al., 2004; ROSENBLATT et al., 2006; CASTLE et al., 2007; LIE & KRISTENSEN, 2008; CATTANI et al., 2009). No entanto, como é a persistência viral que é considerada um dos fatores principais para a progressão neoplásica (Kjaer et al., 2002), e a expressão dos oncogenes virais E6/E7 é necessária para a transformação maligna, a detecção da expressão de E6/E7 RNAm dos principais tipos de HPVs oncogênicos pode ser melhor para se avaliar o risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de baixo e de alto grau (LSIL/HSIL) e para avaliar a progressão para o câncer cervical (MOLDEN et al., 2006). Pode, também, fornecer alto valor prognóstico, aumento da especificidade e do valor preditivo positivo quando comparado com o teste de DNA do HPV numa triagem (LIE & KRISTENSEN, 2008).

A identificação das mulheres com infecção pelo HPV e que possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de HSIL (NIC 3) e carcinoma invasivo, é uma chave fundamental na triagem do câncer do colo uterino (VARNAI et al., 2008).

Neste estudo, a expressão de E6/E7 RNAm mostrou sensibilidade de 40%, especificidade de 93%, valor preditivo positivo (VPP) de 59%, valor preditivo negativo (VPN) de 86% e acurácia de 83%. Considerando-se que a expressão de E6/E7 RNAm está fortemente correlacionada com o grau de severidade das lesões, nossos resultados indicam uma baixa sensibilidade do método quando utilizado em

rastreamento primário associada particularmente com a detecção de apenas cinco tipos de HPVs de alto risco, portanto, sugere-se futuras avaliações para o seu uso no acompanhamento e monitoramento dos casos positivos na citologia e nos testes de DNA para verificar o potencial evolutivo da infecção e subsequente intervenção clínica.

A expressão de E6/E7 RNAm foi encontrada em 13,6% (22/162) das amostras analisadas. Em relação à idade, 15 (9,3%) amostras foram positivas para a faixa etária inferior ou igual a 30 anos, e 7 (4,3%) amostras foram positivas para a faixa etária acima de 30 anos ($p=0,001$), Tabela 8. Embora a maioria das infecções possa ser transitória na faixa etária inferior a 30 anos e alguns programas de rastreamento em países desenvolvidos proponham a utilização de testes de HPV em mulheres com idade acima dos 30 anos, nossos resultados alertam para um acompanhamento mais estreito nessa população. No estudo de Molden e colaboradores (2006), em uma população de mulheres com idade inferior a 30 anos, a frequência da expressão de E6/E7 foi de 14,5%.

Quando comparamos os resultados da citologia oncótica à expressão de E6/E7 RNAm, no presente estudo, ambas as metodologias mostraram concordância em 74,7% (121/162) das amostras negativas e em 8% (13/62) das amostras positivas, Tabela 9. Embora já relatado que a infecção pelo HPV involui em grande parte das mulheres com idade superior a 30 anos, a expressão dos oncogenes E6/E7 é um indicativo importante para o acompanhamento dessas pacientes porque o vírus está incorporado ao genoma celular, possibilitando a evolução para o câncer cervical.

A distribuição dos resultados das amostras do estudo para expressão de E6/E7 RNAm segundo a classificação de Bethesda 2001 na citologia oncótica, demonstrou que as amostras foram positivas para a expressão de E6/E7 RNAm em 11, 1% (1/9) dos casos de ASC-US; 44,4% (4/9) dos casos de LSIL; 75% (3/4) dos casos de ASC-H; 50% (5/10) dos casos de HSIL, Tabela 10, demonstrando um aumento na proporção dos casos de expressão de E6/E7 RNAm de acordo com o grau de severidade das lesões. Varnai e cols (2008) encontraram 57,9% (11/19) de positividade para E6/E7 RNAm nas citologias classificadas como LSIL e 85,7% (18/21) para as citologias classificadas como HSIL. Estudos anteriores relatam um aumento na expressão de E6/E7 RNAm de acordo com o aumento do grau de severidade das lesões (SOTLAR et al., 2004; CASTLE et al., 2007; LIE & KRISTENSEN, 2008). Molden e cols (2005a), encontraram nas citologias classificadas como atípicas (ASC-US), a expressão de E6/E7 RNAm em 21% (12/57) dos casos, e

para as amostras referidas como LSIL 30% (6/20) dos casos. As diferenças encontradas nos percentuais de expressão de RNAm E6/E7 podem estar relacionadas com a heterogeneidade existente na distribuição geográfica dos diferentes tipos de HPVs, podendo portanto, outros tipos de HPVs oncogênicos não incluídos neste estudo estarem presentes.

Considerando-se os casos de citologia normal, 6,9% (9/130) das amostras neste estudo tiveram a expressão de E6/E7 RNAm detectada (Tabela 10), enquanto Lie e colaboradores (2005) relataram uma positividade de 5% (2/38) para E6/E7 RNAm nos casos com resultados citológicos e histológicos normais. Em nosso estudo não dispomos dos dados da histopatologia.

Dentre o total de 22 amostras com expressão de E6/E7 RNAm deste estudo, as análises citológicas classificadas como positivas (ASC-US +) corresponderam a 59,1% (13/22). Halfon e colaboradores (2010), comparando os resultados histológicos de mulheres com diagnóstico de ASC-US+ relataram 46% (65/140) de positividade para E6/E7 RNAm.

No presente estudo, aproximadamente três vezes mais mulheres (Tabela 11) apresentaram o teste de DNA, PCR-HPV, positivo (38,3%, 62/162) em relação àquelas que apresentaram resultado positivo para E6/E7 RNAm (13,6%, 22/162). Essa diferença possivelmente reflete um estado episomal do vírus, detectado pela PCR. Neste estado a regulação do processo de transcrição celular é ainda eficaz e há maior probabilidade da infecção desaparecer espontaneamente (CATTANI et al., 2009). Uma infecção latente ou subclínica pode explicar a presença do DNA do HPV sem a detecção dos oncogenes E6/E7 (MOLDEN et al., 2006). Alternativamente, as amostras com DNA HPV positivas pela PCR com iniciadores consenso podem refletir tipos virais diferentes, não incluídos entre os tipos pesquisados pela expressão de E6/E7 RNAm.

Considerando-se a somatória dos resultados das metodologias PCR-HPV e expressão de E6/E7 RNAm empregadas no estudo, a infecção pelo HPV foi detectada em 39,5% (64/162) das amostras.

