

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA
CRUZ**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE PAPILOMAVIRUS
HUMANO ONCOGÊNICOS E DAS VARIANTES DO HPV
16 EM LESÕES INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO**

ADRIANA MATOS BENJAMIN LEAL

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

ADRIANA MATOS BENJAMIM LEAL

**IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE PAPILOMAVIRUS HUMANO
ONCOGÊNICOS E DAS VARIANTES DO HPV 16 EM LESÕES
INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa
Cruz, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Mai de 2004

ADRIANA MATOS BENJAMIN LEAL

IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE PAPILOMAVIRUS HUMANO
ONCOGÊNICOS E DAS VARIANTES DO HPV 16 EM LESÕES
INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 19 de agosto de 2004

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio
UESC-BA

Prof^a. Dr^a Virgínia MinghelliSchmitt.
PUC-RS

Prof^a. Dr^a. Ana Neuza Vieira Matos
(UESC – Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Santa Cruz, por oferecer condições para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo financiamento de parte dos recursos deste trabalho.

À Secretaria de Saúde de Ilhéus, BA, pelo apoio na coleta das amostras.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo tratamento justo, humano e pelo apoio logístico.

Ao Colegiado de Medicina, pelo incentivo.

À professora Ana Neuza Vieira Matos, por conceder-me generosamente sua atenção, tempo, amizade e orientação.

Ao professor Júlio César de Mattos Cascardo, pelo voto de confiança e orientação dispensada.

À Andréa Cristina Mariano, pelo auxílio fundamental na obtenção dos dados.

À professora Virgínia Minghelli Schmitt, pelo apoio e amizade.

Ao professor José Luiz Pires, pelo auxílio na análise estatística.

À professora e irmã Acássia Pires, pelo carinho e contribuições.

Aos colegas de turma, pela amizade e convivência agradável.

Ao Robson, pelo apoio no seqüenciamento.

À Deise, pelo companheirismo e auxílio.

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

*A Deus, dono da minha vida, toda adoração.
À querida mamãe, minha eterna gratidão.
Aos meus irmãos, pela esperança no amanhã.
A Marquinhos, meu noivo, pela paciência .*

ÍNDICE

EXTRATO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Anatomia e Histologia do Colo uterino	03
2.2 Epidemiologia do Câncer Cervical	04
2.3 História Natural do Câncer	05
2.4 Caracterização Viral e Transformação Celular	06
2.5 Formas Episomal e Proviral do HPV	10
2.6 Classificação dos Papilomavírus	11
2.7 Variação Genômica do HPV 16	13
2.8 Associação dos Papilomavírus oncogênicos com Lesões Intraepiteliais e Câncer Cervical	15
2.9 Fatores de Risco Adicionais	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Amostras Clínicas	19
3.2 Extração de DNA	19
3.3 Diagnóstico por PCR	20
3.3.1 Controle Interno das Amplificações	20
3.3.2 Detecção do DNA viral	20
3.3.3 Detecção dos HPVs 16 e 18	21
3.4 Sequenciamento Direto das Amostras Positivas para HPV 16	22
3.5 Análise de seqüências	22
3.6 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Detecção dos Papilomavírus 16 e 18	24

4.2	Identificação dos HPV 16 e 18 por grau de lesão intraepitelial.....	25
4.3	Detecção das variantes do HPV 16.....	31
4.4	Associação das lesões intraepiteliais ao histórico de vida.....	32
4.4.1	Análise univariada.....	32
4.4.2	Análise multivariada	32
4.4.3	Análise de correlação parcial	33
5.	DISCUSSÃO	37
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	APÊNDICE 1	57
	APÊNDICE 2	58
	ANEXO	61

EXTRATO

LEAL, Adriana Matos Benjamin, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Identificação de Tipos Oncogênicos de Papilomavirus Humano e de Variantes do HPV 16 em Lesões Intraepiteliais do Colo Uterino.** Orientadora: Ana Neuza Vieira Matos. Coorientador: Júlio César de Mattos Cascardo. Colaborador: Mônica Rosa Bertão.

