

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA**

NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS GUIMARÃES

**Associação entre tipos específicos de HPV e
carga viral com a
gravidade da neoplasia cervical**

Goiânia
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS GUIMARÃES

3. Título do trabalho

Associação entre tipos específicos de HPV e carga viral com a gravidade da neoplasia cervical

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por Narriman Kennia da Silva Barros Guimarães, Usuário Externo, em 17/07/2024, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Helena Rabelo Dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 18/07/2024, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4677026** e o código CRC **4D1D7175**.

NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS GUIMARÃES

**Associação entre tipos específicos de HPV e
carga viral com a
gravidade da neoplasia cervical**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos

Goiânia
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barros-Guimarães, Narriman Kennia da Silva
Associação entre tipos específicos de HPV e carga viral, com a gravidade da neoplasia cervical [manuscrito] / Narriman Kennia da Silva Barros-Guimarães. - 2012.
iv, 82 f.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo-Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2012.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. HPV. 2. Câncer cervical. 3. NIC. 4. Carga viral. 5. PCR. I. Rabelo Santos, Silvia Helena, orient. II. Título.

CDU 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - www.iptsp.ufg.br

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS - Aos vinte dias do mês de dezembro do ano de 2012 (20/12/2012), às 14 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, ANGÉLICA ESPINOSA MIRANDA, ISABEL CRISTINA CHULVIS DO VAL, MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA e RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, para, sob a presidência do (a) primeiro (a), e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS ESPECÍFICOS DE HPV E CARGA VIRAL COM A GRAVIDADE DA NEOPLASIA CERVICAL", em nível de DOUTORADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de NARRIMAN KENNIA DA SILVA BARROS, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo (a) Orientador (a), Prof. (a) Dr. (a) SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o (a) Candidato (a) sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o (a) Candidato (a), tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a)** ou **Reprovado (a)**:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a) Silvia Helena Rabelo dos Santos
Prof. (a) Dr. (a) Angélica Espinosa Miranda
Prof. (a) Dr. (a) Isabel Cristina Chulvis do Val
Prof. (a) Dr. (a) Menira Borges de Lima Dias e Souza
Prof. (a) Dr. (a) Ruy de Souza Lino Júnior

Aprovado (a) / Reprovado (a)

Aprovada
Aprovado
APROVADA
Aprovado
Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a) habilitado (Habilitado (a) ou não Habilitado (a)), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em MICROBIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretário (a) do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

Prof.ª. Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos (FF/UFG)

Silvia

Prof.ª. Dra. Angélica Espinosa Miranda (UFES/ES)

Angélica Espinosa Miranda

Prof.ª. Dra. Isabel Cristina Chulvis do Val (UFF/RJ)

Isabel Cristina Chulvis do Val

Prof.ª. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza (IPTSP/UFG)

Menira Borges de Lima Dias e Souza

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior (IPTSP/UFG)

Ruy de Souza Lino Júnior

Secretário da Pós-Graduação:

Kariny Vieira Soares e Silva

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.” (Carl Jung)

*Aos amores da minha vida:
Francisca, Sandra, Fernanda e Renato.*

Agradecimentos

“Não preciso ‘acreditar’ em Deus; eu sei que ele existe.”

Carl Jung

À **Deus** por todo amor e generosidade.

À **minha família** que sempre me apoia incondicionalmente.

Ao meu amor, **Renato**, meu companheiro, amigo e minha paz.

À Professora Doutora **Silvia Helena Rabelo dos Santos** por todo aprendizado e paciência.

À Professora Doutora **Vera Aparecida Sadi** pela disponibilidade, sabedoria e compreensão.

Aos amigos **Andrea, Kelly, Keila, Kélvia, Natália e Daniel** por toda ajuda e parceria.

A todos os funcionários do **Centro de Análise Rômulo Rocha e Hospitais Santa Casa de Misericórdia de Goiânia e Materno Infantil** que permitiram a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do IPTSP. De modo especial ao **José Clementino**, Zezinho, e a **Kariny Vieira**, por toda dedicação e prestatividade.

Aos amigos do trabalho, em especial ao **NASF 3** que entenderam minhas ausências.

Aos amigos que mesmo nos momentos de desânimo me colocaram para cima.

E a **FAPEG** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

I.	TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	I
II.	SÍMBOLOS, SIGLAS, E ABREVIATURAS.....	II
III.	RESUMO.....	V
IV.	ABSTRACT	VII
1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	O câncer cervical	1
1.2.	Papilomavirus humano (HPV)	4
1.2.1.	Morfologia, taxonomia e classificação.....	4
1.2.2.	Epidemiologia da Infecção pelo HPV.....	8
1.3.	Rastreamento do câncer do colo uterino	11
1.4.	Métodos moleculares para a detecção do HPV.....	14
1.5.	Tratamento.....	17
2.	JUSTIFICATIVA	18
3.	OBJETIVOS	19
3.1.	Objetivo Geral	19
3.2.	Objetivos específicos.....	19
4.	METODOLOGIA.....	20
4.1.	Desenho do estudo e coleta dos espécimes biológicos	20
4.2.	Exame citológico	21
4.3.	Exame colposcópico.....	22

4.4. Exame Histológico	22
4.5. Detecção do HPV	22
4.5.1. Extração do DNA	22
4.5.2. Amplificação do DNA e genotipagem do HPV	23
4.6. Determinação da carga viral do HPV	24
4.7. Análises estatísticas	25
5. ARTIGOS	26
5.1. Artigo 1	27
5.2. Artigo 2	43
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE	76
ANEXO	80

I. TABELAS, FIGURAS, QUADROS E ANEXOS

Figura 1. Risco para a persistência e progressão da infecção por HPV	3
Figura 2. Árvore filogenética do HPV.....	5
Figura 3 Estrutura genômica do HPV.....	6
Figura 4. Modelo de progressão do câncer cervical	11
Figura 5. Fluxograma da inclusão de casos e diagnóstico cito e histológico	21
Figura 6. Representação esquemática das principais etapas envolvidas na genotipagem do HPV através da hibridização reversa do produto da PCR baseada no sistema de iniciadores PGMY09/11 marcados com biotina	24
Artigo 1. Relationship between the incidence and genotyping of Human Papillomavirus 16/18 with cervical abnormalities by age groups	27
Table 1. Distribution of the cytological diagnosis in women referred for abnormal cervical smear	38
Table 2. Distribution of the histological diagnosis in women referred for abnormal cervical smear	39
Table 3. Summary statistics of age (Years) by histology, cytology and genotype	40
Table 4. Association between HPV types and cytological diagnosis by age groups	41
Table 5. Association between HPV types and histological diagnosis by age groups.....	42
Artigos	
Artigo 2. Association between HPV-16 viral load and severity of cervical neoplasia.....	43
Table 1. Distribution of the cytological diagnoses in women HPV 16 positives	54
Table 2. Distribution of the histological diagnoses in women HPV 16 positives	55
Table 3. Distribution of cytological diagnosis in relation to viral load.....	56
Table 4. Distribution of histologic diagnosis in relation to viral load	57
Table 5. Association between viral load and cytological and histologic diagnosis	58
Apêndice. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	77
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Santa Casa Misericórdia de Goiânia	81
Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Materno Infantil	82

II. SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AIS	Adenocarcinoma in situ
AGC- SOE	Atypical glandular cells not otherwise specified
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance
ASC-H	Atypical squamous cells cannot exclude HSIL
CAF	Cirurgia de alta frequência
CH2	Captura Híbrida 2
CI	Confiance Interval
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
dNTP	Desoxi-nucleotídeos Trifosfato
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico
E1-	Early 1- oncoproteína E1
E2	Early 2- Oncoproteína E2
E6	Early 6 – oncoproteína E6
E7	Early 7 – oncoproteína E7
EZT	Exerése da zona de transformação
FDA	Food and Drug Administration
G1	Fase do ciclo celular
GH20	Iniciador para o gene da β -globina
GP	Iniciadores de consenso para L1
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Human papillomavirus
HSIL	High squamous intraepithelial lesions
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IST	Infecção sexualmente transmissível
KCL	Cloreto de potássio
LA	Linear array
L1	Late 1- Proteína estrutural
L2	Late 2- Proteína estrutural
LCR	Long Controll Region

LIE	Lesão intraepitelial escamosa
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LSIL	Low squamous intraepithelial lesions
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mitocondrial
N	Normalidade
NaOH	Hidróxido de sódio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio
ORF	Open reading frame
Pb	Pares de base
PC04	Iniciador para o gene da β-globina
PGMY	Iniciadores de consenso para L1
PCR	Polymerase chain reaction
p53	Gene suppressor tumoral
pRb	Proteína do retinoblastoma
RB	Reticular body
RNA	Ribonucleic acid/ Ácido ribonucleico
RNAase	Enzima RNA-ase
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	Real time PCR / PCR em tempo real
SIL	Squamous Intraepithelial lesions
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR2	Toll-like receptor 2
UCM	Universal Collection Medium
UFG	Universidade Federal de Goiás
WHO	World Health Organization

III. RESUMO

Introdução: O câncer cervical é uma consequência rara e desenvolvida a longo prazo a partir de uma infecção por papilomavírus humano (HPV). Fatores relacionados à aquisição da infecção viral e à sua persistência parecem aumentar o risco de desenvolvimento da neoplasia cervical. O tipo viral específico envolvido na infecção e carga viral com valores elevados parecem estar ligados à persistência da infecção e à progressão da neoplasia cervical e consequentemente à gravidade da neoplasia cervical.

Objetivos: Identificar os tipos específicos de HPV e o valor da carga viral do HPV 16 na gravidade da neoplasia cervical.

Metodologia: Estudo transversal realizado em Goiânia, Goiás, incluindo mulheres encaminhadas à Santa Casa de Misericórdia de Goiânia e ao Hospital Materno Infantil, por apresentarem alterações citologia oncológica. Todas as mulheres incluídas no estudo foram submetidas a um segundo exame citológico e realizada a coleta de conteúdo vaginal para análise molecular. A detecção do HPV foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a genotipagem pela hibridização reversa. Foram selecionadas 331 mulheres com diagnóstico citológico, 238 delas com diagnóstico histológico. Após análise molecular, foram excluídas 58 mulheres HPV negativas. Nas 273 mulheres HPV positivas foi realizada a análise da associação entre tipos de HPV e risco de gravidade do diagnóstico citológico, por faixa etária na seguinte categorização: < 30 anos, 30-39 anos, 40-49 anos e \geq 50 anos. Para a avaliação da associação da carga viral com o diagnóstico citológico e histológico, foram selecionadas 77 mulheres HPV 16 positivas pela técnica de PCR em tempo real.

Resultados: A prevalência total da infecção pelo HPV foi de 82,5%. O HPV 16 foi o tipo mais prevalente representando 44,7% dos casos. A infecção pelos HPV 16 e/ou 18 mostrou associação significativa tanto com o diagnóstico citológico de LIEAG ou lesão mais grave (OR: 2,12 IC 95% 0,98 – 4,59) quanto com o diagnóstico histológico de NIC 2 ou lesão mais grave (OR: 3,21 IC 95% 1,21- 8,59) em mulheres com idade inferior a 30 anos. O diagnóstico citológico de HSIL ou lesão mais grave (OR 4,59; 95% CI: 1,4- 15,49; $p= 0,004$) e o diagnóstico histológico de neoplasia de alto grau (\geq NIC 2) (OR 6,51; 95% CI: 2,9- 20,92; $p = 0,0002$) foram significativamente associados com maiores valores de carga viral em mulheres infectadas pelo HPV 16.

Conclusões: Estes resultados reforçam a hipótese de que as infecções por HPV 16 e/ou 18 em mulheres jovens podem levar rapidamente à formação de lesões mais graves e que

altas cargas virais resultantes da infecção pelo HPV 16 estão associadas à gravidade da neoplasia cervical

Palavras-chave: HPV, NIC, câncer cervical, carga viral, idade, HPV 16, PCR, esfregaço cervical.

IV.ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is a rare consequence and developed long term from a infection by specific types of human papillomavirus (HPV). There are factors related to the acquisition of infection and its persistence that increase the risk of developing cervical neoplasia. The type-specific viral infection and higher viral loads values appear to be related to persistence of virus and progression of neoplasia and therefore with the severity of cervical neoplasia.

Objectives: To identify the specific types of HPV in different age groups as well as the importance of viral load of HPV 16 with the severity of cervical neoplasia.

Methods: This cross-sectional study conducted in Goiânia, Goiás, included women referred to the Hospitals Santa Casa de Misericórdia de Goiânia and Hospital Mother and Child, by presenting changes in routine cytological examination. All women included in the study were subjected to a second cytologic examination and it was made the collection of cervical secretions for molecular analysis. HPV DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR) and HPV genotyping was performed by reverse hybridization assay. A total of 331 women with cytological diagnosis were selected, 238 of them with histological diagnosis. After PCR for HPV, 58 women were excluded for being HPV negative. In the 273 HPV-positive women an analysis of the association between HPV types and risk of severity of cytological diagnosis by age group was carried out in the following categorization: <30 years, 30-39 years, 40-49 years and ≥ 50 years. To evaluate the association between viral load values with severity of cytological and histological diagnosis, 77 women HPV 16 positive by PCR in real time were selected.

Results: The overall prevalence of HPV infection was 82.5%. HPV 16 was the most prevalent type representing 44.7% of cases. Infections by HPV 16 and / or 18 were significantly associated with both the cytological diagnosis of HSIL or more severe lesions (OR: 2.12 95% CI 0.98 to 4.59) and either with the histological diagnosis of CIN 2 or more severe (OR: 3.21 95% CI 1.21 to 8.59) lesions in women younger than 30 years. The cytological diagnosis of HSIL or more severe lesions (OR 4.59, 95% CI: 1.4 to 15.49, $p = 0.004$) and histological diagnosis of high-grade neoplasia (\geq CIN 2) (OR 6.51; 95% CI: 2.9 to 20.92, $p = 0.0002$) were significantly associated with higher viral load values in women infected with HPV 16.

Conclusions: These results support the hypothesis that infection with HPV 16 and / or 18 in young women can quickly lead to the formation of more severe lesions and high

viral loads resulting from infection by HPV 16 are associated with the severity of cervical neoplasia

Keywords: HPV, CIN, cervical cancer, viral load, age, HPV 16, PCR, cervical smear.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer Cervical

Epidemiologia, lesões precursoras e agente etiológico

O câncer cervical é comum entre mulheres em todo o mundo, sendo a segunda neoplasia mais frequente na população feminina, superado apenas pelo câncer de mama (Raychaudhuri & Mandal, 2012; INCA, 2012). Apesar de ser um câncer totalmente prevenível, estima-se que o número de casos no mundo, dobre até 2025 (WHO, 2010). As estimativas anuais de incidência dos casos e mortes nos países de baixa e média renda são aproximadamente 450.000 e 240.000, respectivamente. Estima-se que mais de 88% das mortes ocorram nesses países e é esperado que essa porcentagem suba para pelo menos 91,5% em 2030 (Ferlay et al. 2010).

No Brasil é a quarta causa de morte de mulheres, sendo responsável por aproximadamente 4800 óbitos por ano. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de casos novos para o ano de 2012 é de 17540 casos, sendo 820 destes casos no Estado de Goiás e 210 casos na cidade de Goiânia (INCA 2012). Os tipos mais frequentes de câncer cervical são os carcinomas de células escamosas que se desenvolvem a partir de lesões precursoras, seguidos pelo adenocarcinoma (Lax 2011).

As lesões precursoras designadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), são categorizadas em três graus (NIC1-3) baseados no grau de proliferação de células basais atípicas que perdem gradualmente as funções de controle de crescimento normal, não se diferenciam adequadamente e como consequência, há proliferação desordenada de células indiferenciadas em toda a espessura do epitélio (DeMay 1993; Crum et al., 1997; Tavassoli 2003; Lax 2011; Munhoz et al., 2012). A proliferação de células basais atípicas atinge 1/3 do epitélio na NIC 1, as atipias chegam até o terço médio do epitélio cervical no caso das NIC 2, ou ocupam o terço superior do epitélio cervical nas NIC 3 (Crum et al., 1997; Lax, 2011).

A nomenclatura citológica baseada no Sistema de Bethesda distingue entre duas categorias com biologia distinta: lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau (LIEBG e LIEAG), respectivamente (Solomon & Nayar, 2004; Lax, 2011). As LIEBG são caracterizadas por extensas anormalidades citológicas relacionadas ao Papilomavírus humano (HPV), como coilocitose e proliferação das células basais e parabasais com

atípias leves e mitoses atípicas e correspondem a NIC 1 no exame histológico. Em contraste, as LIEAG consistem de células basais atípicas de pequeno e médio tamanho que pode envolver toda a espessura do epitélio e que muitas vezes não apresentam anormalidades citológicas claramente visíveis relacionadas ao HPV e corresponde as NIC 2 e NIC 3 no exame histológico (Lax, 2011).

Inicialmente, considerava-se a hipótese de que o carcinoma de células escamosas sempre evoluía de epitélio cervical infectado normal através de um processo de longa duração em que as NIC 1 evoluíam para NIC 2 e estas para NIC 3. No entanto, há evidências de que somente parte das NIC1 progredem para NIC 2 e NIC 3, pois a maioria das NIC 1 tem potencial para regredir (Lax, 2011). Logo, um conceito alternativo que encontra apoio crescente é de que as lesões do tipo NIC 2 e NIC 3 podem ser rapidamente induzidas dentro de dois a três anos após a infecção, e leva entre 10 a 12 anos para desenvolver câncer invasivo. A maioria das lesões NIC 1 e algumas NIC 2 não podem ser consideradas como verdadeiras lesões precursoras do câncer cervical, mas sim o efeito citopático de uma infecção viral produtiva (Snijders et al., 2006). Por outro lado, há substancial heterogeneidade no diagnóstico citológico e histológico e no comportamento biológico da NIC 2 (D'Ottaviano et al., 2004; Snijders et al., 2006).