Das 22 amostras que apresentaram positividade para a expressão de E6/E7 RNAm, 20 concordaram com os resultados da PCR-HPV. Entre as 162 amostras, 60,5% (98/162) foram negativas em ambas as metodologias PCR-HPV e E6/E7 RNAm (Tabela 11), e a concordância da PCR-HPV com os resultados positivos da expressão de E6/E7 RNAm foi de 90,9% (20/22) dos casos. Inicialmente, das 22 amostras positivas para expressão de E6/E7 RNAm, 6 amostras (27,3%), não apresentaram amplificação pela PCR-HPV quando foi

utilizado somente os iniciadores MY09/MY11. Dessas amostras, 66,7% (4/6) apresentaram amplificação quando foi utilizado o sistema *nested* PCR, aumentando a sensibilidade da detecção.

Em duas das 162 amostras (1,2%), a expressão de E6/E7 RNAm foi positiva, enquanto a PCR-HPV foi negativa. Molden e colaboradores (2006) encontraram uma amostra 0,35% (1/283) com expressão de E6/E7 RNAm positiva e negativa para a PCR, enquanto que Lie e colaboradores (2005), identificaram 4,1% (10/245) das amostras positivas para E6/E7 RNAm com resultado negativo para o DNA do HPV tendo utilizado o método de Captura Híbrida 2 (LIE et al., 2005). Já Halfon e colaboradores (2010), encontraram 2,8% (4) das amostras positivas para E6/E7 RNAm e negativas para DNA do HPV. Em contrapartida, Varnai e colaboradores (2008), utilizando o teste Prelect HPV-Proofer kit (NorChip AS) para o RNAm E6/E7, demonstraram que todas as amostras que tiveram expressão de E6/E7 RNAm foram positivas para a PCR com os iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+, portanto com 100% de concordância. Uma possível explicação para os casos de DNA negativo com E6/E7 RNAm positivos, seria a perda do gene L1 do HPV durante a sua integração ao genoma do hospedeiro (TATE et al., 1996; KRAUS et al., 2006), visto que a maioria dos protocolos de PCR para o HPV utilizam iniciadores consenso a partir do gene L1 do vírus (CUSCHIERI CUBIE, WHITLEY, 2004).

Quando comparamos a distribuição das amostras positivas pelos dois métodos moleculares em relação aos resultados das análises citológicas, foi observado que nos casos classificados como ASC-H, LSIL e HSIL, há uma diminuição na discordância dos resultados, nos casos de DNA e RNAm positivos, em relação às amostras classificadas como normais (negativas) e, também, em relação aos casos de ASC-US, Figura 14. Essas discordâncias entre DNA e RNAm, como citado anteriormente, podem refletir um estado episomal do vírus e ao fato de que a expressão de E6/E7 RNAm, incluída neste estudo, detecta a atividade oncogênica de apenas cinco tipos de HPVs de alto risco.

IDENTIFICAÇÃO DO TIPO VIRAL PELA PCR-HPVTE E EXPRESSÃO DE E6/E7 RNAm

Para a identificação do tipo viral utilizando-se a metodologia PCR-HPVte, foram utilizados iniciadores desenhados a partir de regiões altamente variáveis entre os tipos de HPVs, como as regiões E6 e E7,

especialmente para os HPV's de alto risco, e para os de baixo risco, desenhados a partir da região LCR para o HPV 6 e região L1 para o HPV 11, fato que possibilita a amplificação específica dos tipos pesquisados (HUBBARD et al., 2003; CARVALHO et al., 2010).

Os tipos, 16, 18, 31, 33 e 45, foram escolhidos porque representam os mais frequentes entre os casos de câncer cervical, aproximadamente 80% (Castellsagué, 2008), enquanto os tipos 6, 11 mais de 90% dos casos de condiloma acuminado (VILLA et al., 2005; LINHARES & VILLA, 2006). Quando utilizada a PCR-HPVte para os sete tipos pesquisados, foi possível identificar o tipo viral em 37,1% (23/62) das amostras. Carvalho e colaboradores (2010) identificaram 36% das amostras (94/260) utilizando esta mesma estratégia. A baixa efetividade deste método para a identificação do tipo viral pode ser atribuída ao pequeno número de tipos de HPV's investigados, supondo-se a presença de outros tipos virais não incluídos neste estudo, ou problemas metodológicos.

Pela PCR-HPVte, os tipos oncogênicos foram identificados em 29% (18/62) das amostras. Os tipos de HPV's de baixo risco foram identificados em 8,1% (5/62) das amostras. Os HPV's 16 e 33 foram os mais frequentes neste estudo (11,3% cada um), seguidos dos HPV's 18 e 6, ambos presentes em 6,5% (4/62) das amostras. Vários estudos reportam o HPV 18 como o segundo mais prevalente (MUNÔZ et al., 2003; MUNÔZ et al., 2004; WOODMAN, 2007). Os tipos virais identificados nos casos de coinfeção foram: HPV's 16 e 33 em duas amostras, e os HPV's 33 e 45 em uma amostra, Figura 16.

Em nosso estudo, utilizando-se a expressão de E6/E7 RNAm, o HPV 16 foi encontrado em 28% (7/25) das amostras, o HPV 33 em 28% (7/25) seguidos do HPV 18 em 20% (5/25), Figura 17. A ordem da frequência dos tipos identificados foi a mesma encontrada na PCR-HPVte.

Quando se comparou a PCR-HPVte e a expressão de E6/E7 RNAm, considerando-se apenas os cinco tipos pesquisados pela metodologia NASBA (16, 18, 31, 33 e 45), a expressão de E6/E7 RNAm ocorreu em 22 amostras, enquanto a PCR-HPVte foi positiva para 18 amostras. Entre as amostras positivas para ambos os métodos, houve concordância entre os tipos virais encontrados. Duas amostras positivas para E6/E7 RNAm não foram testadas para a PCR-HPVte, pois como já citado, somente as amostras positivas pela PCR-HPV foram submetidas à identificação do tipo viral pela PCR-HPVte. Em uma amostra (1,6%, 1/62), a PCR-HPVte detectou a presença de HPV de alto risco do tipo 16 sem expressão de E6/E7 RNAm.

Dos tipos não detectados pela PCR-HPVte e detectados pela expressão de E6/E7 RNAm encontramos: uma amostra para o HPV 16 (14,3%; 1/7), uma amostra para o HPV 18 (20%; 1/5) e uma amostra para o HPV 45 (33,33%; 1/3).

A diferença na taxa de detecção entre o DNA e E6/E7 RNAm do HPV pode ser explicada pelas diferenças de atividade viral. A infecção latente ou subclínica pode explicar a presença do DNA do HPV sem expressão oncogênica detectável. Nas lesões de baixo grau (LSIL), E7 tem se mostrado expressa na base das camadas epiteliais, atingindo com menor frequência a superfície epitelial. Em contrapartida, nos casos de HSIL, com toda a desregulação da diferenciação celular, um nível elevado da expressão de E7 ocorre em todo o epitélio (MIDDLETON et al., 2003; MOLDEN et al., 2006).