As lesões intraepiteliais cervicais são consideradas pré-neoplásicas e a associação com o papilomavírus humano (HPV) oncogênico é conhecida. Este estudo foi realizado para identificar a prevalência dos HPVs 16 e 18, a presença de variantes intratipo do HPV16 e de fatores de risco adicionais em 104 mulheres com lesões intraepiteliais cervicais, selecionadas do Serviço de Referência do Município de Ilhéus-Bahia. O método para detecção dos tipos de HPV foi a reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando-se um par de oligonucleotídeos consenso, MY09 e MY11, seguido de PCR específica para os tipos 16 e 18. Para detecção de variantes, o método empregado foi o sequenciamento direto. As pacientes responderam um questionário para a identificação de fatores de risco adicionais. O HPV 16 foi o mais prevalente, sendo detectados em 41,34% das mulheres e o HPV 18 foi detectado em 12,50%. A taxa de infecção dupla foi de 3,85%. O HPV 16 foi detectado em 31,34% das pacientes com lesão intraepitelial de baixo grau e em 54,05% pacientes com lesão de alto grau. O HPV 18 foi positivo em 8,95% das lesões de baixo grau e em 18,91% das lesões de alto grau. Os HPVs 16 e 18 foram identificados como principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Resultados preliminares do seqüenciamento apontam para detecção de variantes do HPV 16 na população estudada. Essas são

informações importantes para o conhecimento do perfil epidemiológico das pacientes estudadas e, caso seja detectado variante do HPV16, estes dados poderão contribuir para o desenvolvimento de vacinas. Além disso, como foi o primeiro trabalho com este desenho, serve como base para desenvolvimento de novas pesquisas nesta região.

Palavras Chaves: HPV DNA, PCR, Seqüenciamento Direto, Câncer Cervical.

ABSTRACT

LEAL, Adriana Matos Benjamin, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, August 2004. **Identification of Oncogenic Types of Human Papillomavirus and Variants of HPV 16 in Intraepithelial Lesions of Uterine Cervix.** Adviser: Ana Neuza Vieira Matos. Committee Members: Júlio César de Mattos Cascardo and Mônica Rosa Bertão.

of consensus primers (MY09 and MY11), followed by type of specific PCR. The detection of HPV variants was carried out by direct sequencing. Patients answered a questionnaire aiming to identify possible cofactors. HPV 16 was the most prevalent, type detected in 41.35% of women, while HPV 18, was Cervical Squamous Intraepithelial Lesions are considered pre-neoplastic and their association with oncogenic human papillomavirus (HPV) is well known. The present study was carried out aiming to identify the prevalence of HPV types 16 and 18, the presence of HPV 16 intratype variants, and additional risk factors in 104 women affected by cervical intraepithelial lesions, selected at the Medical Reference Service, Ilhéus, Brazil. HPV types 16 and 18 were detected by polimerase chain reaction (PCR), using a pair observed in 12.5% of them. Both HPV types were detected in 3.85%. HPV 16 was detected in 31.34% of patients with low-grade intraepithelial lesions and in 54.05% with high-grade intraepithelial lesions. HPV 18 was positive in 8.95% of low-grade intraepithelial lesions and in 18.91% of high-grade intraepithelial lesions. HPV 16 and 18 were identified as risk factors for the development of cervical cancer. Sequencing results are yet preliminary but point to the presence of HPV16 variants in the studied population. The results of the present study are important for the knowledge of the Epidemiological profile of the studied population as well as for the development of vaccines in the future, once HPV 16 variants were detected.

In addition, these results will be useful for developing further studies in this region.

Keywords: HPV DNA, PCR, Direct Sequencing, Cervical Cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é a terceira neoplasia feminina mais prevalente em todo mundo e o alto índice de mortalidade sempre foi motivo de grande preocupação. Apesar de o Brasil ter aderido há muito tempo a programas de diagnóstico precoce das lesões intraepiteliais cervicais, consideradas pré-malignas, este ainda é um problema de saúde pública.

A infecção com o papilomavirus humano (HPV) oncogênico, considerada uma doença sexualmente transmissível, é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer cervical. O papilomavírus humano faz parte de um grande grupo de patógenos que infectam o epitélio estratificado em sítios específicos do corpo e causam lesões proliferativas. Vários outros fatores como variantes do mesmo tipo viral, persistência da infecção, início precoce da vida sexual, número de parceiros sexuais durante a vida e tabagismo estão associados a este processo.