Há evidências epidemiológicas de que o comportamento biológico da NIC 2 seja mais semelhante à NIC 1 do que à NIC 3 (D'Ottaviano et al., 2004). As NIC 1 regredem em 57% dos casos e sua taxa de persistência em lesões não tratadas é de 32% . A média da idade da mulher no momento do diagnóstico de NIC 2 é cerca de 10 anos menor do que a média de idade no momento do diagnóstico de NIC 3. Estudos de coorte sobre a história natural da lesão do tipo NIC 2 têm demonstrado regressão de 26% a 60% dos casos (Guedes et al., 2007). Adicionalmente, estudo realizado por Discacciati et al., (2011) mostrou uma taxa de regressão maior (74%) de NIC 2 ao final de 12 meses de seguimento, sendo que esta regressão ocorreu nos primeiros seis meses de seguimento em 84% dos casos. Em relação às NIC 3 a taxa de regressão das lesões é de 32% enquanto a taxa de persistência das lesões não tratadas é de 56% (Guedes et al., 2007).

Embora as NIC 2 apresentem taxas de regressão mais semelhantes às NIC 1, existem NIC 2 que exibem expressões gênicas virais similares às observadas em NIC3, incluindo aumento na expressão de oncoproteínas (E6 e E7) em células proliferativas (Snijders et al., 2006). Portanto, as NIC 1 indicam uma infecção ativa pelo HPV, as NIC 2 são consideradas lesões de alto grau, mas podem regredir espontaneamente em mais de

40% das mulheres e a NIC 3 é a menos provável de regredir e é considerada a verdadeira lesão precursora do câncer cervical (Trottier et al., 2006; Naucler et al., 2007).

A importância das infecções sexualmente transmissíveis (IST) no desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras foram reconhecidas há mais de 20 anos (Golijow et al., 2005). A principal descoberta em etiologia de cânceres humanos foi o reconhecimento de que o câncer do colo uterino é consequência da infecção por alguns tipos de HPV (Bosch, 2003; Trottier & Burchell, 2009). Este vírus está presente em mais de 99,7% dos casos de câncer do colo do útero (Walboomers et al., 1999; Leto et al., 2011) e é considerado o agente sexualmente transmissível mais comum em vários países (Juckett & Hartman-Adams, 2010). O câncer cervical se origina de um processo ao longo de décadas que inicia com uma infecção com um tipo de HPV carcinogênico (Figura 1) (Munoz et al., 2009; Rodriguez et al., 2010).

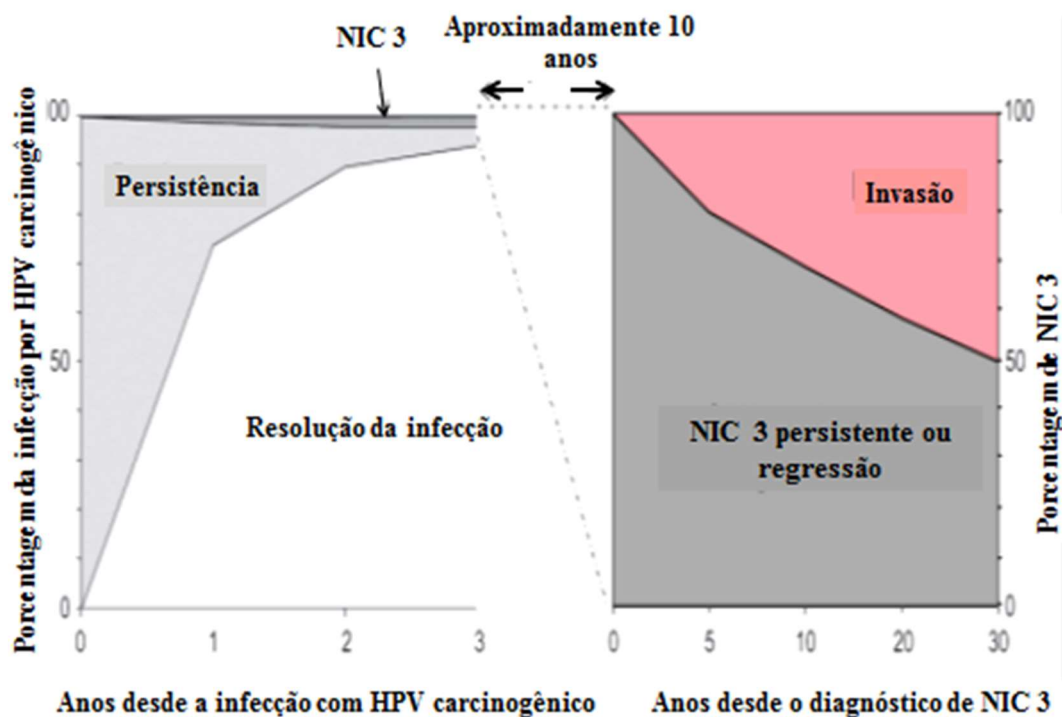


Figura 1: Riscos da persistência e progressão do HPV. **Figura da esquerda:** Proporção da prevalência de infecção com HPV carcinogênico que clarifica, persiste, ou progride para NIC 3 em três anos após a primeira detecção (Guanacaste Natural History Study). A grande maioria representou novas infecções. Persistência sem NIC 3 é surpreendentemente incomum. **Figura da direita:** Proporção de NIC 3 não tratadas que evoluem para câncer invasivo dentro de 30 anos após o diagnóstico inicial. Adaptado de Schiffman et al., 2010.

1.2 Papilomavirus humano (HPV)

1.2.1 Morfologia, taxonomia e classificação

O HPV é um grupo de mais de 100 vírus que infectam células epiteliais humanas (Juckett & Adams 2010). São vírus de DNA de fita circular dupla de 8000 pares de base (Zur Hausen 2002; Bernard et al., 2010), dividido em região reguladora (LCR – *long control region*), que contém a origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição. As regiões codificadoras são denominadas ORF (*open reading frames*) e contém as sequências precoce e tardia (Southern & Herrington, 1998). A região tardia (L-late), que codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2), é responsável pelas etapas finais da replicação do vírus, como síntese de proteínas estruturais do capsídeo (Finnen et al., 2003; Florin et al., 2002).

A região precoce (E-early) codifica as proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e transformação celular, das quais destacam E1, E2, E6 e E7 (Buck et al., 2009). As duas proteínas reguladoras, E1 e E2, modulam a transcrição e a replicação (de Villiers et al., 2004) (Figura 2).

As oncoproteínas, E6 e E7, modulam o processo de transformação celular (de Villiers et al., 2004), alterando o metabolismo da célula hospedeira favorecendo o desenvolvimento neoplásico. As proteínas resultantes desses genes causam a inativação de duas importantes proteínas supressoras de tumor a p53 e a retinoblastoma (pRb) (Rapose, 2009). Em situações normais, a p53 age como fator de transcrição, se ligando a sequências específicas do DNA. A ativação da p53 induz a parada do ciclo celular frente a fatores que danificam o material genético, permitindo o reparo do DNA antes da progressão do ciclo celular. Em algumas condições, a ativação da p53 pode resultar em apoptose celular (Snijders et al., 2006; Lax 2011). A pRb, na sua forma ativa, está ligada ao fator de transcrição E2F, inibindo a ação transcricional deste, atuando na fase G1, controlando a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência da célula. (Classon & Harlow, 2002).

A oncoproteína E6 se liga e degrada a proteína p53 da célula hospedeira inibindo a apoptose da célula infectada. A oncoproteína E7 se liga a pRb inibindo sua função (Bringhenti et al., 2010). Essas proteínas, que são reguladoras do ciclo celular, são consideradas supressoras de tumor, uma vez que determinam desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, levando ao câncer por impedirem a apoptose e causar

imortalização celular, confirmando assim o papel do HPV na carcinogênese viral (Di Bonito et al., 2006; Wentzensen & von Knebel Doeberitz, 2007).

A região codificadora do gene L1 é a mais conservada ao longo do genoma viral, motivo pelo qual vem sendo utilizada na identificação, classificação e construção de árvores filogenéticas dos papilomavírus. Um novo tipo viral é identificado quando a sequência do DNA que forma a região L1 difere em mais de 10% da região correspondente no tipo mais próximo conhecido. Quando essa variação é de 10% a 2%, o mesmo é definido como um subtipo; e se a sequência variar em menos que 2%, o novo papilomavírus é considerado uma variante do tipo mais próximo já identificado (Bernard et al. 2010, de Villiers et al. 2004).

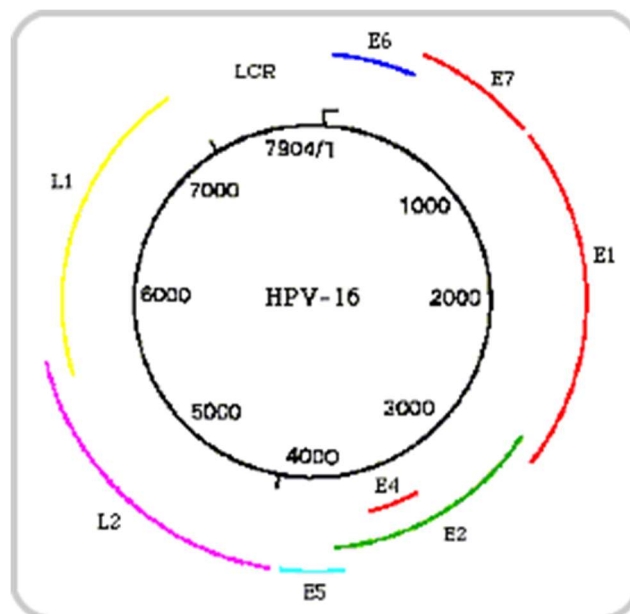


Figura 2: Estrutura genômica do HPV. Fonte: www.citocamp.com.br/hpv/hpv.html

Os HPV responsáveis por infecções em mucosas, incluindo a região anogenital e a cavidade oral, pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus* (de Villiers et al. 2004, Schiffman & Wentzensen 2010). Segundo a classificação proposta por Bernard et al. (2010), atualmente este gênero compreende 189 tipos diferentes de papilomavírus classificados em 14 espécies (Figura 3). A denominação das espécies comumente utilizada pela comunidade científica difere dos termos adotados pelo “Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus” (ICTV). Na classificação reconhecida por este comitê, os grupos alfa-9 e alfa-7, por exemplo, correspondem às espécies *Human papillomavirus 16* e *Human papillomavirus 18*, respectivamente (de Villiers et al. 2004, Bernard et al., 2010).

Tipos específicos de HPV determinam riscos diferentes para as neoplasias cervicais. Em revisão realizada por Clifford et al., (2005), os tipos de HPV mais prevalentes no diagnóstico de LIEBG foram os tipos 16, 31, 51 e 53. Para os diagnósticos de LIEAG, os tipos mais prevalentes são o HPV 16, seguido pelos tipos 31, 52 e 33 (Clifford et al., 2006). Considerando os casos de câncer cervical, o tipo 16 é mais comum nos casos de carcinoma de células escamosas, seguido pelos tipos 45, 31, 33, 58 e 52 ao passo que o HPV 18 foi mais prevalente nos casos de adenocarcinoma (Smith et al., 2007).

O HPV 16 apresenta maior poder de persistência. Isto se deve ao fato de que o HPV 16 tem capacidade única de evadir ao sistema imune o que resultaria em maior persistência das infecções pelo HPV 16 do que das infecções com os outros tipos de HPV (Sideri et al., 2011). Quando persiste por dois anos o HPV 16 possui maior capacidade de causar NIC e câncer do que qualquer outro tipo potencialmente oncogênico. Além disso, há indicações de que a idade e o tipo relacionado são fatores de risco para o desenvolvimento de NIC 2 ou lesão mais severa (Sideri et al., 2011). Há indícios de que nas infecções pelos HPV 16 e 18 as NIC surgem mais precocemente, no início da vida sexual, ao passo que nas infecções por outros tipos de alto risco as NIC surgem mais tardiamente, ainda que a infecção tenha ocorrido na adolescência (Coupé et al., 2008; Sideri et al., 2011).

Outro fator importante na história das neoplasias cervicais é a carga viral. A carga viral tem sido sugerida como uma variável para distinguir infecções por HPV de relevância clínica (Woodman et al., 2007). Uma carga viral elevada de HPV de alto risco oncogênico pode ser considerada como um marcador de risco tipo-dependente para lesões cervicais de grau ou carcinoma (Moberg et al., 2005; Boulet et al., 2008) visto que têm sido relacionadas com maiores taxas de persistência da infecção por esses tipos oncogênicos e conseqüentemente com a persistência e recorrência das lesões precursoras do câncer cervical (Park et al., 2008). Além disso, é possível que uma alta carga viral aumente a probabilidade de integração do DNA viral em sítios cromossômicos das células do hospedeiro favoravelmente selecionados para adquirir vantagem de crescimento.

Por fim, altas cargas virais são associadas com a prevalência das lesões precursoras do câncer cervical para a maioria dos tipos de HPV de alto risco, mas somente a carga viral do HPV16 prediz o desenvolvimento de NIC 2 ou lesão mais graves (Moberg et al., 2005; Gravitt et al., 2007). Contudo lesões graves também podem estar associadas a cargas virais baixas (Schlecht et al., 2003; Gravitt et al., 2003).

O processo de integração do genoma do HPV ao DNA da célula hospedeira é considerado um importante passo na progressão de lesões precursoras para o carcinoma invasor, uma vez que a prevalência de formas integradas aumenta com a gravidade da lesão (Woodman et al. 2007). A integração não é uma etapa natural do ciclo de replicação viral e se caracteriza pela deleção de genes que são essenciais à síntese de partículas virais infecciosas. Durante a integração, ocorre quebra do DNA do HPV na região próxima aos genes E6 e E7, frequentemente rompendo a região dos genes E1 e E2. A ruptura do gene E2 resulta na sua inativação, impedindo a transcrição da proteína E2. A principal função conhecida do gene precoce E2 é regular a expressão dos genes E6 e E7 através de um *feedback* negativo. A perda deste gene faz com que haja um aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7, favorece a seleção de clones de células com expressão gênica otimizada, potencializando o processo de imortalização das células afetadas (Woodman et al. 2007; Pett & Coleman 2007; Cricca et al., 2007; Saunier et al. 2008; Burk et al. 2009; Moody & Laimins 2010; Ghittoni et al. 2010).

Muitos estudos indicam que as formas episomal e integrada frequentemente coexistem e podem ser encontradas não só em lesões de alto grau, mas também em carcinomas invasores (Schlecht et al., 2003; Collins et al., 2009). Dessa forma, acredita-se que as células que ainda apresentam o genoma viral na forma episomal estariam em um estágio do processo de transformação anterior às células que já apresentam o genoma do HPV integrado (Peitsaro et al., 2002).

1.2.2 Epidemiologia da infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV é a mais comum em mulheres (Winer et al., 2005; Juckett & Hartman-Adams, 2010). Mais de 79% das mulheres sexualmente ativas adquirem a infecção genital pelo HPV durante a vida, no entanto, a infecção é comumente transitória e assintomática (Syrjanen et al., 1990; Juckett & Hartman-Adams, 2010). Devido o seu papel central na etiologia de todos os casos de câncer cervical, o HPV é considerado causa necessária, mas não suficiente para que este ocorra (Schiffman et al., 2010).

Existem fatores relacionados à aquisição da infecção e outros relacionados à persistência da infecção que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer cervical, que atuam na história natural do HPV (Almonte et al., 2008). Fatores relacionados ao comportamento sexual das mulheres, como a idade do início da atividade sexual, o uso

irregular, ou o não uso de preservativos, número de parceiros e o comportamento sexual destes parceiros, estão relacionados à maior risco para adquirir a infecção pelo HPV. Os fatores ligados à persistência e, conseqüentemente, com o risco aumentado de desenvolver o câncer cervical são o número de gestações, o fumo, o uso de contraceptivos orais, a co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis como a infecção pela *Chlamydia trachomatis*, herpes vírus tipo 2 e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Almonte et al., 2008), o tipo e a carga viral do HPV (Schlecht et al., 2003; Einstein et al., 2011; Sideri et al., 2011).

Mulheres mais jovens tendem a ter ectopia mais pronunciada (reversão do epitélio endocervical colunar para a face do colo do útero), que expõe uma maior área de superfície do epitélio frágil, apresentam maior risco de adquirir a infecção pelo HPV (Jacobson et al., 2000; Roberts et al., 2011). Há indicações de que anormalidades cervicais mais severas são observadas em adolescentes e mulheres até seus 25 anos após a aquisição da infecção por HPV de alto risco oncogênico. Dados indicam que o pico de incidência da infecção pelo HPV ocorre dentro de cinco a 10 anos após o início da atividade sexual (Munoz et al., 2009). Após adquirir a infecção, o que vai determinar um maior risco de desenvolver neoplasias cervicais mais graves é a persistência ou não dessa infecção (Schiffman et al., 2010).

A infecção pelo HPV no colo do útero pode ser latente, subclínica ou clínica. A doença pode manifestar-se como NIC de baixo grau (NIC1) e alto grau (NIC2 e NIC3) (Juckett & Hartman-Adams, 2010) e a persistência da infecção pelo HPV é incomun representando, a distinção fundamental entre a exposição benigna ao HPV e o substancial risco de neoplasia cervical (Schiffman et al., 2010).

A persistência de infecção pode ser definida através da detecção de um mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes em certo período, não havendo consenso de quanto tempo seria esse período (Schiffman & Kjaer, 2003) e está relacionada a vários fatores, entre eles, mecanismos de evasão à resposta imune pelo vírus, considerando que na persistência da infecção e no desenvolvimento de lesões há diminuição numérica e alterações morfológicas e funcionais das células apresentadoras de antígenos com diminuição numérica variável das células T intra-epiteliais (Scott et al. 2001; Stern, 2005; Hernandez-Montes et al., 2012).

Altas taxas de infecção por HPV16 e HPV18 são observadas em mulheres jovens e muitas são, portanto, propensas a ter lesões produtivas caracterizadas por extensa disseminação viral (Olsson et al., 2009). Após a adolescência, a freqüência da infecção

pelo HPV nas mulheres diminui com a idade, mas a persistência da infecção aumenta (Murta et al., 2001; Castle et al., 2005). Mais de 90% dos indivíduos infectados com HPV de alto e baixo risco eliminam a infecção dentro de cerca de dois anos (Koshiol et al., 2008, Juckett & Hartman-Adams, 2010). Uma pequena minoria que não consegue eliminar a infecção tem o risco de progressão para lesões malignas (Moscicki et al., 2004).