TIPOS DE HPV_s NAS AMOSTRAS DO ESTUDO

A identificação dos diferentes tipos de HPV nas amostras clínicas é um importante indicador prognóstico para a triagem, permitindo um monitoramento dos casos considerados de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (NELSON et al., 2000). Segundo relatos na literatura, mulheres com citologias normais e presença de genótipos de alto risco, possuem 116 vezes riscos de desenvolvimento de HSIL, ao contrário das mulheres que não possuem HPV_s de alto risco (ROZENDAAL et al., 1996; CLAVEL et al., 2001).

Nossos achados coincidem com os de Carvalho e colaboradores (2010), que em Minas Gerais, utilizando a PCR tipo-específica e sequenciamento de DNA para a identificação do tipo viral, encontraram também a maior detecção do HPV 16 seguido do HPV 33, e contrastam com os resultados de Camara e colaboradores (2003) que no Distrito Federal identificaram o HPV 16 seguido dos tipos 58, 31 e 53, e de Levi e colaboradores (2002) que estudando amostras de mulheres HIV positivas em São Paulo encontraram a prevalência dos tipos 6, 51, 11, 18 e 16.

Considerando-se ambas as metodologias, PCR-HPVte e expressão de E6/E7 RNAm, o HPV 16 foi o mais frequente seguido do HPV 33, Figura 18. Em estudo conduzido por Varnai e colaboradores (2008) no oeste da Alemanha, em mulheres previamente selecionadas, utilizando a PCR com os iniciadores consenso (MY/GP+) e PCR tipo-específica, de 63 amostras positivas para o DNA do HPV, o HPV tipo 16 foi o mais frequente (71%, 45/63), seguido do HPV 31 encontrado

em 11,1% (7/63) casos. Esses dados concordam com Silva e colaboradores (2009), que em estudo conduzido no Brasil, em Recife, utilizando a PCR tipo-específica, identificaram nas amostras com apenas um tipo viral, o HPV 16 como o mais frequente 78,7% (168/213) seguido do HPV 31 15,5% (33/163) e com Gasperov et al (2008) que na Croácia, por meio da PCR tipo-específica, identificaram entre 690 casos de HSIL, o HPV 16 como o mais prevalente, presente em 35,5% (245/690) dos casos, e o HPV 31 como o segundo tipo mais frequente, com uma prevalência de 10,5% (72/690) dos casos. Estudo italiano, que utilizou a PCR em Tempo Real (*multiplex*) para a identificação do tipo viral do HPV em 168 amostras positivas para o DNA do HPV de alto risco, considerando apenas as infecções simples, encontrou 47,1% de HPV 16; 13,4% do HPV 18; 8,1% do HPV 31 e 6,7% do HPV 33 (CATTANI et al., 2009). A prevalência dos diferentes tipos de HPVs pode diferir em populações específicas nos diferentes países de acordo com a etnia (FONTAINE et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Esses dados nos permitem verificar a diversidade na distribuição dos tipos de HPVs, especialmente os oncogênicos, em diferentes regiões brasileiras, sendo portanto de grande importância a identificação do tipo viral para a elaboração e o desenvolvimento de vacinas específicas para cada região, contendo os tipos virais mais prevalentes.

Considerando-se os casos de coinfeção identificados, embora em pequeno número, a combinação mais frequente foi a associação dos tipos 16 e 33 (66,7%, 2/3), seguida da associação dos tipos 33 e 45 (33,3%, 1/3). Já no estudo de Silva e colaboradores (2009), a combinação mais frequente foi dos tipos de HPV 16 e 31 (70,7%, 53/75) seguida pela associação dos tipos 16 e 33 (18,7%, 14/75). Nos casos de coinfeção deste estudo, a identificação dos tipos virais foi concordante entre as duas metodologias.

Sabe-se que, a PCR com os iniciadores consenso MY09/MY11 em amostras contendo vários tipos de HPVs (coinfeção), podem preferencialmente amplificar um dos tipos, portanto, produzir resultados imprecisos (VERNON et al., 2000), o que pode justificar a baixa frequência de coinfeção encontrada no presente estudo. Além disso, a metodologia *nested* PCR pode ser mais seletiva para determinados tipos de HPVs presentes em casos de coinfeção, seja pela maior eficiência de amplificação de um tipo e/ou maior quantidade de um determinado tipo (KOSEL et al., 2003).

Em relação a expressão de E6/E7 RNAm, a baixa frequência dos casos de coinfeção pode ser devido ao fato de um determinado tipo

de HPV ser dominante em relação ao outro, o que pode ser explicado pela sua integração no genoma celular, com conseqüente rompimento da E2, perda de sua função regulatória e alta expressão de E6/E7 RNAm, enquanto os outros tipos de HPVs podem ser mantidos na forma episomal, controlada pela proteína E2 (MOLDEN et al., 2006).

COMPARAÇÃO DA PCR-HPVTE COM A CITOLOGIA ONCÓTICA

No presente estudo, entre os casos de citologias negativas, os tipos mais frequentes foram os 16 e 33, estando presentes cada um em 2,3% (3/130) das amostras, Tabela 12. O HPV 6 foi o tipo viral identificado com maior frequência nos casos de ASC-US, 22,2% (2/9) e os HPVs 16 e 18 com maior frequência nos casos de LSIL, ambos 22,2% (2/9). Estes dados são similares aos reportados por Lorenzato e colaboradores (2000) que detectaram o HPV 16 em 19,4% (12/62) das amostras diagnosticadas com NIC I em análise histopatológica, e de Freitas e colaboradores (2007) que detectaram o HPV 16 em 20% (3/15) das amostras de LSIL. Nos casos de HSIL, nosso estudo detectou o HPV 16 em 20% (2/10) das amostras.

No estudo de Silva e colaboradores (2009), realizado no Brasil, foram identificados nos casos de LSIL uma frequência maior do HPV tipo 16 (30,34%) em relação aos casos de HSIL (16,85%). No mesmo estudo, o HPV 31, foi identificado em 5,6% dos casos de HSIL e 3,4% dos casos de LSIL. No presente estudo o HPV 31 só foi encontrado nos casos de ASC-H (2/4).