Com os avanços das técnicas de biologia molecular, foi possível estudar o genoma do HPV e verificar que existem muitos tipos virais. Alguns deles, como o 6 e o 11, são classificados como de baixo risco por não possuírem potencial maligno. Já os HPVs 16 e 18 são exemplos de HPV de alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Esses dois tipos são reconhecidos como oncogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer. Mais recentemente foram identificados variantes destes tipos virais e diversas evidências sugerem um envolvimento com a maior agressividade do tumor.

O conhecimento das variantes é de grande interesse, já que auxilia no desenvolvimento de vacinas. Atualmente, laboratórios engajaram a produção de vacinas contra as cepas de HPV de alto risco, a fim de evitar o desenvolvimento neoplásico e a morte de milhares pessoas. A vacina experimental até agora produzida é altamente imunogênica e bem tolerada

pelos voluntários, mas esses resultados necessitam de maiores investigações. Por isso, muitos pesquisadores continuam estudando este vírus complexo.

Há algumas pesquisas sendo desenvolvidas no Brasil sobre o HPV, no entanto, ainda não foi feito um levantamento dos tipos predominantes e de variantes em várias regiões do Brasil, incluindo a microrregião Sul da Bahia. Este tipo de estudo é importante para fornecer dados regionais para avaliar a eficácia das vacinas em estudo até o momento e para a produção de vacinas mais específicas.

O objetivo desta pesquisa foi determinar a prevalência dos papilomavírus 16 e 18 e a presença de variantes do HPV 16 nas mulheres com lesões precursoras do câncer cervical encaminhadas à Unidade de Referência do Município de Ilhéus, Bahia, para tratamento das patologias do trato genital inferior, entre Setembro de 2002 e Dezembro de 2003. Além disso, correlacionar o tipo viral com o grau de lesão intraepitelial diagnosticado pela histologia e identificar fatores de risco adicionais para o desenvolvimento do câncer cervical. A Unidade de Referência do Município de Ilhéus foi escolhida por já possuir infra-estrutura adequada para diagnóstico das lesões pré-cancerosas, tratamento e seguimento dos casos triados pela citologia e confirmadas pela colposcopia e histologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e Histologia do Colo Uterino

O colo uterino é originado do ducto paramesonéfrico na sexta semana gestacional, tem forma cilíndrica, na maior parte das vezes, com 03 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Contém um canal endocervical de poucos milímetros que comunica a cavidade uterina com a cavidade vaginal e é protegido pelo tampão mucoso produzido pelas células endocervicais (DE PALO, 1993; DECHERNEY; NATHAN, 2003).

O colo normal é dividido em duas regiões: ectocervical e endocervical. A região ectocervical é formada por epitélio pluriestratificado, não ceratinizado, semelhante ao da vagina, formado por ceratinócitos distintos morfológicamente (DE PALO, 1993). Estes formam a camada basal, parabasal, intermediária e superficial (ROCHA-ZAVALETA et al, 2003). A camada basal é formada por uma fileira única de células cúbicas dispostas perpendicularmente à membrana basal. A camada parabasal é formada por várias camadas de células redondas ou ligeiramente poliédricas, com núcleo redondo ou oval relativamente volumoso. A intermediária é composta por diversas camadas de células fusiformes cujos citoplasmas são claros e os núcleos são pequenos e vesiculosos. Finalmente, a camada superficial é formada por células planas com núcleos picnóticos (DE PALO, 1993).

A região endocervical é revestida por um epitélio monoestratificado, constituído por uma única fileira de células cilíndricas altas, produtoras de muco, dispostas em paliçada (DE PALO, 1993; ROCHA-ZAVALETA, 2003). A porção que separa a região endocervical da ectocervical é chamada de junção escamo-colunar (JEC) e vários estudos demonstraram ser o local de preferência para o desenvolvimento da neoplasia cervical, chegando a 90% dos casos (ROCHA-ZAVALETA, 2003). Durante todas as fases da vida da

mulher, o colo sofre influência dos níveis hormonais femininos, resultando em maior ou menor exposição da JEC (DECHERNEY; NATHAN, 2003).