Para o planejamento das ações de prevenção do câncer cervical em Saúde Pública, é necessário conhecer a distribuição da média de idade dos três estágios ascendente graves na carcinogênese cervical: infecção aguda pelo HPV, NIC 3 e câncer. Estudos apontam dois padrões para o perfil da infecção pelo HPV. O primeiro mostra que as maiores prevalências são encontradas em mulheres abaixo dos 25 anos, com progressivo decréscimo linear após esta idade, alcançando valores inferiores a 5% após os 55 anos (Sanjose et al., 2003; Rama et al., 2008). Um segundo padrão de prevalência da infecção genital pelo HPV foi observado em estudos de base populacional onde a prevalência seguiu uma curva bimodal em forma de “U”, com maior predomínio entre as jovens, declínio na terceira década e novo pico ao redor de 55 anos ou mais (Herrero et al., 2000; Lazcano-Ponce et al., 2001; Bosch et al., 2008).

Os picos da distribuição de infecção pelo HPV variam por região geográfica e refletem a média de idade local da primeira relação sexual, uma vez que a infecção pelo HPV ativa os eventos que se seguem. Um pico elevado de infecções incidentes pelo HPV ocorre alguns anos após a média da idade em que as mulheres se tornam sexualmente ativas. Após esse pico, há geralmente declínio gradual, uma vez que a maioria das infecções é transitória sendo eliminada nos primeiros anos após a aquisição da infecção. As infecções que persistem podem ocasionar o aparecimento das neoplasias cervicais o que leva ao aparecimento de um segundo pico, relacionados aos casos de NIC 3, cerca de cinco a 15 anos depois (o pico de diagnóstico de NIC 3 muda para as idades mais jovens, proporcionalmente à qualidade de um programa de triagem). Comumente, leva-se décadas para uma lesão NIC 3 desenvolver-se e, eventualmente, invadir, embora existam raras exceções. Um longo pico ou platô é observado para os casos de câncer invasivo ao longo das décadas subsequentes (Franceschi et al., 2006; Bosch et al., 2008; Schiffman et al., 2010, Barros et al., 2011) (Figura 4).

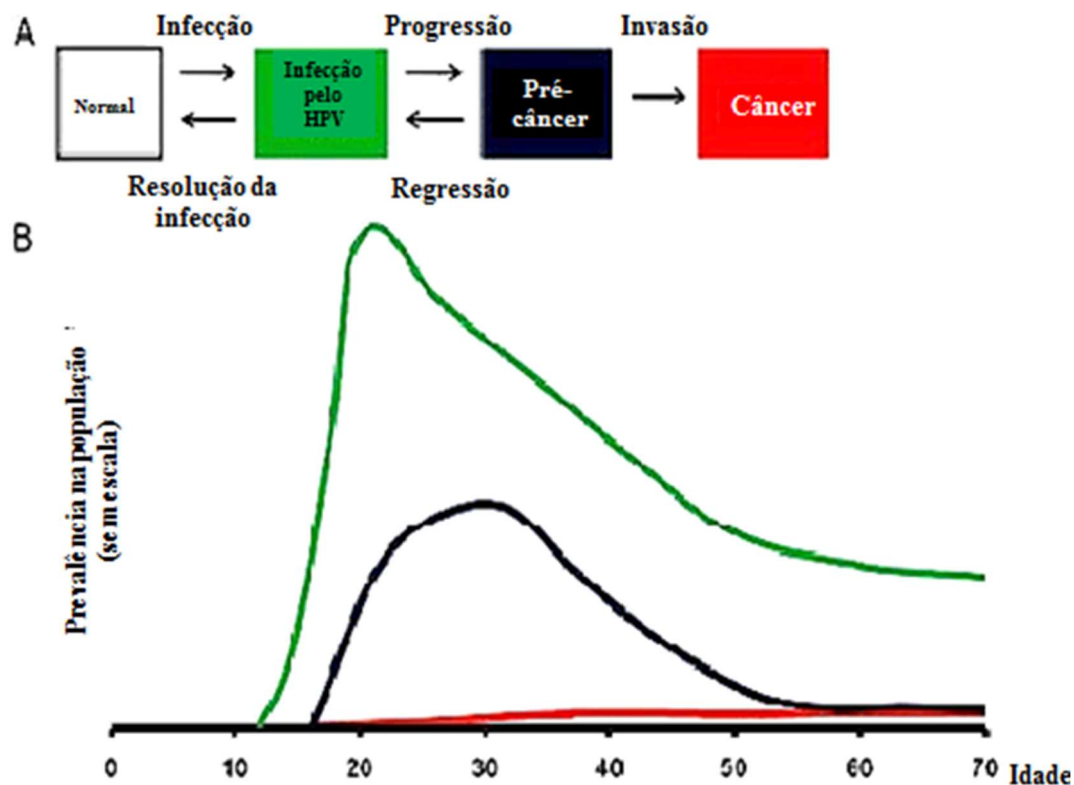


Figura 4: Modelo de progressão do câncer cervical. A) As três etapas da carcinogênese cervical são: infecção aguda pelo papilomavírus humano (HPV), a persistência do HPV associada ao desenvolvimento de NIC3 em particular, e invasão. B) Lesões pré-câncer e resolução da infecção são extremamente comuns e juntos contribuem para o pico agudo da prevalência de HPV nos anos seguintes a média da idade da primeira relação sexual na população. A idade média do diagnóstico de NIC 3 depende da eficácia dos mecanismos de rastreio na população. As curvas de prevalência não estão em escala. O gráfico mostra a relação entre a idade e prevalência de infecções por HPV (verde), NIC 2 e NIC 3 (azul), e câncer cervical (vermelho) nos Estados Unidos (Fonte: Kaiser Permanente Northern California Health Maintenance Organization. Adaptado de Schiffman et al., 2010).

1.3 Rastreamento do Câncer do Colo Uterino

A primeira metodologia desenvolvida para detectar alterações compatíveis com a infecção pelo HPV foi o exame de Papanicolaou (Solomon & Nayar, 2004). O exame citológico de Papanicolaou ou colpocitologia oncológica é uma das estratégias mais bem sucedidas para a prevenção de câncer, entretanto é necessária infraestrutura complexa e muito bem organizada para obter resultados satisfatórios: unidades de saúde e profissionais bem treinados para coletar e preparar o material de forma adequada, laboratórios para corar as lâminas e profissionais especializados para lê-las e emitir o laudo e, finalmente, médicos treinados para lidar com as anormalidades detectadas (Derchain et al., 2005).

Quando se detecta alterações citológicas, estas são interpretadas e as mulheres são submetidas à conduta clínica adequada, levando em consideração o grau das anormalidades citológicas observadas no esfregaço (Wright et al. 2007). As mulheres com resultados citológicos anormais de alto risco são encaminhadas para colposcopia, exame de inspeção do colo uterino que permite localizar as lesões, direcionar a biópsia e estabelecer o tratamento (Chase et al. 2008).

O Sistema de Bethesda é um sistema de terminologia utilizado para reportar os resultados do exame citológico de forma a fornecer orientações claras para o manejo clínico e diminuir a confusão entre laboratórios e médicos gerada pela utilização de múltiplos sistemas de classificação. Segundo o Sistema de Bethesda revisado em 2001, os achados citológicos podem ser interpretados de acordo com o grau e a natureza das alterações morfológicas observadas no esfregaço (Solomon & Nayar 2004).

Em meta-análise realizada para determinar a precisão do exame citológico, foram combinados dados de 59 estudos e estimou-se a sensibilidade de 11 a 99% e especificidade de 14 a 97%. Um estudo sistemático relatou uma sensibilidade e especificidade, respectivamente, de 30 a 87% e 86 a 100% (Zeferino & Derchain, 2006). Estudos transversais mais recentes, realizados em países em desenvolvimento, relataram sensibilidade variando de 44 a 78% e uma especificidade de 91 a 100% (Wright et al., 2000; Denny et al., 2002; Cronjé et al., 2003; Albert et al., 2012).

Em relação às anormalidades do epitélio escamoso, os esfregaços podem ser interpretados como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) quando apresentam alterações citológicas em células intermediárias e superficiais sugestivas, porém qualitativa e ou quantitativamente insuficientes para a interpretação definitiva de lesão intraepitelial escamosa (LIE). As principais características citomorfológicas são: leve aumento da relação núcleo/citoplasma e núcleos arredondados ligeiramente hiper cromáticos, apresentando tamanho duas a três vezes maior que o normal (Solomon & Nayar 2004; Hoda & Hoda 2007). Em casos onde estas alterações estão presentes em células mais jovens o resultado é interpretado como células escamosas atípicas em que não pode excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau (ASC-H) (Ali & Ali, 2003; Solomon & Nayar, 2004).

Em relação aos esfregaços citológicos caracterizados como LIEBG, os principais critérios citomorfológicos usados são: citomegalia; multinucleação; hiper cromasia, contorno irregular da membrana nuclear; halo perinuclear; e a presença de células com escavações irregulares ao redor do núcleo (coilócitos), caracterizando o

efeito citopático provocado pelo HPV. Estas alterações citológicas são observadas principalmente em células escamosas maduras, já que estão associadas à infecção produtiva pelo HPV, na qual a replicação viral e a produção de novas partículas virais são fortemente acopladas ao processo de diferenciação do epitélio (Wright 2006; Snijders et al. 2006).

Em esfregaços citológicos caracterizados como LIEAG ou mais grave, as características citomorfológicas provocadas pelo efeito citopático do HPV são geralmente menos proeminentes do que nos esfregaços interpretados como LIEBG. Desta forma, a detecção de sinais citológicos clássicos da infecção pelo HPV tais como coilocitose e citomegalia aumenta a probabilidade do diagnóstico de NIC 1 (Alves de Sousa et al. 2011). Os principais critérios citomorfológicos observados em LIEAG são a presença de células jovens com elevada relação núcleo-citoplasmática, núcleos hipercromáticos, contorno irregular da membrana nuclear, pleomorfismo nuclear e figuras mitóticas anormais (Wright et al., 2004).

Os critérios citomorfológicos observados no carcinoma escamoso invasor são: a presença de formas celulares bizarras, apresentando variações de tamanho e forma, anisonucleose e queratinização; e a presença de células em forma de girino. Esfregaços evidenciando hemácias lisadas, núcleos desnudos e diátese tumoral, quando associados aos fatores citomorfológicos também são indicativos de carcinoma de células escamosas (Wright et al. 2004; Hoda & Hoda 2007).

Para as alterações em células glandulares, a presença de células glandulares atípicas (AGC) pode ser identificada pela presença de alguns, mas não de todos os critérios citomorfológicos usados para caracterizar o adenocarcinoma in situ (AIS). Células com núcleos apinhados e hipercromáticos, com perda da polaridade, dispostas em grupamentos morfológicamente característicos, tais como tira pseudoestratificada, roseta e plumagem são os principais critérios citomorfológicos utilizados na caracterização de esfregaços sugestivos de AIS. Nos casos de adenocarcinoma invasor, as células glandulares apresentam-se significativamente atípicas, podendo ser observadas em grupamentos fortemente irregulares e isoladas (células individuais atípicas preservadas) (Covell et al., 2004; Hoda & Hoda 2007).

1.4 Métodos Moleculares para a Detecção do HPV

Durante os últimos 15 anos o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologias que tem como alvo os ácidos nucléicos desses agentes. São várias as

tecnologias utilizadas para a detecção do HPV, as quais incluem os imunoenaios e os testes moleculares. As técnicas moleculares contribuem para o diagnóstico de patologias substituindo os métodos indiretos de detecção (pesquisa de anticorpos específicos) ou diretos como o cultivo e o isolamento de microorganismos, que apresentam baixa sensibilidade e demora na obtenção dos resultados (do Carmo & Fiorini 2007).

Os métodos moleculares de triagem do HPV vírus são importantes para o diagnóstico da infecção e baseia-se, principalmente, os métodos como: a captura híbrida (CH2), o *southern blot*, a hibridização *in situ*, a hibridização em fase sólida (microarrays) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Rodrigues et al., 2009, Coutlée et al., 2009).

A CH2 baseia-se na hibridização de DNA, fazendo uso de sondas específicas contra 18 tipos de HPV divididos em grupos de alto risco oncogênico que incluem os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 e os de baixo risco oncogênico que incluem os tipos 6, 11, 42, 43 e 44 (Rodrigues et al., 2009; Barra et al., 2011). Desenvolvido para prover estimativas quantitativas de carga viral, o ensaio de CH2 é um método seguro, preciso e reprodutível para detecção do HPV (do Carmo & Fiorini 2007).

A PCR baseia-se na amplificação de segmentos específicos do DNA alvo e tem potencial para a detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos, mesmo em infecções ditas não produtivas (Rodrigues et al., 2009). A detecção do HPV por PCR pode ser qualitativa indicando a presença do genoma do microorganismo ou quantitativa, a qual permite avaliar a quantidade de material genético em uma amostra biológica. Este método apresenta maior sensibilidade na detecção dos genomas virais, quando comparados com outras metodologias. Através do uso da PCR é possível detectar e identificar o material genômico dos HPVs, o que permite saber se o vírus é de alto ou baixo risco oncogênico (Do Carmo & Fiorini 2007).

Existem duas abordagens relevantes para a detecção do DNA do HPV por PCR que são as PCR de consenso e a PCR tipo específica. Os ensaios de PCR mais amplamente utilizadas usam os *primers*, GP5 + / GP6 +, MY09/MY11, e SPF, cujo alvo é uma região altamente conservada do gene L1 do HPV, amplifica numerosos tipos de HPV genital numa mesma reação. O conjunto PCR GP5 + / GP6 + consiste de dois primers que detectam uma ampla gama de HPVs em baixa temperatura de anelamento. O MY09/11 PCR, por outro lado, é sintetizado com vários nucleotídeos degenerados em cada um dos *primers*, gerando uma mistura de 25 iniciadores que são capazes de amplificar um amplo espectro de tipos de HPV (Multiplex PCR). Embora os sistemas de *primers* MY09/MY11 e GP5 + / GP6 + produzam uma prevalência quase idêntica de

HPV em um conjunto de amostras clínicas, os MY09/MY11 detectam o dobro de infecções por múltiplos tipos (Boulet et al., 2008). Os *primers* GP5+/GP6+ amplificam fragmentos de aproximadamente 150 pb (Kleter et al. 1999).

Os *primers* PGMY09/MY11 foram desenhados para melhorar a sensibilidade do sistema MY09/MY11 de todo o espectro de tipos com aumento da detecção de infecções múltiplas com melhor reprodutibilidade e especificidade (Boulet et al., 2008). Este conjunto de *primers* consiste em uma mistura de oligonucleotídeos que permitem a amplificação de um fragmento de aproximadamente 450 pb (Gravitt et al. 2000, Coutlé et al. 2002).

A PCR em tempo real (PCR-RT), por sua vez, é uma variação do método de PCR convencional (PCRc). Esta metodologia permite distinguir as sequências de bases amplificadas de DNA por análise da temperatura de separação das duplas fitas, e, como as reações ocorrem em ambiente fechado, diminui a ocorrência de contaminações. Além disso, o uso de *primers* universais permite, teoricamente, a detecção de todos os tipos de HPVs existentes (Rodrigues et al., 2009; Lefever et al., 2009). A PCR-RT permite determinar a carga viral e o estado físico (epissomal ou integrado) do DNA do HPV. A quantificação ocorre através do monitoramento do acúmulo de amplificações, utilizando iniciadores que podem ser marcados com moléculas capazes de emitir fluorescência (Mackey et al. 2002). O estado físico do DNA viral é determinado pela amplificação e quantificação dos genes E2 e E6, simultaneamente. O método leva em consideração a perda do gene E2 durante o processo de integração viral, de forma que a amplificação em grau reduzido ou total ausência de amplificação do gene E2 em relação ao gene E6 permite estimar a proporção de DNA integrado (Peitsaro et al. 2002).

A sensibilidade e a especificidade da PCR podem sofrer variações dependendo dos *primers* utilizados, do tamanho de produto da PCR, do desempenho da DNA polimerase utilizada na reação, da quantidade de DNA do HPV amplificado e da presença de inibidores (do Carmo & Fiorini 2007).

Vários métodos têm sido utilizados com o propósito de aumentar a sensibilidade de detecção do DNA do HPV e permitir sua identificação. Dentre eles destacam-se o polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) e a hibridização reversa (Molijn et al. 2005).

Uma PCR do RFLP foi desenvolvida para detecção e diferenciação sensível e de confiança de cinco tipos de HPV de baixo risco oncogênico: genótipos dos HPV 6, 11, 42, 43 e 44, bem como a diferenciação de protótipos e não protótipos de 6 variantes

genômicas. O ensaio baseia-se na amplificação de um fragmento de 320pb do gene E1 do HPV e subsequente análise dos produtos de PCR com duas enzimas de restrição BsaJI e HinFI. Este ensaio é um modelo simples e robusto, não requer equipamento sofisticado e pode ser de grande valor para estudos epidemiológicos, especialmente em ambientes em que os recursos financeiros são limitados (Maver et al., 2010).

A hibridização reversa em pontos é realizada após a amplificação por PCR de consenso. A tecnologia mais utilizada de hibridização reversa é a hibridização de sonda em linha ou ensaio line blot, que compreende várias sondas imobilizadas como linhas paralelas numa tira de membrana. Métodos de hibridização reversa são particularmente úteis para a detecção de infecções por tipos específicos e genótipos múltiplos. Alguns métodos de hibridização reversa em linha podem incluir 27-37 sondas para diferentes tipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico. A principal vantagem do sistema de detecção baseado em tira é a capacidade de detectar rapidamente e concomitantemente diferentes genótipos do HPV presentes em amostras genitais com elevada sensibilidade e especificidade, minimizando a probabilidade de erros de classificação (Gutiérrez-Xicotécatl, 2009).

A PCR é o método mais comum para tipagem do HPV, especialmente com a utilização de *primers* de consensuais e de tipagem com técnicas de hibridização reversa. Novas estratégias promissoras de detecção de HPV têm sido propostas, tais como a detecção de HPV mRNA e os ensaios de suspensão ou de fase sólida. No entanto, deverão ser rigorosamente avaliados por meio de estudos clínicos. Embora estes ensaios tenham sido desenvolvidos para a avaliação da carga viral, a integração viral e o polimorfismo molecular do HPV em estudos epidemiológicos, o seu papel na prática clínica não está definido (Coutlée et al., 2009).