O acompanhamento das mulheres com ASC-US e LSIL é muito importante. Apenas uma pequena proporção irá progredir para neoplasia intra-epitelial cervical 3 (NIC 3) e carcinoma escamoso invasivo. As lesões intraepiteliais cervicais têm sido encontradas em 10% a 60% das mulheres com diagnóstico de ASC-US, sendo que, as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC2/3) estão presentes em mais de 5% destes casos (MORIN et al., 2000; LIE & KRISTENSEN, 2008). De acordo com Manos e colaboradores (1999), até 10% das mulheres com resultado citológico de ASC-US podem apresentar displasia severa. Nessas pacientes, um teste positivo para HPV pode ser mais confiável do que repetição da citologia oncológica.

Neste estudo, dos casos de LSIL que tiveram o tipo viral identificado, 55,6% (5/9), todos foram oncogênicos (Tabela 12). Nos achados de Borges e colaboradores (2004), utilizando a Captura Híbrida, todas as amostras LSIL/NIC I apresentaram DNA-HPV de alto risco

oncogênico de maneira isolada ou em combinação ao DNA-HPV de baixo risco. No presente estudo não encontramos coinfeção com os tipos de baixo risco e alto risco associados, o HPV 6 foi encontrado em quatro amostras, duas com citologias normais (negativas) e em duas classificadas como ASC-US, enquanto que o HPV 11 foi detectado somente em uma amostra de citologia ASC-US, evidenciando o predomínio dos tipos de HPVs de alto risco nas lesões intraepiteliais de alto grau, achado semelhante ao de Levi e colaboradores (2002).

Para os casos de HSIL, 60% das amostras (6/10) foram identificadas com os tipos oncogênicos, sendo provável que as amostras que não tiveram o tipo viral identificado, possam estar associadas a outros tipos de HPVs de alto risco não incluídos neste estudo. Essa taxa de identificação dos tipos oncogênicos para as lesões intraepiteliais de alto grau, é maior do que a encontrada por Freitas e colaboradores (2007), que utilizando a PCR tipo específica para os HPVs 16 e 18, encontrou uma frequência de 40% de HPVs de alto risco nos casos de HSIL, e menor do que a reportada por Rama e colaboradores (2008a), que utilizando a Captura Híbrida encontrou os HPVs oncogênicos em 77,8% das lesões escamosas de alto grau. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato do presente estudo ter pesquisado cinco tipos oncogênicos (16, 18, 31, 33 e 45) *versus* dois tipos oncogênicos pesquisados por Freitas e colaboradores (2007) e o sistema de Captura Híbrida utilizar um conjunto de sondas para a pesquisa de 13 tipos de HPVs de alto risco.

De Cremoux e colaboradores (2003), relatam que apesar da alta sensibilidade dos métodos moleculares, a não detecção do genoma viral pode ocorrer em 5% a 10% dos casos de câncer invasivo, 10-15% dos casos de lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) e de 20-30% dos casos de lesões intra-epiteliais de baixo grau (LSIL).

RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Os programas de rastreamento do câncer do colo uterino, implantados de forma abrangente, principalmente, em países desenvolvidos têm reduzido, embora não erradicado a incidência e taxas de mortalidade do câncer cervical (BASEMAN & KOUTSKY, 2005; MONSONEGO et al., 2010).

O campo da prevenção do câncer cervical, está em fase ativa de avaliação de novas tecnologias para aumentar a eficiência do rastreio em países desenvolvidos e oferecer opções reais para as populações que não

são beneficiadas por programas de rastreamento organizados (BOSCH et al., 2002).

Para que haja efetiva redução na incidência do câncer cervical os programas de rastreamento devem ser de alta qualidade, organizados e com ampla cobertura da população. Nos países em desenvolvimento, metade dos casos de câncer cervical, que são identificados a cada ano, ocorre em mulheres que não tiveram acesso ao rastreamento na citologia oncótica (VILLA et al., 2008). Além, dos já citados, problemas decorrentes da baixa sensibilidade da citologia oncótica verificados por meio dos casos de pacientes com câncer de colo de útero e citologia anterior negativa, o conhecimento científico sobre o câncer cervical e HPV, que tem sido ampliado nas últimas décadas, abre a possibilidade de se aumentar as estratégias de prevenção associando-se métodos de rastreamento. O FDA (*Food and Drug Administration*) aprova desde 2003, nos EUA (Estados Unidos da América), o teste de DNA do HPV (Captura Híbrida- CH2) em combinação com a citologia oncótica como método de rastreio. Esta estratégia é recomendada, para mulheres com idade superior a 30 anos, para avaliar a presença de HPVs de alto risco (CASTELLSAGUÉ, 2008; ARBYN et al., 2006; CASTLE et al., 2008; MONSONEGO et al., 2010).

De acordo com Berkhof e colaboradores 2010, há um risco menor de desenvolvimento de NIC2+ após um resultado de teste de HPV negativo em relação ao exame citológico. Este dado foi verificado no nosso estudo, uma vez que o valor preditivo negativo das PCRs-HPV foi de 97%. Alguns autores, entretanto, consideram que a identificação do HPV é uma alternativa para o rastreamento, mas ponderam que seu alto custo e a elevada prevalência das infecções transitórias, principalmente em mulheres jovens, são limitações que tornariam impraticável o seguimento de todos os casos positivos. (FRANCO et al., 2001; VILLA & DENNY, 2006; KITCHENER et al., 2006; RAMA et al., 2008b).

Estima-se que de cada 100 mulheres submetidas à citologia oncótica, três apresentam alguma lesão celular. Essas pacientes são encaminhadas para o exame colposcópico para que seja localizada a região do colo do útero da qual deve ser retirado o material para a biópsia e posterior decisão terapêutica. Com a introdução dos testes moleculares no rastreio primário do câncer cervical, a lógica de investigação torna-se inversa, primeiro procura-se o vírus. A presença de resultado positivo para o DNA do HPV, especialmente para os tipos de alto risco 16 e 18, possibilita o monitoramento e intervenção clínica precoce. Nos casos de infecção persistente, a citologia pode ser

requerida para confirmar se as células da cérvix uterina apresentam ou não alterações morfológicas causadas pela infecção. A citologia oncótica, portanto, continua imprescindível para a manutenção da saúde da mulher (MS, 2011).

No nosso estudo, observamos que das 22 amostras que expressaram E6/E7 RNAm 15 eram de pacientes com idade inferior a 30 anos. Este é um achado relevante, uma vez que o desenvolvimento do câncer pode ocorrer em longo prazo, a possibilidade de intervenção precoce, além de salvar vidas pode ser uma medida de economia para o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil.

Um aumento nos custos previstos nas análises por técnicas moleculares pode ser compensado por um intervalo maior no rastreamento do câncer cervical, além da redução de custos dos procedimentos para seguimento das lesões pré-neoplásicas (NIC2+) e neoplásicas do colo uterino, como excisões cirúrgicas, crioterapia, radioterapia e/ou quimioterapia, portanto, podendo ter um impacto positivo em relação ao custo benefício (CUZICK et al., 2006b; BERKHOF et al, 2010).

A efetividade do diagnóstico precoce para a prevenção do câncer do colo do útero, e a diminuição da mortalidade por este agravo se mantêm como um desafio para o Sistema Único de Saúde do Brasil, que reflete altas taxas de mortalidade. De acordo com os dados encontrados neste estudo, consideramos importante, no Brasil, a mudança das estratégias de rastreamento com a associação da PCR-HPV à citologia oncótica, pois esta parece ser uma alternativa economicamente viável. Uma vez que os testes são utilizados em larga escala, os preços diminuem a exemplo da Rede de Carga Viral para HIV que iniciou com testes custando \$ 50 dólares e que hoje custam \$ 14 dólares. Consideramos, também, que a detecção da expressão gênica de E6/E7 RNAm, quando apresentar preços compatíveis com o SUS (atualmente R\$ 135,00 o teste), será uma ferramenta muito eficiente na associação com a citologia oncótica e/ou a PCR-HPV.

8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

1. A infecção pelo HPV foi detectada em 39,5% (64/162) das amostras;
2. O DNA do HPV foi detectado em 90,6% (29/32) dos casos de citologia oncológica positivas
3. O valor preditivo negativo da PCR-HPV foi de 97%;
4. Vinte e duas amostras (13,6%; 22/162) apresentaram expressão de E6/E7 RNAm, dessas a PCR-HPV detectou 20;
5. O tipo viral foi identificado em 43,8% (28/64) das amostras;
6. Os tipos de HPV mais prevalentes em ordem decrescente foram: 16, 33, 18, 6, 31, 45 e 11;
7. A PCR-HPVte identificou o tipo viral em 23 amostras, dessas três apresentaram coinfeção;
8. A expressão de E6/E7 RNAm identificou o tipo viral em 22 amostras, dessas três apresentaram coinfeção;
9. Houve concordância dos tipos virais identificados entre a PCR-HPVte com a expressão de E6/E7 RNAm;
10. Quando estratificados por faixa etária os resultados da PCR-HPV e da expressão de E6/E7 RNAm mostraram significância estatística ($p=0,001$). A faixa etária com idade inferior ou igual a 30 anos correspondeu a 34% das amostras (55/162). Nesta faixa etária, 36 amostras foram positivas pela PCR-HPV, e 15 das 22 amostras positivas para E6/E7 RNAm pertenciam a este grupo;

9. CONCLUSÕES

O uso da PCR-HPV associada à citologia parece ser uma alternativa economicamente viável. A detecção do DNA de HPV em amostras com resultados negativos na citologia é importante para a prevenção do câncer de colo uterino. As pacientes com estes resultados devem ser acompanhadas para avaliar a resolução espontânea da infecção ou uma possível persistência e evolução para o câncer. A identificação das pacientes com DNA de HPV positivas seguidas da determinação do tipo viral pelo método PCR-HPVte, ou realização da expressão de E6/E7 RNAm poderá contribuir para o diagnóstico precoce do câncer cervical, assim como para a elaboração e o desenvolvimento de estratégias de vacinas anti-HPV. A possibilidade de intervenção precoce, além de salvar vidas pode ser uma medida de economia para o sistema único de saúde.

10. PERSPECTIVAS

- ✓ Melhorar a sensibilidade da PCR-HPVte e aumentar o número de tipos pesquisados;
- ✓ Padronizar técnicas de PCR em tempo real para a detecção da infecção pelo HPV e para a tipagem molecular;
- ✓ Ampliar a amostragem, com inclusão de amostras das diversas regiões do Estado, para que possa refletir a epidemiologia da infecção pelo HPV no estado de Santa Catarina.

11. REFERÊNCIAS

ALTIOK, S. Molecular markers in cervical cytology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 23, p. 709-728, 2003.

ARNDT, O. et al. Das inverte papillom und seine assoziation mit dem humanen papillomavirus (HPV). **Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde**, v. 42, p. 670-676, 1994.

ARBYN, M. et al. J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 4, p. 280-293, 2004.

ARBYN, M. et al. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. **Vaccine**, v. 24, Suppl 3 (S3/78–S3/89), 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520: informação e documentação: citações em documentos: apresentação**. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação**. Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração**. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6024: numeração progressiva das seções de um documento escrito: apresentação**. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6027: **informação e documentação: sumário**: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NOMAS TÉCNICAS. NBR 6028: **informação e documentação: resumo**: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6029: **informação e documentação: livro e folhetos**: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

AYRES, A. R. G.; SILVA, G.A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática **Revista de Saúde Pública**, v.44, n.5, p.963-74, 2010.

BAFVERSTEDT, B. Condylomata acuminata-past and present. **Acta Dermato Venereologica**, v.47, n.5, p.376-81, 1967.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections – Review. **Journal of Clinical Virology**, v. 32 S (S16–S24), 2005.

BERKHOF, J.; et al. The health and economic effects of HPV DNA screening in the Netherlands. **International Journal of Cancer**, v. 127, p.2147–2158, 2010.

BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, Suppl (S1-6), 2005.

BEZERRA, S. J. S. et al. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.

BORGES, S. C. V. et al. Taxa de Detecção do Papilomavírus Humano pela Captura Híbrida II, em Mulheres com Neoplasia Intra-epitelial Cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 2, p. 105-110, 2004.

BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n 11, p. 796-802, 1995.

BOSH, F.X. et al.. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244-265, 2002.

BOULET, G. A. V. et al. J. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. – Minireview. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 4, p. 810-817, 2008.

BRENTJENS, M.; YEUNG-YUE, K. A.; LEE, P. C. et al. Human papillomavirus: a review. **Dermatologic Clinics**, v. 20, p.315-331, 2002.

BURD, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n.1, p. 1-17, 2003.

CAMARA, G. N. L. et al. Prevalence of Human Papillomavirus Types in Women with Pre-neoplastic and Neoplastic Cervical Lesions in the Federal District of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n. 7, p. 879-883, 2003.

CARRILLO, A.; MOHAR, A.; MENESES, A. *et al.* - Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano em cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. **Salud Pública de México**, v 46, p. 7-15, 2004.

CARESTIATO, F. N. et al. Analysis of molecular biology techniques for the diagnosis of human papillomavirus infection and cervical cancer prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 428-432, 2006a.

CARESTIATO, F. N. et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Genital Tract Determined by Hybrid Capture Assay. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 331-336, 2006b.