1.5 Tratamento

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o tratamento das lesões clínicas deve ser individualizado, dependendo da extensão, número e localização. As lesões de baixo grau não oferecem maiores riscos, tendendo a desaparecer mesmo sem tratamento na maioria das mulheres. A conduta recomendada é a repetição do exame preventivo em seis meses. As diretrizes brasileiras recomendam, após confirmação

colposcópica ou histológica, o tratamento incisional das lesões intraepiteliais de alto grau, por meio de exérese da zona de transformação (EZT) por eletrocirurgia (INCA, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando os múltiplos envolvidos na progressão das NIC, ainda existem dúvidas acerca da história natural dessas lesões. O papel do tipo e da carga viral do HPV na gravidade da neoplasia cervical ainda são motivos de controvérsias. Adicionalmente, há indicações de que infecções por tipos de HPV com maior potencial oncogênico podem resultar em lesões graves em mulheres mais jovens, o que pode repercutir no modelo de programas de rastreamento, considerando que mulheres em maior faixa etária possuem maior probabilidade de serem portadoras de neoplasias cervicais mais graves.

Os dados de prevalência e distribuição dos diferentes tipos de HPV variam significativamente dependendo da população e região avaliada (Franceschi et al. 2006, de Sanjosé et al. 2007, Smith et al. 2007). A prevalência da infecção pelo HPV é maior em mulheres jovens, sendo maior a proporção de tipos de alto risco oncogênico, particularmente na América do Sul (Franceschi et al. 2006). A maioria das infecções é eliminada no período de um ano, porém, pouco mais de 10% persistem e aumentam o risco de neoplasia cervical. Estas se desenvolvem gradualmente até lesões pré-cancerosas que tem um risco de invasão de 30 a 50% durante o resto da vida da mulher. Embora a taxa de progressão das lesões precursoras para o câncer seja rara, a taxa de regressão das lesões em mulheres jovens e adultas infectadas com HPVs de alto risco oncogênico e que apresentam alterações citológicas leves é de apenas 37% (Frazer 2006).

Além disso, há indicações de que a presença de HPV de alto risco, com altas cargas virais, em mulheres jovens possa estar relacionada com a gravidade da neoplasia cervical. Alguns estudos têm demonstrado que cargas virais mais elevadas estão relacionadas à infecção pelo HPV 16 (Constandinou-Williams et al., 2010; Xi et al., 2011).

Neste contexto, este estudo foi realizado no intuito de melhor avaliar dados sobre a relação entre estes fatores de risco em mulheres com citologia alterada agregando informações relacionadas infecção pelo HPV no que se refere à importância de tipos específicos em relação à idade e carga viral no intuito de fomentar e ampliar a compreensão sobre a história natural das neoplasias cervicais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar os tipos específicos de HPV em diferentes grupos etários em mulheres com citologia oncológica alterada, bem como, a relação da carga viral do HPV 16 com a gravidade citológica ou histológica.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a associação entre os tipos específicos de HPV com a gravidade citológica e histológica nos diferentes grupos etários;
- Determinar a carga viral nas mulheres positivas para HPV 16;
- Avaliar a associação entre a carga viral do HPV 16 com a histológica.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo e Coleta dos Espécimes Biológicos

Estudo transversal realizado em Goiânia, Goiás incluindo 331 mulheres atendidas na rede pública de saúde por apresentarem alterações no exame de citologia oncológica. As amostras cérvico-vaginais foram obtidas de dois estudos realizados nos Hospitais Santa Casa de Misericórdia de Goiânia e Materno Infantil, que são referências na rede pública para realização de colposcopia e biópsia. O primeiro estudo foi realizado entre Fevereiro de 2007 a Janeiro de 2009 enquanto o segundo foi realizado entre Julho de 2010 a Outubro de 2011.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) dos dois hospitais (ANEXO 1). Após a aprovação nos respectivos CEPs, iniciou-se a coleta de dados nos ambulatórios, onde as mulheres foram convidadas a participar da pesquisa e esclarecidas sobre o estudo, assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 1). Antes da realização da colposcopia e quando necessário, da biópsia, foram feitas as coletas das amostras para a pesquisa, que consistiram de um segundo esfregaço cervical para realização do exame citológico e da secreção cérvico-vaginal para a realização da análise molecular. Foram excluídas do estudo as mulheres grávidas, HIV positivas ou com qualquer outra situação de imunodepressão.

As biópsias foram realizadas na presença de imagem suspeita no exame colposcópico. Mulheres com imagem colposcópica suspeita adentrando o canal cervical e aquelas com achados colposcópicos insatisfatórios e com segundo exame citológico alterado foram submetidas a coleta de material para análise molecular.

Após análise molecular, foram excluídas 58 mulheres HPV negativas. Nas 273 mulheres HPV positivas foi realizada a análise da associação entre tipos de HPV e risco de gravidade do diagnóstico citológico, por faixa etária. Foi obtido resultado do exame histológico 238 mulheres e em 202 destas mulheres foi detectado o DNA do HPV. Estas 202 mulheres foram incluídas na análise da associação entre tipos de HPV e risco da gravidade do diagnóstico histológico, por faixa etária. Deste mesmo grupo, foram selecionadas 77 mulheres HPV 16 positivas para avaliação a associação da carga viral com a gravidade do diagnóstico histológico (Figura 5).

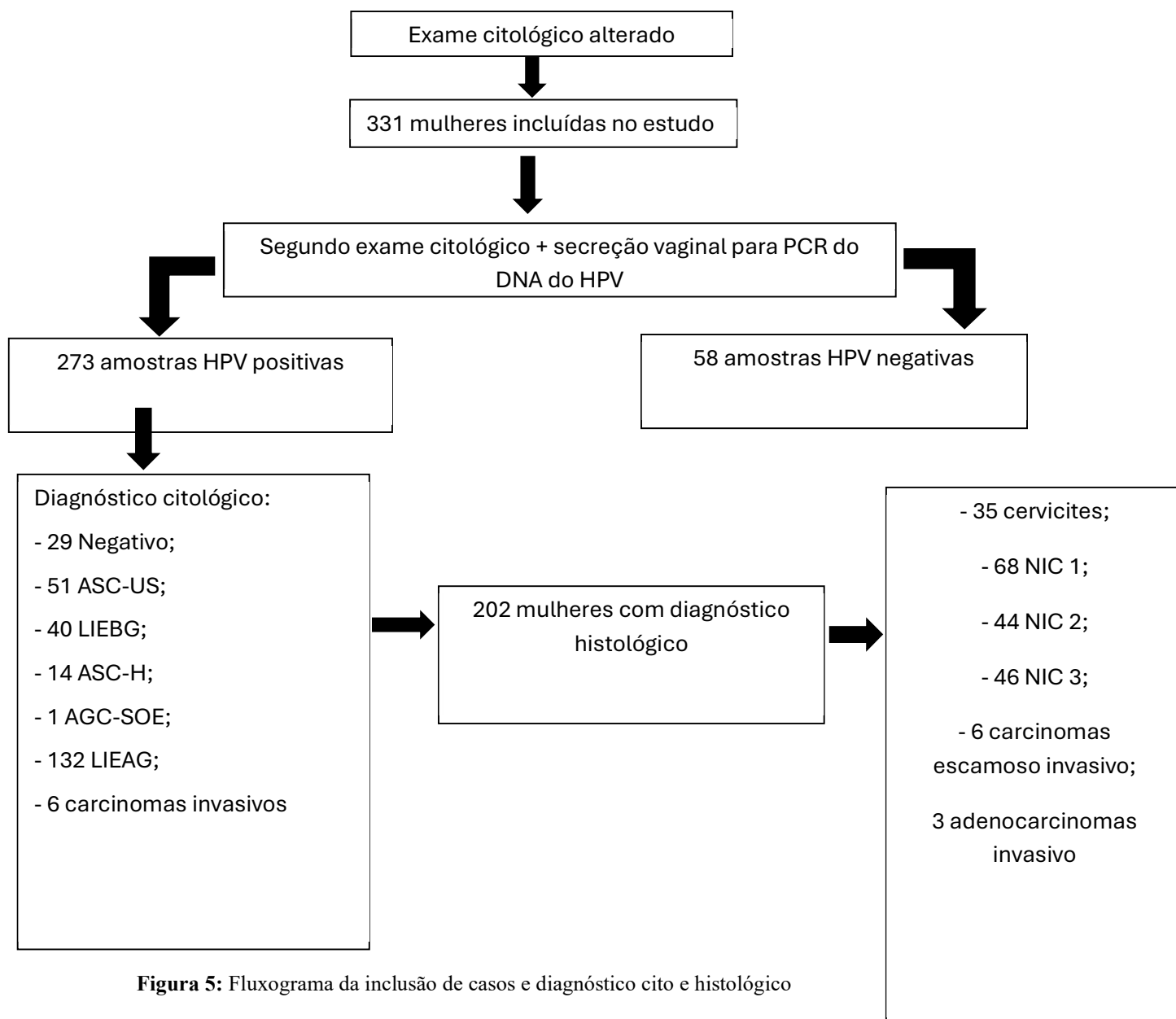


Figura 5: Fluxograma da inclusão de casos e diagnóstico cito e histológico

4.2 Exame Citológico

Os esfregaços citológicos convencionais foram analisados no Centro de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os resultados de adequabilidade das amostras e grau de anormalidades cervicais foram interpretados de acordo com o Sistema de Bethesda revisado em 2001: Normal, LIEBG, LIEAG, Células escamosas atípicas possivelmente não neoplásica (ASC-US de Bethesda), Células escamosa atípicas de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H de Bethesda), Células glandulares atípicas dem outras

especificações (AGC-SOE de Bethesda), carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma invasivo (Solomon & Nayar 2004).

4.3 Exame Colposcópico

O exame colposcópico foi realizado no ambulatório dos dois centros de coleta e classificadas segundo a Classificação Colposcópica Internacional (2002), reformulada e aceita no Congresso mundial do Rio de Janeiro da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (2011) (Quadro 1). É indicado para mulheres que apresentam alterações citológicas compatíveis com ASC-H ou mais grave no exame citológico. Durante sua realização o colo uterino é visualizado por microscópio óptico em maior aumento. Para visualizar se há ou não presença de áreas suspeitas de alterações celulares aplica-se solução de ácido acético a 5% sobre o colo do útero e em seguida uma solução de lugol a 10%. Células com alteração podem produzir excesso de proteínas e essas proteínas na presença do ácido acético precipitam. O lugol é utilizado para melhor visualização das áreas onde ocorre precipitação, uma vez que o precipitado não é corado pela solução de lugol.

4.4 Exame Histológico

Os espécimes de biópsia foram corados pela hematoxilina e eosina (HE), e o diagnóstico foi atribuído pelo patologista de acordo com a OMS (Scully et al.,1994) e classificadas como NIC 1, NIC 2, NIC 3, carcinoma escamoso invasivo ou adenocarcinoma cervical invasivo. O patologista desconhecia o diagnóstico citológico.

4.5 Detecção do HPV

4.5.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada por meio de um kit comercial cujo método se baseia na ligação seletiva do DNA a uma membrana de sílica na presença de sais caotrópicos (PureLink™, Invitrogen). Após ressuspensão por agitação em vórtex, foi transferido um volume de 200 µL do meio universal de coleta (UCM) contendo o material coletado para um tubo tipo Eppendorf ao qual foram adicionados 20 µL de Proteinase K e 20 µL de RNase. A mistura resultante foi incubada por dois minutos a temperatura

ambiente. Após esse período, foi adicionado ao material 200 µL do tampão de lise/ligação e a mistura incubada por 30 minutos a 55°C. Terminada a etapa de lise, foram adicionados 200 µL de etanol a 96%, seguido por agitação em vórtex de modo a se obter uma solução homogênea. O material lisado foi aplicado à coluna e o procedimento de purificação foi realizado de acordo com as instruções de uso do kit comercial em três etapas: ligação do DNA à coluna de sílica, lavagem para retirada de material não ligado e recuperação (eluição) do DNA ligado à coluna. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C.

4.5.2 Amplificação do DNA e genotipagem do HPV

A amplificação do DNA e genotipagem do HPV foram realizadas através do Kit Linear Array HPV genotyping test (Roche Molecular Systems, Branchburg Inc.). O DNA do HPV foi amplificado por PCR com o par de iniciadores de consenso para a região L1 PGMY09/PGMY11 marcados com biotina em um termociclador utilizando a ciclagem: 95°C por 13 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a uma temperatura de 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto; ao final, foi realizada uma extensão terminal de cinco minutos a uma temperatura de 72°C. O controle de amplificação foi feito através do par de iniciadores para o gene da β -globina GH20 e PC04 marcados com biotina. A genotipagem do HPV foi realizada metodologia de hibridização reversa: o produto da PCR foi desnaturado com uma solução de NaOH a 1,6%. Após a desnaturação, o material foi aplicado em uma tira de nylon contendo sondas imobilizadas para duas concentrações diferentes de β -globina, 18 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82 e 83) e 9 tipos de HPV de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66 e 84). A presença de híbridos na tira foi visualizada por um sistema de precipitação de cor nas linhas contendo sondas específicas para os diferentes genótipos do HPV após

a adição de um conjugado de estreptavidina-peroxidase e o respectivo substrato.

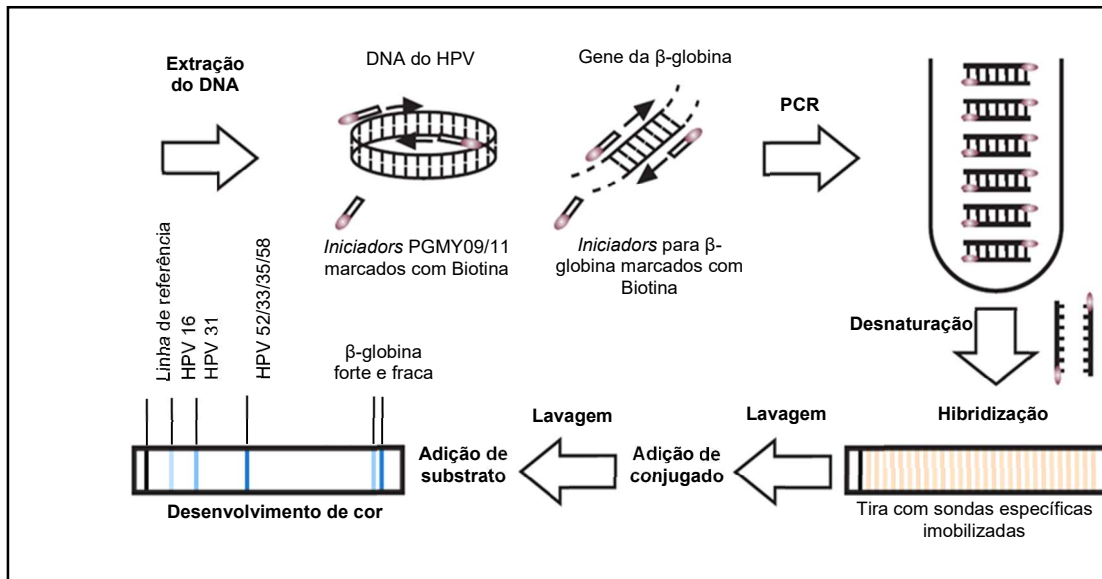


Figura 6. Representação esquemática das principais etapas envolvidas na genotipagem do HPV através da hibridização reversa do produto da PCR baseada no sistema de iniciadores PGMY09/11 marcados com biotina. Adaptado de Shepard et al. 2004.

4.6 Determinação da Carga Viral do HPV

Todas as amostras cervicais positivas na PCR (PGMY09/11) foram retestadas com protocolo de PCR quantitativa de baixa estringência para medida da carga viral em células cervicais esfoliadas (Schlecht et al., 2003). O método utiliza primers gerais (GP5, GP6) do protocolo de PCR padrão, que detecta um amplo espectro de HPVs (van de Brule et al., 1990). O protocolo da PCR quantitativa emprega condições de baixa estringência para co-amplificar um fragmento específico do DNA do HPV com sequências do DNA do genoma humano presente na mistura inicial da PCR. Os padrões consistem de misturas contendo variações do plasmídeo do HPV 16 de referência (correspondendo a 0, 4, 20, 100, 500 e 2500 cópias virais/ células) foram incluídos em duplicatas em cada ensaio adicionado para fundo constante do DNA humano normal. Em adição, amostras controles, consistiam de DNA de duas linhagens de células de carcinoma com quantidade de cópias de HPV conhecidas (HeLa, 20–40 cópias/células de HPV 18; Caski, 400–600 cópias/células de HPV 16) foram incluídas em duplicata em cada ensaio. Bandas de fragmentos no gel impregnado por prata correspondente ao DNA do HPV e ao genoma humano foram quantificadas por dessintometria. O logaritmo da relação entre estas 2 bandas é diretamente proporcional ao logaritmo da quantidade de DNA do HPV em amostras individuais (Schlecht et al., 2003).

A carga viral do HPV-16 foi avaliada por PCR em tempo real (RT-PCR), específicos para o gene E6 como previamente descrito por Schelecht et al. 2003. Amostras com número de cópias perto dos limites de detecção (50000 cópias/célula) foram diluídas e repetidas para sere melhor quantificadas. Conversão dos dados do RT-PCR para cópias por célula foi feita dividindo o número de cópias de HPV pela metade do número de cópia da beta-globina. A carga viral foi classificada como: baixa (1-10 cópias / célula), moderada (11-100 cópias / célula), alta (101-1.000 cópias / célula) e muito alta (> 1.000 cópias / célula) (Schlecht et al., 2003).

4.7 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada através do programa IBM SPSS Statistics, versão 18.0. Foi realizada análise descritiva da distribuição dos tipos de HPV, segundo o potencial oncogênico em mulheres com anormalidades citológicas e histológicas. Realizou-se análise da associação entre tipos específicos do HPV e sua relação com a gravidade dos diagnósticos citológicos e histológicos em grupos etários e também a associação da carga viral do HPV 16 com a gravidade da neoplasia cervical. Para isso foi Calculado o Odds ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

5 ARTIGOS

Artigo 1

Relationship between the incidence and genotyping of Human Papillomavirus 16/18 with cervical abnormalities by age groups

Autores:

Narriman Kennia da Silva Barros, Andrea Alves Ribeiro, Keila Patrícia Almeida de Carvalho, Vera Aparecida Saddi, Nadja Lindany Alves de Sousa, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves, Luísa Lina Villa, Silvia Helena Rabelo-Santos.

Este artigo será submetido à **Gynecologic Oncology**

Artigo 2

Association between HPV-16 viral load and severity of cervical neoplasia

Autores:

Narriman Kennia da Silva Barros, Andrea Alves Ribeiro, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves, Andrea Trevisan, Maria Antonieta Andreoli, Luísa Lina Villa, Vera Aparecida Saddi, Luiz Carlos Zeferino, Silvia Helena Rabelo-Santos.

5.1 Artigo 1

Relationship between the incidence and genotyping of Human Papillomavirus 16/18 with cervical abnormalities by age groups

Narriman Kennia da Silva Barros¹, Andrea Alves Ribeiro¹, Keila Patrícia Almeida de Carvalho², Vera Aparecida Saddi³, Nadja Lindany Alves de Sousa¹, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves⁴, Luisa Lina Villa⁵, Silvia Helena Rabelo-Santos^{1,2*}

- 1- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPSTP) Federal University of Goiás, Brazil;
- 2- School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Brazil.
- 3- Pontificia Universidade Católica de Goiás, Brazil;
- 4- Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Goiás, Brazil;
- 5- Dept. Radiology and Basic Oncology, School of Medicine of University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG): 200810267000296

Corresponding author:

*Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Faculdade de Farmácia – UFG, 1^a avenida S/N, setor Universitário.

74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

Telefone: +55 62 3209-6457; Fax: + 55 62 3209-6044

Abstract

Objectives: To detect the prevalence of HPV types 16 and / or HPV 18 between different ages groups and to evaluate the association between these parameters and the severity of cytological and histological diagnosis.

Methods: This cross-sectional study that included 331 women with cytological abnormalities detected at their referral smear. Of them, 238 women had histological results. The association of the HPV types and cytological and histologic diagnostics was compared between age groups: 1(<30), 2 (30-39), 3 (40-49), and 4 (\geq 50). HPV DNA was detected by the polymerase chain reaction (PCR) and genotyping was performed by reverse line blot hybridization assay.

Results: Cytological results were available for 331 women. Of these, it was normal in 48 (14.5%), ASC-US in 69 (20.8%), ASC-H in 23 (7%), LSIL in 43 (13%), AGC-SOE in 1 (0.3%), HSIL in 141 (42.6%) and invasive carcinoma in 6 (1.8%). Of 238 women with histological diagnoses; 51 (21.4%) were diagnosed with cervicitis, 80 (33.6%) had CIN 1, 48 (20.2%) had CIN 2, 50 (21%) had CIN 3 and 9 (3.8%) were diagnosed with invasive carcinoma. The positivity for HPV was 82.5% (273/331) in women with referral abnormal cytology. When only women with histological diagnostic were considered, the positivity for HPV was 84.9% (202/238). In relation HPV types, the positivity for HPV 16 and/or 18 was 48.7% and 48% in cytological and histological diagnostics respectively. The analysis between specific HPV types 16 and / or 18 with the cytological and histological diagnoses by age groups showed that women younger than age 30 had a higher risk of having more severe diagnosis cytology (OR: 2.12 CI 0.98 to 4.59) and histology (OR: 3.21 CI 1.21 to 8.59) than women in the same age group infected by different types of HPV.

Conclusions: The risk to develop CIN 2 or a worse lesion seems to be age and HPV genotype related. These data suggested that cervical neoplasia related to HPV 16 and HPV 18 may behave differently in the process of carcinogenesis.

KeyWords: HPV, CIN, age, cervical smear, cervical cancer.

Introduction

Cervical cancer is a significant public health problem and the association of human papillomavirus (HPV) as etiological factor is well established (1). The HPV causes squamous intraepithelial lesions (SIL) of the uterine cervix as defined cytologically, or equivalently, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) as defined (2). Though infection with HPV is common, not all HPV types will lead to cancer. The distribution of HPV types varies greatly across populations and HPV surveys have been performed in different geographical regions (3).

There are more than 40 HPV genotypes that infect the anogenital area and they are associated with a large spectrum of diseases that may vary from benign proliferation to invasive cancers (4, 5). However, 15 high-risk HPV types that have a higher propensity for the development of cervical cancer, with HPV type 16 (HPV16) and HPV18 being the most prevalent high-risk types worldwide (6, 7). However, little information is available regarding HPV genotype distribution in women from developing countries at high incidence of cervical cancer (8).

The rate of infection in young females after the onset of sexual activity is high. However, HPV infection is usually a self-limited process and does not lead to significant epithelial lesions or cancer in most cases. Nevertheless, persistent infection or multiple infections are associated with an increased risk of developing a cervical precursor or an invasive epithelial lesion (9). When age is considered, HPV infections have been found to be more frequent in younger women. Some reports described a second peak of HPV infection in women over 55 years, possibly due to latent infection (10-12).

Originally, it was thought that cervical squamous cell carcinoma would always evolve from infected normal cervical epithelium via continuum of long-lasting, consecutive CIN 1, CIN 2 and CIN 3. However, an alternative concept that finds increasing support is that within 2-3 years following infection many of the clinically relevant CIN 2/3 lesions may rapidly induced and that takes another 10-12 years to develop invasive cervical cancer. As consequence, most CIN 1 lesions and some CIN 2 lesions should not be considered as true precursor stages of cervical cancer, but rather the cytologic and histologic findings comes from studies showing that low grade CIN lesions more than incidentally harbour low risk HPV types that confer a negligible risk of progression. By contrast, some CIN 2 lesions, and CIN 3 lesions, exhibit a dramatic topographical change in viral gene expression, which includes an increase in E6/E7 expression in proliferating dysplastic cells (13).

Recent data showed that HPV 16 infections in young women can lead to CIN 3 formation very quickly and questioned to common assumption that invasive cervical cancer develops through slowly progressing pre-cancer lesions, CIN 1, CIN 2 and CIN 3. Data of the study with 764 women with positive cytology or histology suggest that there is a genotype specific natural history of cervical cancer precursors development. One type, more frequent, HPV 16/18 related, which develops quick and early in life of high grade lesions; another one, non-16/18 high-risk HPV related, which develops later, slowly, through low-to high-grade lesions (14).

Einstein et al. (15) observed a prevalence of the CIN or worse diagnostic in subjects with positive for HPV 16 and/or 18 was greater in women with <30 years of age than in women with ≥ 30 years and increased of the 4-fold (17.1% vs. 4%) in risk of CIN2 or worse diagnostic for subjects with ASC-US cytology who were positive for HPV types 16 and/or 18 when compared with no 16/18 high-risk. In addition, factors associated with CIN 2 regression and progression to CIN 3 were correlated with HPV persistence, specifically HPV 16/18 infections (16).

In light of these considerations, the aim of this study was to evaluate the prevalence of HPV types 16 and / or HPV 18 between different age groups and to evaluate the association between these parameters and the severity of cytological and histological cervical changes.

Materials and methods

Study Population and Sample Collection

This cross-sectional study included 331 women with cytological abnormalities detected at their referral smear. The mean age of the 331 women included in this study was 32.9 years and the median was 30 years (min = 14; max = 75). The Institutional Review Board approved the study protocol, and all participants gave written informed consent before their entry into the study. Cytological and HPV positive test results were available in 273 women and histological and HPV positive test results were available in 202 women. The association of the HPV types and cytological and histological diagnostic was compared between four age groups: <30, 30-39, 40-49, and ≥ 50 .

Following enrollment, all patients underwent colposcopy, and a second cervical smear with endocervical sampling was carried out at the first study visit. Punch biopsy was performed whenever a suspicious colposcopic image with complete visualization was identified. Women with a diagnosis of CIN 2, 3 were submitted to

cervical conization and those with a diagnosis of cervical cancer were referred for specialized treatment. Women with a suspicious image penetrating the cervical canal and those in whom colposcopy findings were unsatisfactory and in addition had an abnormal second cervical smear also were submitted to cervical conization.

Analysis of the second cervical smear

Conventional cervical smears were classified as follows: normal findings, low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), Atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H), atypical glandular cell not otherwise specified (AGC-SOE) and invasive carcinoma (17).

Histology

Biopsy specimens were stained with hematoxylin and eosin (HE) reviewed according to the World Health Organization (WHO) criteria and classified as: cervicitis, CIN 1, CIN 2, CIN 3, invasive squamous carcinoma or invasive cervical adenocarcinoma (18). All the histological analyses were carried out in a pathology laboratory and in all cases diagnosis was made by the same pathologist that unknown the cytological diagnosis.

Sample processing, DNA extraction and detection and genotyping of HPV.

The samples were processed and DNA was extracted from cervical smears as previously described by Ribeiro et al. (19). DNA was amplified using PGMY09/11 HPV specific primers that amplify the 450-bp fragment of the L1 open reading frame of genital HPV. HPV DNA genotyping was performed using a reverse line blot hybridization assay, which involved the hybridization of a 450-bp PCR amplicon generated by the PGMY primer set to a nylon strip containing immobilized probes. The strip contained 2 levels of β -globin control probes, 18 HR-HPV probes (HRHPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, and 83) and 9 low-risk HPV probes (low-risk-HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, and 84). The 100 μ L volume of the amplification mixture contained 4mM of MgCl₂, 50mM of KCl, 7.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 200 mM each of deoxyadenosine triphosphate, deoxycytosine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, 600 mM of deoxyuridine triphosphate, 100 pmol of each biotinylated PGMY09/PGMY11 primer pool, and 2.5 pmol each of 50 biotinylated β -globin primers, GH20 and PCO4. The following amplification profile was used: activation of AmpliTaq Gold for 13 minutes at 95°C, denaturation for 1 minute at

95°C, annealing for 1 minute at 55°C, extension at 72°C for 1 minute for a total of 40 cycles, followed by a 5-minute terminal extension step at 72°C. Amplicons were denatured in 0.4N NaOH and 40 mL of the denatured product were reacted in 3mL of hybridization buffer with a reverse line blot containing HPV genotypes and β -globin probe at 2 concentrations immobilized on nylon strips. Positive hybridization was viewed by streptavidin-horseradish peroxidase-mediated color precipitation on the membrane at the probe line. In specimens that were considered as HPV-negative, the 2 globin lines (high and low copies) appeared at levels comparable with positive controls, or were repeated until the criteria for globin positivity were reached.

Statistical analysis

A descriptive analysis of the distribution of HPV types, according to the oncogenic potential in women with abnormal cytology and biopsy. Analysis of the association between specific types of HPV and severity of cytological and histological diagnoses in age groups was assessed by calculating odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (CI). A probability value < 0.05 is considered statistically significant.

Results

Cytological results were available for 331 women. Of these, it was normal in 48 (14.5%), ASC-US in 69 (20.8%), ASC-H in 23 (7%), LSIL in 43 (13%), AGC-SOE in 1 (0.3%), HSIL in 141 (42.6%) and invasive carcinoma in 6 (1.8%) (Table 1). Of 238 women with histological diagnoses; 51 (21.4%) were diagnosed with cervicitis, 80 (33.6%) had CIN 1, 48 (20.2%) had CIN 2, 50 (21%) had CIN 3 and 9 (3.8%) were diagnosed with invasive carcinoma. The positivity for HPV was 82.5% (273/331) in women with abnormal cytology. When only women with histological diagnostic were considered the positivity for HPV was 84.9% (202/238) (Table 2). In relation HPV types, the positivity for HPV 16 and/or 18 was 48.7% and 48% in cytological and histological diagnostics respectively (data no show).

Descriptive statistics (mean, min and max) for age at entry women study were tabulated according to cytology and histology and genotype status. Patients were then divided into four sub-groups on the basis of cytopathology and pathology results and HPV genotype status. $< \text{HSIL} / < \text{CIN 2 HPV16 and/or 18 positive}$, $\geq \text{HSIL} / \geq \text{CIN 2 HPV 16 and/or 18 positive}$, $< \text{HSIL} / < \text{CIN 2 HPV positive but HPV 16 and or 18 negative}$, and $\geq \text{HSIL} / \geq \text{CIN 2 HPV positive but HPV 16 and/or 18 negative}$ (Table 3).

The distribution of cytological results of women positive for HPV 16 and/or HPV 18 and women positive for other HPV types according to age groups showed that the diagnostic of the HSIL or worse was more prevalent in higher age groups, regardless of the type of HPV involved in the infection and the analysis between specific HPV 16 and/or 18 with cytological diagnoses showed that women younger than age 30 had a higher risk of having more severe diagnosis cytology (OR: 2.12 CI 0.98 to 4.59) than women in the same age group infected by different types of HPV (Table 4)

Considering the histological diagnoses, women positive for HPV 16 and/or HPV 18 and women positive for other HPV types according to age groups showed that in women HPV 16 and/or 18 positive, the diagnosis of CIN 2 or more severe lesion was the most prevalent in the age groups, including women <30 years. In the group of women and HPV 16 and/or 18 negative, the profile of the prevalence of CIN 2 or more severe lesion was similar to that reported for cytological diagnosis. The analysis between specific HPV 16 and/or 18 with histological diagnoses also showed that women younger than age 30 had a higher risk of having more severe diagnosis histological (OR: 3.21 CI 1.21 to 8.59) than women in the same age group infected by others HPV types (Table 5).

Discussion

The results of this study suggest that the risk of CIN 2 or a worse diagnosis is age and HPV genotype related. These findings lend support to the suggestion that differences in HPV type may indeed correlate with differences in biological potential and risk for cytological diagnoses more severity especially in younger women. Furthermore, this suggests that there are undefined differences in the transformation- related changes associated with HPV types other than HPV 16 or HPV18.

This finding is similar to the data reported by Sideri et al. (14) that observed that younger women positive to HPV 16 and 18 are at higher risk of developing CIN 2 or more severe when compared with women in higher age infected for other HPV types. Einstein et al. (15) also noted that high-risk HPV positive women for HPV 16 and / or 18, the absolute risk of diagnosing CIN 2 was 17.1% compared to 4% women with high-risk HPV positive for other HPV types ($p = 0.001$).

In line with this study, in patients with CIN 3, Sigurdsson et al. (20), also reported a markedly higher prevalence of HPV16 in women under 35 years of age compared to women older than 35. Castle et al. (21) investigating the risk of CIN 2 or worse diagnostic development in relation to HPV genotype persistence, found that,

among women aged <30, the 3-year cumulative incidence of CIN 2 or worse was 7.1% in those who tested positive twice for carcinogenic HPV genotypes other than HPV 16 and 18 and 28.8% in subgroup of women with confirmed persistence of specific HPV genotypes.

In addition, in study conducted by Sideri et al. (22), a series of the 286 invasive cervical cancers cases showed a statistically significant difference in age between HPV 16 and/or 18 positive and high-risk HPV 16/18 positive and negative patients. Stoler et al. (23) in testing with individual HPV-16/HPV-18 genotyping in women 21 years or older with ASC-US observed that the absolute risk for CIN 2 or worse was greatest among women who were HPV-16 positive when compared to those that were positive by other HPV types. In this same study, the relative risk for CIN 2 or worse among women who were HPV 16 positive was 42.0 (95% CI, 20.1-87.5) compared with women who were high-risk HPV negative (14 types) and 3.7 (95% CI, 2.4-5.7) compared with women who were positive for the 12 other high-risk HPV (excluding HPV 16 and HPV 18) (23).

Data suggest that high-risk HPV infections were strongly associated with invasive cancer and HSIL, especially for HPV 16 and 18 (24). HPV 16 together with HPV 18 is the most prevalent among women, even in the absence of cervical disease. Besides being the most common, there is a hypothesis that is reinforced by the findings of this study that HPV 16 and / or 18 diseases were originated earlier compared to others HPV types. This takes place by the fact that HPV 16 has a unique capability to evade the immune system which would result in higher persistence of HPV 16 infections than with other HPV types (14). The HPV 16/18 persistence was related with risk of 20 fold risk of in study of adolescents of 13-24 years old referred for abnormal cytology (16). Authors believe that the relationship between types 16, 18 and CIN occurring in early life infections while in other types of high-risk precursor lesions arise later (25, 14).

In fact, HPV 16 merits individual consideration because it is more potent carcinogen than the other HPV types (26). Brotherton et al. (26) showed that HPV 16 is more common in young than old women with high-grade cervical lesions and emphasized that this finding was consistent with all but one out of eighteen studies identified in the literature.

The risk to develop CIN 2 or worse diagnostic seems to be age and genotype related. These data suggested that in fact cervical neoplasia related to HPV 16 and HPV

18 may behave differently in the process of carcinogenesis when compared to cervical neoplasia related to others HPV types.

References

1. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Pretet J-L, Birembaut P, Clavel C. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int. J. Cancer* 2007; 121: 2198–2204.
2. Lax S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. *Acta Dermatoven APA* 2011; 20(3): 125-133.
3. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121(3):621-32.
4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 518-527.
5. Mejhede N, Bonde J, Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS* 2009; 117(2): 108-114.
6. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24(3): 26-34.
7. Juckett G, Hartman-Adams H. Human Papillomavirus: Clinical manifestations and prevention. *American Family Physician* 2010; 82(10): 1209-1214.
8. World Health Organization (WHO) (2010) WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. Human Papillomavirus and Related Cancers in Kenya. Summary Report 2010. World Health Organization.
9. Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I, Lorincz A, Chan WK, Krausz T, Soutter P. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999; 81(3): 554-8.
10. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, McGoogan E, Menon U, Terry G, Edwards R, Brooks C, Desai M, Gie C, Ho L, Jacobs I, Pickles C, Sasieni P. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003; 362(9399): 1871-6.