CARVALHO, N. O. et al. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.1, p. 73-78, 2010.

CASTLE, P. et al. A Cross-sectional Study of a Prototype Carcinogenic Human Papillomavirus E6/E7 Messenger RNA Assay for Detection of Cervical Precancer and Cancer **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 2599-2605, 2007.

CASTLE, P. et al. Human Papillomavirus Genotype Specificity of Hybrid Capture 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2595-2604, 2008.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F.X., MUNOZ, N. Environmental cofactors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 191-199, 2002.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical câncer. **Gynecologic Oncology**, v. 110 (3 Suppl 2): S4-7, .2008

CATTANI, P. et al. RNA (E6 and E7) Assays versus DNA (E6 and E7) Assays for Risk Evaluation for Women Infected with Human Papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n. 7, p. 2136-2141, 2009.

CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F.N. Infecções Causadas Pelos Papilomavírus Humanos: Atualização Sobre Aspectos Viroológicos, Epidemiológicos e Diagnóstico – Review. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 1, p. 73-79, 2006.

CHOW, V. T. K. et al. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. **Pathology**, v. 32, p. 204-208, 2000.

CHERYL, M. et al. Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical câncer patients from India. **Journal Biosciences**, v. 33, n. 1, p. 73-80, 2008.

CLARCKE, G. H. V. The charming of warts. HE CHARMING OF WARTS. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 45, n.1, p. 15-21, 1965.

CLAVEL, C et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 12, p. 1616-1623, 2001.

CLIFFPORD, G. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 88, p.63 – 73, 2003.

CUSCHIERI, K.S.; CUBIE, H.A.; WHITLEY, M.W.- Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. **Journal of. Clinical Pathology**, v. 57, p. 68-72, 2004.

CUSCHIERI, K.; WENTZENSEN, N. Human Papillomavirus mRNA and p16 Detection as Biomarkers for the Improved Diagnosis of Cervical Neoplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 10, p. 2536-2545, 2008.

CUZICK, J. et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. **International Journal of Cancer**, v. 119, p.1095–1101, 2006a.

CUZICK, J. Screening for cancer: future potential. **Cancer Imaging**, v. 6., S1–S8, 2006b.

de CREMOUX, P. Efficiency of the Hybrid Capture 2 HPV DNA Test in Cervical Cancer Screening. A Study by the French Society of Clinical Cytology. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, p. 492-499, 2003.

DE CARVALHO, N. et al. Sustained efficacy and immunogenicity of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3 years in young adult women. **Vaccine**, v. 28, p. 6247–6255, 2010.

DEPUYDT, C. E. et al. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 881-891, 2007.

DERCHAIN, S. F. M.; SARIAN, L. O. Z. Vacinas profiláticas para o HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 6, p. 281-284, 2007.

de RODA HUSMAN, A.M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-1062, 1995.

de VILLIERS, E-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DOCTER, J. et al. Clinical performance of the APTIMA® HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, Suppl 1 (S55-S61), 2009a.

DOCTER, J. et al. Analytical characterization of the APTIMA® HPV Assay. **Journal of Clinical Virology**, v.45, Suppl 1 (S39-S47), 2009b.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

DUGGAN, M. A. et al. A paired Comparison of dot blot hybridization and PCR amplification for HPV testing of cervical scrapes interpreted as CIN 1. **European Journal of Gynecologic Oncology**, v. 15, n. 3, p.178-187, 1994.

ELUF-NETO, J.et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal of Cancer**, v. 69, p. 114-119, 1994

EVANDER, M. et al. Comparison of one-step and two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 987-992, 1992.

FARTHING A. et al. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, p. 649-652, 1994.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201-5207, 2003.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association Journal**, v. 164, n. 7, p. 1017-25, 2001.

FRANCO, E. L. A New Generation of Studies of Human Papillomavirus DNA Testing in Cervical Cancer Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 23, 1600-1601, 2009.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical câncer through papillomavirus vaccination. **Nature Reviews Immunology**, v.4, n. 1, p. 46-54, 2004.

FREITAS, T. P. et al. Molecular Detection of HPV 16 and 18 in Cervical Samples of Patients From Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 297-301, 2007.

FONTAINE, V. et al. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 928-934, 2007

GARCIA M et al. Global Cancer Facts & Figures 2007. **Estimated Number of New Cancer Cases by World Area, 2007**. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.

GASPEROV, N. et al. Detection and Typing of Human Papillomaviruses Combining Different Methods: Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, Line Probe Assay and Sequencing. **Pathology & Oncology. Research**,v.14, n.4, p.355-363, 2008.

GEN PROBE® APTIMA® HPV Assay. Disponível em <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/500710-PT-RevD.pdf>_Acesso em 02 de outubro de 2010.

GOMPEL, C. KOSS, L. G. **Citologia ginecológica e suas bases anatômicas**. 1 ed. São Paulo: Manole, 1997.

GRCE, M. et al. Detection and typing of human Papillomavírus by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croation women with abnormal cytology. **European Journal of Epidemiology**, v. 13, p. 645-651, 1997.

GUZMAN ROJAS, L.; ALCOCER-GONZALEZ, J. M.; MADRID-MARINA, V. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. **Salud Pública de México**, v.40, n. 1, p. 1-9, 1998.

HALFON, P. et al. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ® HPV assay. **Journal of Clinical Virology**, n. 47, p. 177-181, 2010.

HAWS, A. L. F. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 87- 93, 2004.

HARPER, D.; et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, p. 1757–65, 2004.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, p. 83-97, 2006.

HOORY, T. et al. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.107, n.3, p. 198-217, 2008.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 940-945, 2003.

HUSNJAK, K. et al. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 88, p. 125-134, 2000.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Chapter 2: An introduction to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Disponível em: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=2>. Acesso em 20 de dezembro de 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) Estimativa 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 20 de setembro de 2010.

JEANTET, D. et al. NucliSENS® EasyQ® HPV v1 test Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v.45, S1 (S29 S37), 2009.

JO, H.; KIM, J.W. Implications of HPV infection in uterine cervical câncer - Review Article. **Cancer Therapy**, v. 3, p.419-434, 2005.

JONES, D. J.; ALANI, R. M.; MUNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21^{Cip1}-mediated inhibition of cdk2. **Genes e Development**, v. 11. p. 2101-2111, 1997.

KANODIA, S. et al. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KITCHENER, H.C. et al. HPV testing in routine cervical screening: cross sectional data from the ARTISTIC trial. **British Journal of Cancer**, v.95, p.56-61, 2006.

KJAER, S. K; et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study **British Medical Journal**, v. 325 (7364): 572, 2002.