11. Herrero R, Hildeshwin A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, Balmaceda I, Greenberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M, Schiffman M. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 464-474.
12. Miranda PM, Pitol BCV, Moran MS, Silva NNT, Felix PM, Lima-Filho JL, Carneiro CM, Silva IDC, Carvalho RF, Lima AA, Beçak W, Stocco RC. Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. *Genetics and Molecular Research* 2012; 11(2): 1752-1761.
13. Snijders PFJ, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Journal of Pathology* 2006; 208: 152-164.
14. Sideri M, Igidbashian S, Boveri S, Radice D, Casadio C, Spolti N, Sandr MT. Age distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology* 2011; 121: 510-513.
15. Einstein MH, Garcia FAR, Mitchell AI, Day SP. Age-stratified performance of the cervical HPV 16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology. *Cancer research* 2011; 20(6): 1185-1189.
16. Moscicki A-B, MD1, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, Shiboski S. Rate of and Risks for Regression of CIN-2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol* 2010; 116(6): 1373-1380.
17. Solomon D, Nayar R 2004. *The Bethesda system for Reporting Cervical Cytology*, Springer-Verlag, New York, p. 1-190.
18. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ, editors. 1994. *Histological typing of female genital tract tumors*. In: World Health Organization. *International histological classification of tumors*. 2nd edition. Berlin: Springer-Verlag, Inc. pp 36-49.
19. Ribeiro AA, Alves RRF, Costa MC, Villa LL, Zeferino LC, derchain SFM, Carneiro MAS, Rabelo-Santos SH. Association between HPV types and species groups and cervical neoplasia from a high-risk area for Cervical Cancer, Goiânia, Brazil. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30(3): 288-94.
20. Sigurdsson K, Taddeo FJ, Benediksdottir KR, Olafsdottir K, Sigvaldason H, Oddsson K, Rafnar T. HPV genotypes in CIN2-3 lesions and cervical cancer: a population-based study. *Int J Cancer* 2007; 121: 2686-7.

21. Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, Morales J, Guillen D, Sherman ME, Solomon D, Schiffman M; Proyecto Epidemiológico Guanacaste (PEG) Group.. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ* 2009; 339:b2569.
22. Sideri M, Cristoforoni P, Casadio C, Boveri S, Igidbashian S, Schimitt M, Gheit T, Tommasino M. Distribution of human papilloma virus genotypes in invasive cervical cancer in Italy: a representative, single institution case series. *Vaccine* 2009; 27(1): A30-3.
23. Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Apple R, Gutkunst K, Wright TL ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) HPV Study Group*. High-Risk Human Papillomavirus Testing in Women With ASC-US Cytology. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 468-475.
24. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Modern Pathology* 2007; 20: 167-174
25. Coupè VMH, Berkhof J, Bulkman NWJ, Snijders PJF, Meijer CJLM. Age-dependent prevalence of 14 high-risk HPV types in the Netherlands: implications for prophylactic vaccination and screening. *Br J Cancer* 2008; 98: 646-651.
26. Brotherton JM, Tabrizi SN, Garland SM. Does HPV type 16 or 18 prevalence in cervical intraepithelial neoplasia grade 3 lesions vary by age? An important issue for postvaccination surveillance. *Future Microbiol* 2012; 7(2):193-9.

Table 1: Distribution of the cytological diagnosis in women referred for abnormal cervical smear

ASC-US: Atypical squamous cells of undertermined significance; LSIL: Low squamous intraepithelial lesion; AGC-SOE: Atypical glandular cells not otherwise specified; ASC-H: Atypical squamous cells

	Cytological diagnosis		HPV positive	
	n	%	n	%
Negative	48	14.5	29	60.4
ASC-US	69	20.8	51	73.9
LSIL	43	13	40	93
AGC-SOE	1	0.3	1	100
ASC-H	23	7	14	60.9
HSIL	141	42.6	132	93.6
Invasive carcinoma	6	1.8	6	100
Total	331	100	273	82.5

cannot exclude HSIL; HSIL: High squamous intraepithelial lesion; Invasive carcinoma: including squamous and glandular origin).

Table 2: Distribution of the histological diagnosis in women referred for abnormal cervical smear

	Histological diagnosis		HPV positive	
	N	%	n	%
Cervicitis	51	21.4	35	68.6
CIN 1	80	33.6	68	85
CIN 2	48	20.2	44	91.7
CIN 3	50	21	46	92
Invasive carcinoma	9	3.8	9	100
Total	238	100	202	84.9

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; Invasive carcinoma: including squamous and glandular origin

Table 3: Summary statistics of age (Years) by histology, citology and genotype

Citological diagnosis	n	Mean	Min, Max
<HSIL			
HPV 16 and/or 18	45	25.7	14, 52
Others HPV types	75	26.7	15, 53
Total	120	26.5	14, 53
≥HSIL			
HPV 16 and/or 18	88	38.2	15, 75
Other HPV types	65	36.3	17, 62
Total	153	37.4	15, 75
Histological diagnosis	n	Mean	Min, Max
<CIN2			
HPV 16 and/or 18	37	33.3	14, 60
Other HPV types	66	31.9	18, 53
Total	103	32.4	14, 60
≥CIN2			
HPV 16 and/or 18	60	36.8	17, 75
Other HPV types	39	36.4	16, 62
Total	99	36.7	16, 75

HSIL: High squamous intraepithelial lesion; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; ≥ HSIL= AGC-SOE, ASC-H, HSIL; invasives carcinomas (including squamous and glandular origin); < HSIL= negative, ASC-US and LSIL; ≥ CIN 2= CIN2, CIN3 and invasives carcinomas; < CIN2= cervicite e and NIC1; Other HPV types: No HPV 16/18

Table 4: Association between HPV types and cytological diagnosis by age groups

Age groups	HPV types	N° of patients	Cytological diagnosis		OR (CI)	<i>p</i>
			≥HSIL n (%)	<HSIL n (%)		
<30	16/18	58	27 (46.5%)	31 (53.6%)	2.12 (0.98-4.59)	0.03
	Others types	79	23 (29.1%)	56 (70.9%)		
30-39	16/18	35	23 (65.7%)	12 (34.3%)	1.39 (0.41-4.23)	0.6
	Others types	27	16 (59.3%)	11 (40.7%)		
40-49	16/18	20	19 (95%)	1 (5%)	5.59 (0.53-139.85)	0.1
	Others types	22	17 (77.3%)	5 (22.7)		
≥50	16/18	20	19 (95%)	1 (5%)	6.33 (0,46-183.84)	0.1
	Other types	12	9 (75%)	3 (25%)		

HSIL: High squamous intraepithelial lesion; ≥ HSIL= AGC, ASC-H, HSIL, invasives carcinomas; < HSIL= negative, ASC-US and LSIL; Other types = High risks HPV no HPV 16and/or 18.

Table 5: Association between HPV types and histological diagnosis by age groups

Age groups	HPV types	N° of patients	Histological diagnosis		OR (CI)	<i>p</i>
			≥CIN2	<CIN2		
			n (%)	n (%)		
<30	16/18	37	22 (59.5%)	15(40.5%)	3.21 (1.21-8.59)	0.008
	Others types	51	16 (31.4%)	35 (68.6%)		
30-39	16/18	28	15 (53.6%)	13 (46.4%)	1.79 (0.51-6.43)	0.3
	Others types	23	9 (39.1%)	14 (60.9%)		
40-49	16/18	16	11 (68.7%)	5 (31.5%)	3.3 (0.68-16.92)	0.08
	Others types	20	8 (40%)	12 (60%)		
≥50	16/18	16	12 (75%)	4 (25%)	2.5 (0.37-17.95)	0.3
	Other types	11	6 (54.5%)	5 (45.5%)		

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; ≥ CIN 2= CIN2, CIN3 and invasives carcinomas; < CIN2= cervicite e and NIC1; Other types= High risk HPV no HPV 16 and/or 18.

5.2 Artigo 2

Association between HPV-16 viral load and severity of cervical neoplasia

Narriman Kennia da Silva Barros¹, Andrea Alves Ribeiro¹, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves², Andrea Trevisan^{3,4}, Maria Antonieta Andreoli⁴, Luísa Lina Villa⁴, Vera Aparecida Saddi⁵, Luiz Carlos Zeferino⁶, Silvia Helena Rabelo-Santos^{1,7*}

1- Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil;

2- Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Goiás, Brazil;

3- Laboratoire de santé publique du Québec, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canadá.

4- Dept. Radiology and Basic Oncology, School of Medicine of University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

5- Pontificia Universidade Católica de Goiás, Brazil;

6- Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil;

7- School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Brazil

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG): 200810267000296

Corresponding author:

*Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Faculdade de Farmácia – UFG, 1^a avenida S/N, setor Universitário.

74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

Telefone: +55 62 3209-6457; Fax: + 55 62 3209-6044

Abstract

Background: Studies have indicated an increased HPV-16 viral load according to the severity of cervical disease. The objective of this study was to evaluate the association between HPV-16 viral load and severity of cervical neoplasia.

Methods: Seventy seven women previously tested for HPV-16 DNA were selected. Considering the cytological diagnosis, 27.3% (21/77) had <HSIL (Negative, ASC-US and LSIL) diagnosis and 72.7% (56/77) had \geq HSIL (ASC-H, HSIL and invasive carcinoma) diagnosis. The < CIN 2 (Cervicitis, CIN 1) diagnosis was observed in 36.4% (28/77) of the cases and \geq CIN 2 (CIN 2, CIN 3 and invasive carcinoma) diagnosis was observed in 63.6% (49/77) of the cases. The HPV-16 viral load was assessed by Real-Time PCR (RT-PCR) targeting E6 gene. Viral load was categorized as: low (1–10 copies/cell), moderate (11–100 copies/cell), high (101–1,000 copies/cell) and very high (>1,000 copies/cell). The association between moderate or higher viral loads and cytological and histological results was analyzed based on odds ratios (ORs) with 95% confidence interval (CI).

Results: Low viral load were detected in 66.7% (14/21) of women with < HSIL diagnosis and 30.4% (17/56) of women with \geq HSIL diagnosis. Moderate, high and very high viral load was observed in 33.3% (7/21) of women with <HSIL diagnosis and in 69.6% (39/56) of women with \geq HSIL diagnosis. Low viral load was observed in 67.9% (19/28) of women diagnosed with < CIN 2 lesions and 24.5% of women diagnosed with \geq CIN 2 lesions. Moderate, high and very high viral load was detected in 32.1% (9/28) of women with < CIN 2 diagnosis and 75.5% (37/49) of women with \geq CIN 2 diagnosis. A diagnosis of HSIL or worse diagnosis (OR 4.59; 95% CI: 1.4-15.49; p= 0.004) and high-grade neoplasia (\geq CIN2) (OR 6.51; 95% CI: 2.9- 20.92; p = 0. 0002) were significantly associated with moderate, high and very high viral load.

Conclusions: Moderate, high and very high viral loads were associated with severity of cytological or histological cervical neoplasia in this subset of women.

Keywords: HPV, viral load, PCR, CIN, invasive carcinoma.

Introduction

Cervical cancer is the second most common malignancy in women worldwide, and contributes to 9.8% of all female cancers. There are 15 high-risk HPV types that have a higher propensity for the development of cervical cancer, with HPV type 16 (HPV16) and HPV18 being the most prevalent high-risk types worldwide [1].

Several studies have reported a correlation between viral load and severity of neoplasia [2-6]. Most studies of HPV viral load have focused on high-risk HPV types associated with CIN of grade 2 and 3 and cancer [7]. However, the information about viral load is principally related to HPV16. In fact, high HPV-16 viral loads have been associated with CIN 2 and 3 in case-control studies or with progression to CIN 2, CIN 3 or carcinoma *in situ* in prospective studies [8, 9].

Tábora et al [10] noted that the effect of high-risk types of HPV DNA infection on CIN development is highly influenced by viral number copies. In addition, Woodman et al., [11] observed that among women who tested positive for high risk HPV types the cytological abnormality is more common in those with a high viral load than in those with a low viral load. Furthermore, viral load has been suggested as a marker of no transient infection, and high HPV load in smears with normal cytology has been associated with the risk of developing dysplasia and carcinoma *in situ* [12, 2].

On the other hand contradictory data have also been generated. Andersson et al [13] not observed significant difference determined between the mean values of the viral load in the different grades of CIN. Also, Onan et al [14] observed that HPV positivity was increased significantly by the degree of lesions, however, this relation was not observed for viral load.

In light of these considerations, the aim of this study was to evaluate the association between HPV-16 viral load and histological diagnosis of cervical neoplasia in women referred to colposcopy due to an abnormal cervical smear.

Materials and Methods

Study subjects.

This cross-sectional study conducted in the hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia of February 2007 to January 2009. A group of 77 HPV 16 positive women were selected from the original study [15] for analysis of viral load. The mean age of the 77 women included in this study was 35.45 years and the median was 33 years (min = 14;

max = 75). The Institutional Review Board approved the study protocol, and all participants gave written informed consent before their entry into the study.

Women were considered eligible for the study if they fulfilled all the following requirements: (a) age between 14 and 75 years; (b) having an intact uterus (ie, no earlier surgical procedures on the uterus or cervix); (c) a history of abnormal cervical smear tests in the past year; (d) were not currently undergoing treatment for genital condyloma (external or cervical); (e) had abstained from sexual intercourse in the 3 days preceding consultation; and (f) had no confirmed or clinically suspected immunosuppression (induced by human immunodeficiency virus, corticosteroids, chemotherapy, or any other chronic disease that could affect the immune system).

At colposcopy, a cervical sample was taken for a second conventional smear using a cervical brush, and the material was stored in 1.0mL Universal Collection Medium (QIAGEN Sample & Assay Technologies, Brasil) for HPV-DNA testing.

Biopsies were taken from any colposcopically abnormal area. Women with a suspicious image penetrating the cervical canal and those in whom colposcopy was unsatisfactory and a second cervical smear was abnormal were submitted to cervical conization. Women with invasive carcinomas were treated according to appropriate clinical guidelines.

Sample processing, DNA extraction and detection and genotyping of HPV.

The sample processing and DNA extractions from cervical smears was done as previously described [15]. DNA was amplified using PGMY09/11 HPV specific primers that amplify the 450-bp fragment of the L1 open reading frame of genital HPV. HPV DNA genotyping was performed using a reverse line blot hybridization assay, which involved the hybridization of a 450-bp PCR amplicon generated by the PGMY primer set to a nylon strip containing immobilized probes. The strip contained 2 levels of β -globin control probes, 18 HR-HPV probes (HRHPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, and 83) and 9 low-risk HPV probes (low-risk-HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, and 84).

The 100 mL volume of the amplification mixture contained 4mM of $MgCl_2$, 50mM of KCl, 7.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 200 mM each of deoxyadenosine triphosphate, deoxycytosine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, 600 mM of deoxyuridine triphosphate, 100 pmol of each biotinylated PGMY09/PGMY11 primer pool, and 2.5 pmol each of 50 biotinylated β -globin primers, GH20 and PCO4. The following amplification profile was used:

activation of AmpliTaq Gold for 13 minutes at 95°C, denaturation for 1 minute at 95°C, annealing for 1 minute at 55°C, extension at 72°C for 1 minute for a total of 40 cycles, followed by a 5-minute terminal extension step at 72°C. Amplicons were denatured in 0.4N NaOH and 40 mL of denatured product were reacted in 3mL of hybridization buffer with a reverse line blot containing HPV genotypes and β -globin probe at 2 concentrations immobilized on nylon strips. Positive hybridization was detected by streptavidin-horseradish peroxidase-mediated color precipitation on the membrane at the probe line. In specimens that were considered as HPV-negative, the 2 globin lines (high and low copies) appeared at levels comparable with positive controls, or were repeated until the criteria for globin positivity were reached.

HPV Viral load

All cervical specimens found to be positive for HPV 16 were retested by a quantitative, low-stringency PCR to evaluate viral load in cervical cells as previously described [3].

The viral load was determined using the HPV16 copy number (RT-PCR targeting HPV16 E6 open reading frame) normalized according to the number of cells (RT-PCR targeting the albumin gene). Conversion of RT-PCR data to copies per cell was done dividing HPV copy number by half beta-globin copy number. Viral load was categorized as: low (1–10 copies/cell), moderate (11–100 copies/cell), high (101–1,000 copies/cell) and very high (>1,000 copies/cell) [3].

Citopathology

Conventional cervical smears were classified as follows: normal findings, low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), Atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H), and invasive carcinoma [16].

Histopathology

Biopsy specimens were stained with hematoxylin and eosin (HE) revised in accordance with World Health Organization (WHO) criteria [17] and classified as: cervicitis, CIN 1, CIN 2, CIN 3, invasive squamous carcinoma or invasive cervical adenocarcinoma. All the histological analyses were carried out in a pathology laboratory and in all cases diagnosis was made by the same pathologist.

Statistical analysis

Normalized viral load was calculated the HPV copy number by the β -globin copy number (based on 2 β -globin copies per cell) and was expressed as copies of virus per

cell equivalent according to the formula: viral load (HPV copies/cell)= Number of HPV copies/ Number of β -globin copies/2 [3]. A probability value < 0.05 is considered statistically significant. The magnitude of the associations between HPV16 DNA viral load with severity of cervical neoplasia was assessed by calculating odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (CI).

Results

The distribution of the cytological diagnosis is represented of the table 1. The HSIL diagnosis was more prevalent. The negative results were diagnosed in 7.8% of the cases, 7.8% of women had LSIL, 11.6% had ASC-US, 2.6% had ASC-H and 5.2% had invasive carcinoma (Table 1). Considering histological diagnosis, 12.9% (10/77) of HPV16 positives women had negative histological results, 23.5% (18/77) had CIN1, 27.3% (21/77) were diagnosed with CIN2, 25.9% (20/77) had CIN3 and 10.4% (8/77) had invasive carcinoma histological results (Table 2).

The distribution of the viral load in cytological diagnosis and histological is represented in the table 3 and table 4. Lower viral load were observed in the majority of women with negative and ASC cytological results (table 3). Higher viral load were finding in women with LSIL, HSIL and invasive carcinoma cytological diagnosis. Low viral load were more prevalent in the women with lesions classified as cervicitis (70%) and, CIN 1 (66.6%). Moderate, high and very high viral load were more prevalent women with diagnosis of CIN 2, CIN3 and invasive carcinomas, including squamous and glandular origin (table 4).

A diagnosis of HSIL or worse diagnosis (OR 4.59; 95% CI: 1.4-15.49; $p= 0.004$) and high-grade neoplasia (\geq CIN2) (OR 6.51; 95% CI: 2.9- 20.92; $p = 0.0002$) were significantly associated with moderate, high and very high viral load in women infected by HPV 16.