KOSEL, S. et al. Type-specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting – improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridisation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 6, p. 787-791, 2003.

KOSHIOL, J. et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, n. 2, p. 123-137, 2008.

KRAMBECK, W.M. et al. HPV detection and genotyping as na earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. **Clinical & Experimental Obstetrics & Gynecology**, v.35, n.3, p.175-178, 2008.

KRAUS, I. et al. Presence of E6 and E7 mRNA from Human Papillomavirus Types 16, 18, 31, 33, and 45 in the Majority of Cervical Carcinomas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1310–1317, 2006.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction - Review. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95–125, 2006.

LEE, J-O.; RUSSO, A. A.; PAVLETICH, N. P. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. **Nature**, v. 39, p. 859-865, 1998.

LEE, G-Y. et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.15, p.81-87, 2005.

LEYKAUF, K.; et al. A. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 1427–1431, 2004.

LEVI, J. E. et al. High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3341–3345, 2002.

LEVI, J. E. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p. 225–231, 2004.

LIE, A. K. et al. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. **Gynecologic Oncology**, n. 97, p. 908–915, 2005.

LIE, A. K.; & KRISTENSEN, G. Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Testing as a Predictive Marker for Cervical Carcinoma. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 4, p. 405-415, 2008.

LINHARES, A.C.; VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **Jornal de Pediatria**, v. 82, Suppl 3 (S25-34), 2006.

LIN, C.Y. et al. Human papillomavirus typing with a polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 361–367, 2008.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 2, p. 362-372, 2004.

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

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1167-1173, 2006.

MANOS, M. et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p.209-214, 1989.

MANOS, M et al. Identifying Women With Cervical Neoplasia Using Human Papillomavirus DNA Testing for Equivocal Papanicolaou Results. **Journal of the American Medical Association**, v.281, n. 17, p. 1605-1610, 1999.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7874-87, 2001.

MC MURRAY, H. R. et al. Biology of Human papillomaviruses. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, p. 15-33, 2001

MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; CASTLE, P. E. Clinical utility of HPV genotyping. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 12-17, 2006.

MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous Lesions of the Cervix and Vagina. **Acta Cytologica**, v. 20, n. 6, p. 505-509, 1976.

MIDDLETON, K. et al. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Marker. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10186–10201, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/noticia/o-fim-de-um-pesadelo>. Acesso em 20 de março de 2011.

MOLDEN, T. et al. Predicting CIN2 when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 973–976, 2005a.

MOLDEN, T. et al. Comparison of Human Papillomavirus Messenger RNA and DNA Detection: A Cross-sectional Study of 4,136 Women >30 Years of Age with a 2-Year Follow-up of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 2, p. 367-372, 2005b.

MOLDEN, T. et al. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. **Gynecologic Oncology**, v. 100, p. 95 – 100, 2006.

MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 550-560, 2010.

MONSONEGO, J. et al. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid based cytology in primary cervical cancer screening (the fase study). **International Journal of Cancer**, 2010. (no prelo)

MOSCICKI, A. B. Impact of HPV infection in adolescent populations – Review. **Journal of Adolescent Health**, v. 37, S3–S9, 2005.

MOYSÉS, N. et al. Evaluation of the combined use of papanicolaou screen test and the polymerase chain reaction for the identification of patients at risk of cervical câncer. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2008.

MUNGER, K. et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7888-98, 2001.

MUNGER, K.. et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 78, n. 21, p. 11451–11460, 2004.

MUNÕZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, v.19, p. 1–5, 2000.

MUNÕZ N. et al. For the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Groom. Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, p. 348:518-27, 2003.

MUNÕZ, N. et al. Against Which Human Papillomavirus Types Shall We Vaccinate And Screen? The International Perspective, 2004. **International Journal of. Cancer**, v. 111, p. 278–285, 2004.

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

NAMKOONG, S. E. Clinical Application of HPV typing in cervical cancer. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, suppl. 49, p. 59-67, 1995

NANDA, K. et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 10, p.810-819, 2000.

NADAL, S.R.; MANZIONE, C. R. Vacinas contra o papilomavirus humano. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 3, p. 337-340, 2006.

NAUCLER, P. et al. Efficacy of HPV DNA Testing With Cytology Triage and/or Repeat HPV DNA Testing in Primary Cervical Cancer Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 2, p. 88-99, 2009.

NELSON, J. H. et al. A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomavirus in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 688-695, 2000.

NOBRE, R. J.; ALMEIDA, L. P.; MARTINS, T. C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **Journal of Clinical Virology**, v.42, p. 13-21, 2008.

NOONNENMACHER, B. et al. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Revista de Saúde Pública**, Porto Alegre, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.L. *et al.* - Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 235-240, 1999.

ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. **British Journal of Veneral Disease**, v.47. n.1, p. 1-13, 1971.

PANNIER-STOCKMAN, C. et al. Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 353-360, 2008.

PARKIN, D. M., BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, 24 Suppl 3 24S3 (S3/11–S3/25), 2006.

PASSOS, M.R.L. et al. Papilomavírose Humana em Genital, Parte I. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 108-124, 2008.

PAYAN, C. et al. Human Papillomavirus Quantification in Urine and Cervical Samples by Using the Mx4000 and LightCycler General Real-Time PCR Systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.3, p. 897–901, 2007.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 471-493, 2010.

RABELO-SANTOS, S.H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L.L. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p.181-184, 2003.

RAMA, C. H. et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 123-130, 2008a.

RAMA, C. et al. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 3; p. 411-419, 2008b.

RATNAM, S. et al. Clinical Performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 Mrna Assay in Comparison with That of the Hybrid Capture 2 Test for Identification of Women at Risk of Cervical Cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2779–2785, 2010.

RIVOIRE, W.A. et al. Bases Biomoleculares da Oncogênese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. (2), p. 179-84, 2001.

ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas – Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ROSENBLATT, C. et al. **HPV na Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

ROZENDAAL, L et al. PCR-based high risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. **International Journal of Cancer**, v. 68, p. 766–769, 1996.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SALMERON, J. et al. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical câncer screening in Morelos State, Mexico. **Cancer Causes and Control**, v. 14, p.505–512, 2003.

SANTOS, A. L. F. et al. Desempenho do exame colpocitológico com revisão por diferentes observadores e da captura híbrida II no diagnóstico da neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1029-1037, 2003.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 231-240, 2002.

SASLOW, D. et al. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, p. 342-362, 2002.

SASLOW, et al. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, p. 7-28, 2007.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, p. 727-746, 2005.

SCHIFMAN, M. et al. Epidemiologic Evidence Showing That Human Papillomavirus Infection Causes Most Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 12, p. 958-964, 1993.

SCHIFFMAN, M. & CASTLE, P.E. - Human papillomavirus: epidemiology and public health. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127: 930-934, 2003.

SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo uterino e vagina: processos inflamatórios– aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos**. Rio de Janeiro: Revinter, p. 193-200, 2000.

SILVA, T. T. et al. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, p. 285-291, 2006

SILVA, M.F.P.T.B. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1437-1443, 2009.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 621–632, 2007.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Citology – Definitions, Criteria, and Explanatory Notes**. Second Edition, New York: Springer-Verlag, 2004.

SRINIVAS, P.R.; KRAMER, B.S.; SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncology**, v. 2, n. 11, p. 698-704, 2001.

SOTLAR, K. et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3176-3184, 2004.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: Acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

SNIDJERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C.J.L.M. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p.520-528, 2010.

SPEICH, N. et al. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the West German area. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 125-128, 2004.

STEBEN, M.; FRANCO, E.D. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. **Gynecologic Oncology**, v. 107, S2-S5, 2007.

STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 935-939, 2003.

TATE, J.E. et al. A comparison of early (E7) and late (L1) primer-mediated amplification of papillomaviral DNA in cervical neoplasia. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n.5, p. 347-351, 1996.

TEOKHAROV, B.A. Non -gonococcal infections of the female genitália. **British Journal of Venereal Disease**, v. 45, p.334, 1969.

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

THOMISSON III, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

TRAVASSOLI, F.A.; DEVILEE, P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press, p. 432, 2003.

VARNAI, A. D. et al. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: Diagnostic and prognostic implications. **Oncology Reports**, v. 19, p. 457-465, 2008.

van den BRULE, A. J. C. et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2739-2743, 1990.

VERNON, S. D.; UNGER, E. R.; WILLIAMS, D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 651-655, 2000.

VESPA JUNIOR, N. Vacina Quadrivalente contra HPV 6, 11, 16, 18: a mais nova ferramenta de prevenção – Editorial. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 4, p. 220-223, 2006.

VIJAYARAGHAVAN, A. et al. Cost effectiveness of high-risk HPV DNA testing for cervical cancer screening in South Africa. **Gynecologic Oncology**, v. 112, p. 377-383, 2009.

VILLA, L. L. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6,11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in Young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncology**, v. 6, p. 271-78, 2005.

VILLA, L.L. Biology of genital human papillomaviruses. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v.94, Suppl 1 (S3-S7), 2006.

VILLA, L. L.; DENNY, L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, Suppl 1, (S71-S80), 2006.

VILLA, L. L. Assessment of new technologies for cervical cancer screening. **The Lancet**, v. 9, p. 910-911, 2008.

VINCE, A. et al. Molecular detection of human papillomavirus in woman with minor grade cervical cytologic abnormalities. **Journal of Clinical Virology**, v. 20, p. 91-94, 2001.

von KNEBEL DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 17, p. 2229-2242, 2002.

von KNEBEL DOEBERITZ, M.; SYRJANEN, K. J. Molecular markers: how to apply in practice. **Gynecologic Oncology**, v. 103, n. 1, p. 18-20, 2006.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WHEELER, C. M. Natural History of Human Papillomavirus Infections, Cytologic and Histologic Abnormalities, and Cancer. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, v. 35, p. 519-536, 2008.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV Infection: unresolved issues. **Nature Reviews – Cancer**, v. 7, p.11-22, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ICO (WHO-BRAZIL) Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). **Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil. Summary Report 2009**. Acesso em 25/11/2009. Disponível em: www.who.int/hpvcentre.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological Record Relevé épidémiologique hebdomadaire**. n. 15, ano 84, p. 117–132, 2009. Acesso em 25/11/2009. Disponível em: <http://www.who.int/wer>

YAMAGUSHI, A. et al. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluometry for screening of cervical cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 41-49, 2002.

zur HAUSEN, H. Condyloma acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v. 36, p. 530, 1976.

zur HAUSEN. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. **Current Topics in microbiology and immunology**, v. 78, p. 1-30, 1977.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer from basic studies to clinical application. **Nature Reviews – Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.

12. ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **DETECÇÃO DO DNA E RNAm DO HPV NA TRIAGEM DO CÂNCER CERVICAL**

A Senhora está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que a Senhora entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos.

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS? O objetivo desta pesquisa é avaliar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a expressão gênica de E6/E7 aplicada em material cervical. A utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como metodologia no diagnóstico molecular do Papilomavírus Humano (HPV) tem se mostrado como a mais sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais. O câncer do colo uterino está diretamente relacionado a infecção persistente pelos tipos virais de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV).

EU TENHO QUE PARTICIPAR? Cabe a senhora decidir se irá ou não participar. Mesmo que a senhora não queira participar do estudo, a senhora não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que a senhora tenha direito de receber. Caso decida participar, a senhora irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR? O pesquisador poderá analisar seu prontuário médico a fim de obter dados referentes a pesquisa. Os dados obtidos serão armazenados pelo pesquisador.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Não haverá nenhum desconforto, pois a senhora não necessitará fazer nenhuma atividade fora de sua rotina. Não haverá nenhuma coleta de amostra adicional àquela já prevista na rotina do Exame Ginecológico.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO SERÃO UTILIZADOS OS DADOS PESSOAIS DA SENHORA? Informo que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente do pesquisador e orientador desta pesquisa. A divulgação dos resultados

visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico será anônima e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que a senhora poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TERÃO SE PARTICIPAR? Por ser voluntária e sem interesse financeiro, a senhora não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR? A senhora estará participando de uma pesquisa que poderá contribuir no diagnóstico precoce do câncer cervical em pacientes atendidas nos consultórios particulares e também pelo Serviço de Saúde Pública, as quais têm pouco acesso a um diagnóstico mais preciso.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES? Em caso de qualquer dúvida relacionada ao estudo, ou sempre que a senhora quiser saber sobre os resultados parciais do estudo, por favor, entre em contato com:

Farmacêutico Bioquímico Toni Ricardo Martins Telefone: (48) 9909.8474, E-mail: tr.martins@yahoo.com.br

Ou também entre em contato com os professores:

Maria Luiza Bazzo e Edison Natal Fedrizzi.

Telefone: (48) 3721.8148 ou (48) 9972.8718

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, (nome do paciente ou responsável legal em letras de forma)

.....
 . recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos ser utilizados conforme

descrito neste termo de consentimento.

Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura da pessoa que aplicou este termo

Nome da pessoa que aplicou este termo

Florianópolis, de de 2009.

Data / /

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data / /