Discussion

Moderate, high and very high viral load of HPV 16 were associated with severity of cervical neoplasia in this subset of women. It is believed that viral load reflects the productivity of HPV replication and its level may play a role in defining the course of HPV infection (19). Previous studies have been indicated that a high HPV 16 load is

associated with persistent infection and consequently with the development of \geq CIN 2 lesions [2, 18-21].

Morberg et al., [4] indicated that the increase of viral load of HPV 16 in cervical smears also increases the risk of future invasive cervical cancer. Briolat et al, [22] in 120 HPV 16 positive samples, observed that women without any lesion at histology or with CIN1 were found to have lower HPV 16 viral loads than women with CIN 2 or worse diagnostic ($p=0,011$). Xi et al.,[20] in case-control study found that elevation in HPV 16 DNA load was associated with an increased risk of CIN 3. All these results confirm those of other studies that suggest that among HPV 16 positive women, those with higher, compared with lower, viral load are more likely to progress to high-grade CIN [12, 4, 23, 24].

On the other hand, Wensveen et al [25] in a cohort study with women with ASCUS/AGUS cytology, observed that there was a marked association between viral load and the underlying CIN at enrollment. However, there was large overlapping of viral loads among the grades of CIN. These authors indicated that viral load is not a useful parameter to predict high-grade lesions in women with ASCUS/AGUS cytology. Similarly, Boulet et al, [26] in retrospective case-control study assessed HPV 16 viral load and E2/E6 ratio as risk markers for CIN ≥ 2 lesions in HPV 16 positive women and showed a significantly higher HPV 16 load in the case group. However, this was completely attributable to the high viral load of samples with invasive carcinoma as histologic endpoint since, there was no significant difference in viral load between the other histologic groups.

The association between the viral load and the different phases of disease is still debated. Several authors have shown that an elevated HPV16 viral load is associated with high-grade cervical lesions [27] and a 43-fold increased risk of cancer has been reported for high viral load [28]. However a viral load higher in LSIL than in HSIL and HSIL lower than carcinoma has also been reported [29]. In this study, although higher viral load had been associated with severity of neoplasia, 12 of 49 women (24.5%) diagnosed with CIN2 or more severe lesion had low viral load.

The reduction in the number of viral copies could be explained by disruption of viral E1/E2 genes during the integration of viral genome into cellular DNA. The frequency of viral integration seems to increase with the severity of disease, and then potentially correlated with progression to cervical cancer [3]. van Duin et al. [2] observed an association between CIN2/3 and viral load 0-12 months before diagnosis, but not 13-

24 months before. This suggests that a sufficiently higher viral load might signal the development of CIN3 as an early outcome following a newly detected HPV16 infection. For those with initially relatively low viral load, a sustained productive infection period is under way that permits the virus to replicate, produce a sufficient amount of oncoproteins, and eventually lead to the development of CIN3. But it is also possible that the growth of a small CIN3 clone could be causing, instead, increasing viral load that we assessed on cytologic specimens [22].

High HPV viral load has been shown to be associated with HPV infection persistence and cervical malignancies [30]. However the association between HPV load and persistence seems to be not uniform across high-risk HPV types and seems that only HPV 16 viral load has yet been demonstrated to predict the development of incident disease [2,19,21,30]. In fact, HPV 16 infection has demonstrated more likely to persist and HPV 16 positive patients are also more likely to develop cervical intraepithelial neoplasia [31].

High-risk HPV viral load has been suggested as type-dependent risk marker for cervical cancer in several studies where high viral loads were associated with severity of cervical neoplasia [2,4,12,19,21]. However, others studies did not observed this association [11,22,26]. There are indications that viral load could be a marker for early detection or prediction of high-grade cervical lesions and invasive cancers, however, the available data have not yet reached a consensus on its clinical value [13, 14, 24].

In summary, higher viral load values were related to the severity of cytological and histological diagnosis, however, this assessment in clinical practice may have of limited value due to viral integration that can happen in the early stages of the carcinogenic process and this process can result in lower viral loads in clinically significant lesions

References

- 1.Cheung JKL, Cheung TH, Tang JWT, Chan PKS (2008). Increase of Integration Events and Infection Loads of Human Papillomavirus Type 52 with Lesion Severity from Low-Grade Cervical Lesion to Invasive Cancer. *J Clinical of Microbiology* 46: 1356-1362.
- 2.Van Duin M, Snijders PJF, Schrijnemakers HFJ, Voorhorst FJ, Rozendal L, et al. (2002). Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int. J. Cancer*: 98, 590–595.

3. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, et al. (2003). Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer*: 103: 519–524.
4. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U (2005). High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *British Journal of Cancer* 92: 891 – 894.
5. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, et al. (2007). Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration state in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol* 20:256–66.
6. Xi LF, Kiviat NB, Galloway DA, Zhou XH, Ho J, et al. (2008). Effects of Cervical Cytology on Detection of Cervical Intraepithelial Neoplasia III by Human Papillomavirus Type 16 DNA Load. *J Infect Dis.* 198(3): 324–331.
7. Wang SS, Hildesheim A (2003). Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31:35-40.
8. Hopman AHN, Smedts F, Dignef W, Ummulen M, Sonke G, et al. (2004). Transition to highgrade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 202:23–33.
9. Kalantari, M., F. Karlsen, G. Kristensen, R. Holm, B. Hagmar, et al. (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 17:146–153.
10. Táborá N, Ferrera A, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG (2008). High HPV 16 Viral Load is Associated with Increased Cervical Dysplasia in Honduran Women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(5): 843–846.
11. Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11–22.
12. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qwarforth-Tubbin P, et al. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355:2189–93.
13. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn- Fuchs I, Gyllensten U, et al. (2005). Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British Journal of Cancer* 92: 2195 – 2200.

14. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, Biri A, Erdem O, et al. (2005). Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 26:632–635.
15. Ribeiro AA, Alves RRF, Costa MC, Villa LL, Zeferino LC, et al. (2011). Association between HPV types and species groups and cervical neoplasia from a high-risk area for Cervical Cancer, Goiânia, Brazil. *Int J Gynecol Pathol* 30(3):288-94.
16. Solomon D, Nayar R (2004). *The Bethesda system for Reporting Cervical Cytology*, Springer-Verlag, New York, p. 1-190.
17. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ, editors (1994). Histological typing of female genital tract tumors. In: World Health Organization. *International Histological Classification of Tumors*, 2^a ed. Berlin: Springer-Verlag, Inc. p: 36–49.
18. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, et al. (2003). Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106: 396–403.
19. Morberg M, Gustavsson I, Gyllensten U (2004). Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int. J. Cancer* 112: 854–859.
20. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, et al. (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int. J. Cancer* 121: 2787–2793.
21. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, et al. (2007). HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int. J. Cancer* 121: 2198–2204.
22. Xi LF, Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Chunhui Wang C, et al. (2011). Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case–Control Study. *The Journal of Infectious Diseases* 203:1425–33.
23. Lo KW, Yeung SW, Cheung TH, Siu NS, et al. (2005). Quantitative analysis of human papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: a study in chinese population. *J Clin Virol* 34: 76-80.
24. Lai HC, Peng MY, Nieh S, Yu CP, Chang CC, et al. (2006). Differential viral loads of human papillomavirus 16 and 58 infections in the spectrum of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* 16: 730-735.

25. Wensveen C, Kagie CWJ, Nagelkerke NJ, Veldhuizen RW, Trimpos JB (2005). Can viral load, semi-quantitatively evaluated, of human papillomavirus predict cytological or histological outcome in women with atypical squamous or glandular cells of undetermined significance cytology? *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 26:393–397.
26. Boulet GAV, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, et al. (2009). Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in Intraepithelial HPV16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Neoplasia 2 in a Liquid-Based Cytology Setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2992-2999.
27. Carcopino X, Henry M, Benmoura D, Fallabregues AS, Richet H, et al. (2006). Determination of HPV Type 16 and 18 Viral Load in Cervical Smears of Women Referred to Colposcopy. *J Med Virol* 78:1131–1140.
28. Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, et al. (2000). A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Research* 60: 6027-6032.
29. Kulmala SMA, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, et al. (2006). Early integration of high copy HPV-16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 59:513-517.
30. Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, et al. (2012). Significance of HPV 16 and 18 viral load quantitation in women referred for colposcopy. *J Med Virol* 84(2):306-13.
31. Carcopino X, Bolger N, Henry M, Mancini J, Boubli L, et al., (2011). Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology. *J Med Virol* 83(4):637-43.

Table 1: Distribution of the cytological diagnosis in HPV 16 positives women

Cytological diagnosis	Total	%
Negative	6	7.8
ASC-US	9	11.6

LSIL	6	7.8
ASC-H	2	2.6
HSIL	50	65
Invasive carcinoma	4	5.2
Total	77	100

ASC-US: Atypical squamous cells of undertermined significance; LSIL: Low squamous intraepithelial lesion; ASC-H: Atypical squamous cells cannot exclude HSIL; HSIL: High squamous intraepithelial lesion; Invasive carcinoma: including squamous and glandular origin

Table 2: Distribution of the histological diagnosis in HPV 16 positives women

Histological diagnosis	Total	%
Cervicitis	10	12.9
CIN1	18	23.5
CIN2	21	27.3
CIN3	20	25.9
Invasive carcinomas	8	10.4
Total	77	100

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; Invasive carcinomas: including squamous and glandular origin.

Table 3: Distribution of cytological diagnosis in relation to viral load

ASC-US: Atypical squamous cells of undertermined significance; LSIL: Low squamous

Cytological diagnosis	Low		Moderate High/Very high		Total	
	n	%	n	%	n	%
Negative	5	83.3	1	16.7	6	100
ASC-US	8	88.9	1	11.1	9	100
LSIL	1	16.7	5	83.3	6	100
ASC-H	2	100	-	-	2	100
HSIL	15	30	35	70	50	
Invasive carcinoma	-	-	4	100	4	100

intraepithelial lesion; ASC-H: Atypical squamous cells cannot exclude HSIL; HSIL: High squamous intraepithelial lesion; Invasive carcinoma: including squamous and glandular origin

Table 4: Distribution of histological diagnosis in relation to viral load

Histological diagnosis	Low		Moderate High/Very high		Total	
	n	%	n	%	n	%
Cervicitis	7	70	3	30	10	100
CIN 1	12	66.6	6	33.4	18	100
CIN 2	7	33.3	14	66.7	21	100
CIN 3	4	20	16	80	20	100
Invasive carcinomas	1	12.5	7	87.5	8	100

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; Invasive carcinomas: including squamous and glandular origin

Table 5: Association between viral load and histological and cytological diagnosis

Viral load	≥ CIN 2 versus CIN1 and negative for neoplasia		≥ HSIL versus < HSIL	
	Odds ratio (95% CI)	p- value	Odds ratio (95% CI)	p- value
Low	Reference	-	Reference	-
Moderate/ high/very high	6.51 (2.9-20.92)	0.0002	4.59 (1.4-15.49)	0.004

CIN: cervical intraepithelial neoplasia. ≥ CIN 2: CIN2, CIN 3 and invasive carcinoma (including squamous and glandular origin). HSIL: High squamous intraepithelial lesion. ≥HSIL: ASC-H, HSIL and invasive carcinoma (including squamous and glandular origin). < HSIL: Negative, ASC-US, LSIL.

6 DISCUSSÃO

Os sujeitos foram mulheres encaminhadas para serviços especializados da rede pública de Goiânia (SUS Goiânia) por apresentarem alterações no exame citológico. A presença de HPV de alto risco e de alta carga viral são fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical e câncer invasivo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação destes fatores em mulheres com citologia alterada. A prevalência da infecção pelo HPV foi de 82,5%. Esta alta prevalência já era esperada pelo fato de se tratar de mulheres com exame citológico alterado, e foi semelhante à observada por Barros et al., (2012) e Ribeiro et al., 2011, que detectaram prevalências respectivamente de 86,3% e 86%, em amostra semelhante.

A prevalência do HPV 16 foi de 44,7% nesta população. Prevalências semelhantes, de 35,9% e 45% foram observadas por Barros et al., (2012) e Ribeiro et al., (2011). A prevalência do HPV 18 foi de 7%, taxa similar a encontrada por Barros et al., (2012) que foi de 6,1%.

Os resultados observados nesse estudo revelaram que mulheres mais jovens infectadas por HPV dos tipos 16 e 18, apresentam maior risco para lesões mais graves tanto no diagnóstico citológico (\geq LIEAG) quanto no histológico (\geq NIC 2). Esses dados reforçam a hipótese mulheres com infecções pelos tipos 16 e 18 desenvolvem lesões precursoras mais precocemente, enquanto que nas infecções por outros tipos de alto risco as lesões precursoras surgem mais tardiamente (Coupé et al., 2008; Sideri et al., 2011). Além disso, a infecção pelo HPV 16, em relação à infecção ocasionada por outros tipos de HPV, persiste com mais frequência como consequência ao fato do HPV 16 evadir ao sistema imune com maior facilidade (Sideri et al., 2011). Quando isso ocorre, há um risco aumentado para desenvolvimento de neoplasias cervicais.

O HPV 16 é o tipo de HPV mais prevalente em todo o mundo (Clifford et al., 2006). Mulheres jovens, devido à maior probabilidade de apresentarem ectopia mostram (Roberts et al., 2011), conseqüentemente, maior risco de adquirir infecção pelo HPV 16. A aquisição mais precoce da infecção por este tipo viral associado a sua maior capacidade de persistência sustenta a hipótese do risco das mulheres jovens apresentarem alterações mais graves de forma mais rápida (Gravitt et al., 2007; Sideri et al., 2011).

Outro aspecto que deve ser considerado na história natural das neoplasias cervicais é a carga viral do HPV. A carga viral tem sido apontada como fator de risco

para diagnóstico histológico mais grave. Altas cargas virais por HPV de alto risco oncogênico têm sido relacionadas com maiores taxas de persistência da infecção e com a recorrência das lesões precursoras do câncer do colo uterino (Park et al., 2008). Este estudo mostrou que mulheres HPV 16 positivas com maiores valores de carga viral tiveram maior risco de serem portadoras de NIC 2 ou lesão mais grave.

Em resumo, em mulheres com citologia alterada, a identificação do tipo viral envolvido na infecção, juntamente com a avaliação da carga viral, permite identificar aquelas mulheres com risco aumentado de apresentarem de lesões cervicais mais severas. No entanto, inserir esse tipo de rastreamento na rotina clínica é atualmente inviável, contudo, estes dados são importantes para ampliar o entendimento sobre a história natural da infecção pelo HPV e da neoplasia cervical.

7 CONCLUSÃO

- A prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com exame citológico alterado foi de 82,5%;
- O HPV 16 foi o mais prevalente, representando 44,7% dos casos;
- O HPV 18 apresentou uma taxa de prevalência de 7%;
- O risco de diagnóstico citológico de LIEAG ou lesão mais grave foi maior em mulheres jovens infectadas pelos tipos 16 e 18 quando comparadas a mulheres, na mesma faixa etária, infectadas por outros tipos de HPV;
- O risco de diagnóstico histológico de NIC 2 ou lesão mais grave, foi maior em mulheres jovens infectadas pelos tipos 16 e 18 quando comparadas às mulheres na mesma faixa etária infectadas por outros tipos de HPV;
- Mulheres infectadas pelo HPV 16 com maiores valores de carga viral mostraram maior risco de serem portadoras de lesões cervicais mais graves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert S, Oguntayo O, Samaila M 2012. Comparative study of visual inspection of the cervix using acetic acid (VIA) and Papanicolaou (Pap) smears for cervical cancer screening. *Ecancermedicalsecience*, 6(262): 1-8.

Ali PM, Ali SZ 2003. Atypical squamous cells of undetermined significance – Rule out high-grade squamous intraepithelial lesion: cytopathologic characteristics and clinical correlates. *Diagn Cytopathol*, 28(6): 308-312.

Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G 2008. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*, 26S: L16–L36.

Alves de Sousa NL, Alves RR, Martins MR, Barros NK, Ribeiro AA, Zeferino LC, Dufloth RM, Rabelo-Santos SH 2011. Cytopathic effects of human papillomavirus infection and the severity of cervical intraepithelial neoplasia: A frequency study. *Diagn Cytopathol*, 40(10):871-5.

Barra GB, Caixeta MCSAS, Costa PGG, Sousa CF, Velasco LFR 2011. Diagnóstico Molecular- passado, presente e futuro. *RBAC*, 43(3): 254-260.

Barros NKS, Costa MC, Alves RFF, Villa LL, Derchain SFM, Zeferino LC, Carneiro MAS, Rabelo-Santos SH 2012. Association of HPV Infection and *Chlamydia trachomatis* Seropositivity in Cases of Cervical Neoplasia in Midwest Brazil. *J Med Virol*, 84:1143–1150.

Barros NKS, Carneiro MAS, Tavares SBA, Souza NLA, Siqueira ML, Oliveira DF, Sampaio MCN, Rabelo-Santos SH 2011. Neoplasias intraepiteliais cervicais: faixa etária no momento do diagnóstico citológico. *RBAC*, 43(3):180-2

Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401: 70–79.

Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N 2008. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 26(10): K1-16.

Bosch FX 2003. Epidemiology of human papillomavirus infections: New options for cervical cancer prevention. *Salud Pùb de México*, 45(3): S326-S339.

Boulet GAV, Horvath CAJ, Berghmans S, Borgers J 2008. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17:810-817.

Bringhenti ME, Dozza TG, Dozza TG, Martins TR, Bazzo ML 2010. Prevenção do câncer cervical: Associação da citologia oncológica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do papilomavírus humano (HPV). *DST- J Bras Doenças Sex Transm*, 22(3): 135-140.

Burk, RD; Chen, Z; van Doorslaer, K 2009. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics* 12: 281-290.

Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Wacholder S, Tarone R, Burk RD 2005. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*, 191(11):1808-16.

Chase DM, Kalouyan M, DiSaia PJ 2008. Colposcopy to evaluate abnormal cervical cytology in 2008. *Am J Obstet Gynecol*, 200(5): 472- 480.

Classon M, Harlow E 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(12):910-7.

Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(5):1157-64.

Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL 2006. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 24(3): S3/26-34.

Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, Woodman CBJ 2009. Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in the Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Res*, 69(9): 3828-3832.

Constandinou-Williams C, Collins SI, Roberts S, Young LS, Woodman CB, Murray PG 2010. Is human papillomavirus viral load a clinically useful predictive marker? A longitudinal study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(3):832-7.

Coupè VMH, Berkhof J, Bulkman NWJ, Snijders PJF, Meijer CJLM 2008. Age-dependent prevalence of 14 high-risk HPV types in the Netherlands: implications for prophylactic vaccination and screening. *Br J Cancer*, 98: 646-651.

Coutlée F, Mayrand MH, Roger M, Franco EL 2009. Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids. *Public Health Genomics*, 12(5-6):308-318.

Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H 2002. Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microbiol*, 40(3): 902-907.

Covell JL, Wilbur DC, Guidos B, Lee KR, Chhieng DC, Mody DR 2004. In D Solomon & R Nayar, *The Bethesda system for Reporting Cervical Cytology*, Springer-Verlag, New York, p. 123-156.

Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M 2007. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol*, 106:549–557.

Cronje' HS, Parham GP, Cooreman BF, de Beer A, Divall P, Bam RH 2003. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia in a developing country. *Am J Obstet Gynecol*, 188: 395-400.

Crum CP, Cibas ES, Lee KR 1997. *Pathology of Early Cervical Neoplasia*. New York, Churchill Livingstone.

D'ottaviano-Morelli MGL, Zeferino L, Cecatti JG, Terrabuio DR, Martinez EZ 2004. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma based on cytological screening in the region of Campinas, São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*, 20(1): 153-159.

de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, Bosch FX 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7(7):453-9.

Demay RM. The Pap smear 1993. In: *The art and the science of cytopathology*. Chicago: ASCP Press, 61–185.

Denny L, Kuhn L, Pollack A, Wright TC Jr 2002. Direct visual inspection for cervical cancer screening: an analysis of factors influencing test performance. *Cancer*, 94: 1699-1707.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27.

Derchain SFM, Filho AL, Syrjanen KJ 2005. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 27(7): 425-33

Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Accardi L, Donà MG, Branca M, Costa S, Mariani L, Agarossi A, Ciotti M, Syrjänen K, Giorgi C 2006. Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer*, 1 (6):1-9.

Discacciati MG, Souza CAS, d’Otaviano MG, Ângelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC 2011. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *European J Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 155: 204–208.

Do Carmo EFS & Fiorini A 2007. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavirus humano. *Rev saúde e Biol*, 2(1): 29-31.

Einstein MH, Garcia FAR, Mitchell AL, Day SP 2011. Age-Stratified Performance of the Cervista HPV 16/18 Genotyping Test in Women with ASC-US Cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(6): 1185-1189.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al 2010 ‘GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet].’ *International Agency for Research on Cancer*: Lyon.

Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 77: 1410-26.

Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*, 76: 10009-14.

Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, Bosch FX, Ferreccio C, Hieu NT, Lazcano-Ponce E, Matos E, Molano M, Qiao YL, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Meijer CJ, Muñoz N 2006.

Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*, 119(11):2677-84.

Frazer IH 2006. Delivering papillomavirus vaccines when and where they are most needed. *Hum Vaccin*, 2(5):227-9.

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, 40(1): 1-13.

Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS 2005. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol*, 96:181-6.

Guedes AC, Brenna SM, Coelho SA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Zeferino LC 2007. p16(INK4a) Expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Cancer*, 17(5):1099-103

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Heeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 38: 357-361.

Gravitt P, Kovacic M, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Rodriguez AC, Burk RD 2007. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*, 121:2787 – 93.

Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV 2003. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods*, 112(1-2):23-33.

Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V 2009. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *salud pública de méxico*, 51(3): S479-S488.

Hernández-Montes J, Rocha-Zavaleta L, Monroy-García A, Weiss-Steider B, Zaragoza-Ortega MC, Cruz-Talonia F, Cruz y Cruz O, Bonifaz-Alfonso L, Chávez-Rueda AK, Rojo-Aguilar MP, Legorreta-Haquet MV, Mora-García ML 2012. Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8 + IFN γ + T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate. *Infectious Agents and Cancer*, 7:12.

Herrero R, Hildeshwin A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, Balmaceda I, Greenberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M, Schiffman M 2000. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, 92: 464-474.

Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 87(18):1365-71.

Hoda, RS, Hoda SA 2007. Atypical Squamous Cells. In *Fundamentals of Pap Test Cytology*, Humana Press, New Jersey, p. 81-94.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 19-07-12

Jacobson DL, Peralta L, Graham NM, Zenilman J 2000. Histologic development of cervical ectopy: relationship to reproductive hormones. *Sex Transm Dis*, 27(5): 252–258.

Juckett G, Hartman-Adams H 2010. Human Papillomavirus: Clinical Manifestations and Prevention. *Am F Physician*, 82(10): 1209- 1214.

Kleter B, van Doorn L-J, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M, Quint W 1999. Development and Clinical Evaluation of a Highly Sensitive PCR-Reverse Hybridization Line Probe Assay for Detection and Identification of Anogenital Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol*, 37(8): 2508-2517.

Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS 2008. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*, 168(2):123-137.

Lax S 2011. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. *Acta Dermatoven APA*, 20 (3): 125-133.

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M 2001. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*, 91(3): 412-20.

Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, Untergasser A, Vandesompele J; RDML consortium 2009. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, 37(7):2065-9.

Leto MGP, Júnior GFS, Porro AM, Tommimori J 2011. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol*, 86(2):306-17.

Mackey IM, Arden KE, Nitcher A 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30(6): 1292-1305.

Maver PJ, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ 2010. Detection and typing of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 6, HPV 11, HPV 42, HPV 43 and HPV 44 by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *J Virol Methods*, 169(1):215-8

Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A 2009. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS*, 117(2):108-114.

Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U 2005. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Brit J of Cancer*, 92: 891 – 894

Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clinical Virology*, 32S: S43-S51.

Moody CA, Laimins LA 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10(8):550-60.

Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J 2004. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis*, 190(1):37-45.

Munhoz D, Cardeal LBS, Maria-Engler SS 2012. Carcinoma escamoso e atipias. Em Consolaro MEL, Maria-Engler SS, Citologia clínica cérvico-vaginal. Texto e atlas. Ed Roca Ltda. São Paulo, p.

Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, Molano M, Posso H, Moreno V, Murillo R, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A; Instituto Nacional de Cancerología HPV Study Group 2009. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*, 100(7): 1184–1190.

Murta EFC, Souza MAH, Adad SJ, Júnior EA 2001. Infecção pelo Papilomavírus Humano em Adolescentes: Relação com o Método Anticoncepcional, Gravidez, Fumo e Achados Citológicos. *RBGO*, 23 (4): 217-221

Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, Rådberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J 2007. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer [published correction appears in *N Engl J Med*. 2008;359(15):1637]. *N Engl J Med*, 357(16):1589-1597.

Olsson SE, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Brown DR, Koutsky LA, Tay EH, García P, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Lehtinen M, Steben M, Bosch FX, Dillner J, Joura EA, Majewski S, Muñoz N, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A, Bryan J, Maansson R, Vuocolo S, Hesley TM, Saah A, Barr E, Haupt RM 2009. Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with serological evidence of prior vaccine type HPV infection. *Hum Vaccine*, 5(10): 696–704.

Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS 2008. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol*, 108(3):549-54.

Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S 2002. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiology*, 40: 886-891.

Pett M, Coleman N 2007. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in carcinogenesis? *J Pathol*, 212(4):356-367

Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LO, Syrjänen K, Aldrighi JM 2008. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev Saud Pública*, 42(1): 123-30.

Rapose A 2009. Human papillomavirus and genital cancer. *Indian J Derm, Ven and Leprology*, 75(3): 236-243.

Raychaudhuri S, Mandal S 2012. Socio-Demographic and Behavioural Risk Factors for Cervical Cancer and Knowledge, Attitude and Practice in Rural and Urban Areas of North Bengal, India. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13:1093-1096.

Ribeiro AA, Alves RRF, Costa MC, Villa LL, Zeferino LC, Derchain SFM, Carneiro MAS, Rabelo-Santos SH 2011. Association between HPV types and species groups and cervical neoplasia from a high-risk area for Cervical Cancer, Goiânia, Brazil. *Int J Gynecol Pathol*, 30:288–294.

Roberts JN, Kines RC, Katki HA, Lowy DR, Schiller JT 2011. Effect of Pap Smear Collection and Carrageenan on Cervicovaginal Human Papillomavirus-16 Infection in a Rhesus Macaque Model. *J Natl Cancer Inst*,103:737–743.

Rodrigues AD, cantarelli VV, Frantz MA, Pilger DA, Pereira FS 2009. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para detecção de HPV em amostras clínicas. *J Bras Med Lab*, 45(6): 457-462).

Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Solomon D, Guillén D, Alfaro M, Morales J, Hutchinson M, Katki H, Cheung L, Wacholder S, Burk RD 2010. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst*,102(5): 315-24.

Sanjose S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N, Català I, Meijer CJ, Snijders PJ, Herrero R, Bosch FX 2003. Cervical human papillomavirus infection in female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis*, 287: 2114-9.

Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mouglin C, Prétet J-L 2008. Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. *J Clin Microbiol*, 46(1): 3678–3685.

Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL 2003. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 103: 519–524.

Schiffman M, Kjaer SK 2003. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human papillomavirus Infection and Neoplasia. *J Nat C Institute*, 31: 14-19.

Schiffman M, Wentzensen N 2010. From Human Papillomavirus to Cervical Cancer. *Obst Gynecol*, 16(1): 177-185.

Scout M, Nakagawa M, Moscicki AB 2001. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clin Diag Lab Immunology*, 8: 209-220.

Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ, editors 1994. Histological typing of female genital tract tumors. In: World Health Organization. International histological classification of tumors. 2nd edition. Berlin: Springer-Verlag, Inc. pp 36–49.

Sideri M, Igidbashian S, Boveri S, Radice D, Casadio C, Spolti N, Sandr MT 2011. Age distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 121: 510-513.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*, 121(3):621-32.

Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM 2006. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol*; 208: 152-164.

Solomon D, Nayar R 2004. The Bethesda system for Reporting Cervical Cytology, Springer-Verlag, New York, p. 1-190.

Southern AS, Herrington CS 1998. Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex Transm Infections*, 74: 101-9.

Stern PL 2005. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virology*, 32S: S72- S81.

Syrjänen K, Yliskoski M, Kataja V, Hippeläinen M, Syrjänen S, Saarikoski S, Ryhänen A 1990. Prevalence of genital human papillomavirus infections in a mass-screened Finnish female population aged 20-65 years. *Int J STD AIDS*, 1(6):410-5.

Tavassoli FA, Devilee P, editors 2003. Tumours of the breast and female genital organs. Lyon: *IARC Press*.

Trottier H, Burchell AN 2009. Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public H Genomics*, 12: 291-307.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL 2006. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Ep Biomarkers Prev*, 15(7):1274-1280.

Van den Brule AJC, Meijer CJLM, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM 1990. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28:2739-43.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathology*, 189(1): 12-9.

Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M 2007. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*, 23(4):315-30.

Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA 2005. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*, 191(5):731-8.

Woodman CB, Collins SI, Young LS 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1): 11-22.

World Health Organization (WHO) (2010) WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer 2010. Human Papillomavirus and Related Cancers in Kenya. Summary Report: *World Health Organization*.

Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D 2007. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet and Gynecol* 197: 346-355.

Wright TC, Gatscha RM, Luff RD, Prey MU 2004. Epithelial cell abnormalities: Squamous. In D Solomon & R Nayar, *The Bethesda system for Reporting Cervical Cytology*, Springer-Verlag, New York, p. 89-121.

Wright Jr TC, Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A 2000. HPV-DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA*, 283: 81-86.

Wright TC 2006. Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. *International Journal of Gynecol Obstet* 94(Suppl 1): S22-S31.

Zeferino LC, Derchain SF 2006. Cervical cancer in the developing world. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 20(3): 1-16.

Zur-Hausen H 2002. Pappilomaviruses abd cancer: From baxic studients to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2 (5): 342-350.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar como voluntária de uma pesquisa. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar o convite, assine no final deste documento, que estará em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida sobre a pesquisa você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Silvia Rabelo, pelo telefone (62) 32096457. Em caso de dúvida sobre seus direitos como participante nesta pesquisa você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, pelo telefone (62)32544161.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA.

O título da pesquisa é “Tipos específicos de HPV, carga viral e estado físico do DNA viral em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau”. A motivação para este estudo refere-se ao fato da infecção pelo HPV poder apresentar-se associada a alterações no exame de prevenção, que podem preceder o aparecimento de tumores no colo uterino. O objetivo da pesquisa é verificar se o vírus está ou não presente no colo uterino e, se presente, qual o tipo, qual a quantidade e quais as características deste vírus. A senhora foi encaminhada ao Ambulatório de Colposcopia do Hospital das Clínicas para realização de colposcopia com biopsia e tratamento, se necessários. A sua participação nesta pesquisa é livre. A senhora pode recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem penalidade alguma e sem prejuízo ao seu tratamento ou acompanhamento;

Caso aceite participar da pesquisa será coletado, por uma médica envolvida na pesquisa, secreção do colo uterino para a realização de um segundo exame de prevenção e outro exame para identificar presença ou não do HPV e responderá a um questionário para obtenção de dados epidemiológicos. A coleta da secreção será feita com material apropriado e descartável. O material coletado para prevenção será enviado ao Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da UFG onde será processado e analisado. O material coletado para a detecção do HPV será enviado aos laboratórios do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG e ao Laboratório de Diversidade

Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) para armazenamento e posterior análise. A coleta da secreção vaginal não irá alterar o procedimento pelo qual a senhora foi encaminhada para o Ambulatório. No momento da coleta a senhora poderá sentir uma leve cólica. Além da coleta e análise da secreção, será coletado em seu prontuário o resultado do exame histológico de material obtido por biópsia, caso ela tenha sido realizada. A senhora receberá todos os resultados dos exames realizados. Na atualidade, o método para condução de anormalidades citológicas de alto grau, motivo pelo qual a senhora foi encaminhada, baseia-se nos resultados da colposcopia e do estudo do material obtido por biópsia, não havendo métodos alternativos. Caso a senhora apresente lesão no colo uterino, induzida pela infecção pelo HPV, será tratada e acompanhada por uma das médicas envolvidas na pesquisa, de acordo com as condutas do Ambulatório de Patologia Cervical e Colposcopia do Hospital das Clínicas. Será garantido o sigilo de todas as informações obtidas. A participação na pesquisa não acarretará em custos ou despesas extras, já que todos os procedimentos serão realizados no momento da colposcopia com biópsia, para a qual a senhora foi encaminhada. Poderão ocorrer riscos em decorrência de sua participação, inclusive psicológicos, que buscaremos minimizar. Nenhum benefício direto proveniente desta pesquisa lhe será garantido. Porém, os benefícios poderão ser evidenciados na medida em que os resultados deste estudo, somados a outros resultados de outras pesquisas, possibilitem um maior conhecimento da infecção pelo HPV e de seu impacto na saúde da mulher, direcionando assim medidas preventivas necessárias.

Os pesquisadores estão disponíveis para qualquer esclarecimento nos seguintes telefones: Silvia Rabelo (32096044) coordenadora da pesquisa, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves (32544253) coordenadora da rede de pesquisa sobre o HPV.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, RG _____, CPF _____
_____ concordo em participar da pesquisa **Tipos específicos de HPV, carga viral e estado físico do DNA viral em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau** como sujeito. Fui devidamente informada e esclarecida sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer

momento, sem que isto leve a qualquer penalidade por parte da Instituição de Saúde e Ensino em qual ele está inserido.

Nome do paciente: _____

Assinatura

Local e data

Nome do responsável pela aplicação do TCLE: _____

Assinatura

Local e data

Testemunha imparcial: _____

Assinatura

Local e data

ANEXO



Goiânia, 01 de julho de 2010.

PROTOCOLO CEP/SCMG N. 008/2010

TÍTULO: *Tipos específicos de HPV, carga viral e estado físico do DNA viral em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau.*

INVESTIGADOR(A) RESPONSÁVEL: *Profª. Drª. Sílvia Helena Rabelo dos Santos*

Local de Realização: Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
Área de Conhecimento: 4.01 – Ciências da Saúde – Medicina
Área Temática: Grupo III

Situação: **APROVADO**

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia – CEP/SCMG, **aprovou sem restrições** o projeto supra citado, após sua análise, considerando-o em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que deverão ser encaminhados ao CEP/SCMG, **relatórios** trimestrais do andamento da pesquisa e/ou do encerramento, conclusões e publicação (ões) do mesmo.

Ms. Mauro Meira de Mesquita
Biomédico
Coordenador do CEP/SCMG

Rua Campinas n. 1135 – Setor Americano do Brasil - Goiânia - Goiás
CEP: 74.530-240 - Telefone: (62) 3254-4161
<http://www.santacasago.org.br/>
cep@santacasago.org.br

1



SES
SECRETARIA
DA SAÚDE



Hospital Materno Infantil



CA2 nº 015 /10 - CEP/HMI

Goiânia, 01 de setembro de 2010.

CARTA DE APROVAÇÃO

Protocolo Nº 015/10

Título do Projeto: “Tipos específicos de HPV, carga viral e estado físico do DNA viral em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau”. Versão 2.

Investigador(a): Sílvia Helena Rabelo dos Santos

Prezado(a) Senhor(a),

Comunico-lhe que o **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil - CEP/HMI**, analisou e aprovou o Projeto de Pesquisa em epígrafe na sua Versão – 2, bem como o TCLE – Versão 2, vez que foi considerado o atendimento às adequações sugeridas em análise anterior, consoante aos princípios éticos vigentes.

Informo, ainda, que a presente aprovação tem validade pelo período de tempo definido no projeto e caso hajam alterações no cronograma, ainda que alheias a vontade do pesquisador, estas deverão ser informadas a esse Comitê para fins de análise e deliberação.

Como já é de conhecimento de V.Sa. destaco, por oportuno, a necessidade de ser encaminhado à esse Comitê relatórios semestrais que informem sobre o andamento, encerramento, conclusão e publicação da pesquisa.

Atenciosamente,

Marco Aurélio Albernaz
Coordenador do CEP-HMI