2.2 Epidemiologia do Câncer Cervical

O CÂNCER CERVICAL É A TERCEIRA NEOPLASIA FEMININA MAIS PREVALENTE E A CAUSA MAIS COMUM DE MORTE POR CÂNCER GINECOLÓGICO EM TODO MUNDO (Wadler ET AL, 2004). A CADA ANO, 400.000 A 500.000 NOVOS CASOS SÃO DIAGNOSTICADOS, COMPREENDENDO CERCA DE 12% DE TODOS OS CÂNCERES EM MULHERES. DESTES, 80% OCORREM EM PAÍSES POBRES E APROXIMADAMENTE 200.000 MULHERES MORREM A CADA ANO (SPANDIDOS, 2004). NOS PAÍSES DESENVOLVIDOS, A TAXA DE INCIDÊNCIA DE DOENÇA INVASIVA É DE 0,22 A 15 POR 100.000 MULHERES (Sasco, 2002). NOS PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO, O CÂNCER CERVICAL OCUPA O SEGUNDO LUGAR EM INCIDÊNCIA DE NEOPLASIA DO TRATO GENITAL INFERIOR E O PRIMEIRO EM PAÍSES SUBDESENVOLVIDOS (de Vuyst ET AL., 2003).

Além das mortes atribuídas a esta doença, o carcinoma cervical avançado também está relacionado à morbidade severa, incluindo falência renal, metástase hepática e ósseas dolorosas. A radioterapia associada à quimioterapia melhora a sobrevivência das pacientes com doença confirmada, mas até o presente momento, o tratamento para as metástases é ineficiente (WADLER et al., 2004).

O levantamento realizado no Brasil em 1998 constatou que 16% das mortes por câncer em mulheres na faixa de 35 a 45 anos foram devidas ao câncer do colo uterino (INCA, 1998). Além disto, houve crescimento de 29% na mortalidade nos últimos 20 anos, passando de 3,44 em 1979 para 4,45 por 100.000 em 2001. Na Bahia, os dados estatísticos coletados permitiram estimar que, das 313.703 mulheres avaliadas pelo programa de prevenção do câncer do colo uterino, 8.770 apresentarão exames alterados nos anos subsequentes. Destes, 2,6% serão de lesões pré-cancerosas e 0,05% de lesão cancerosa (INCA, 1998).

Apesar do Brasil ter sido um dos primeiros países a introduzir o exame citopatológico para detecção precoce desta neoplasia, as taxas de mortalidade ainda continuam elevadas. De acordo com dados absolutos de mortalidade, 3.953 mulheres morreram vítimas do câncer cervical em 2002 e estima-se que 4.110 óbitos tenham ocorrido em 2003 (INCA, 2004).

Atualmente, segundo o Instituto Nacional do Câncer (2004), a neoplasia cervical ocupa o terceiro lugar em incidência no Brasil, somente ultrapassada pelo câncer de pele e de mama. Estima-se que a incidência em 2003 foi de 16.500 novos casos, o que corresponde a 18,3% das neoplasias diagnosticadas entre as mulheres nesse ano.

O câncer cervical pode ser evitado, pois é precedido por lesões intraepiteliais, consideradas pré-malignas, que são definidas como alterações escamosas na zona de transformação cervical (CRUM, 2002). A classificação de Richart (1967) utilizada na Europa e pelos patologistas em grande parte do mundo, identifica essas alterações como neoplasias intraepiteliais cervicais de grau I (NIC I), grau II (NIC II) e grau III (NIC III). Nos EUA e, recentemente, no Brasil é adotada a terminologia de Bethesda, revisada em 2001, que classifica as lesões pré-malignas como lesão intraepitelial de baixo grau, que inclui a NIC I e lesão intraepitelial de alto grau correspondendo a NIC II e NIC III (CRUM, 2002).

2.3 História Natural do Câncer

As lesões intraepiteliais e o câncer cervical são considerados doenças sexualmente transmissíveis, cuja etiologia tem sido intimamente relacionada ao papilomavírus humano. Fortes evidências epidemiológicas sustentam esta associação. Recentemente, alguns estudos utilizando metodologias bem estabelecidas para detecção das seqüências de DNA, praticamente eliminaram os cânceres considerados HPV-negativos, demonstrando que 99,7% das amostras possuíam o DNA viral (WALBOOMERS, 1999; WADLER, 2004).

Cerca de 20 milhões de adultos com vida sexual ativa são infectados com o papilomavírus e ocorrem 5,5 milhões de novos casos a cada ano (CATES, 1999). Esta infecção, particularmente com os tipos reconhecidos como oncogênicos, inicia e mantém o processo de transformação celular, além de poder progredir para o câncer cervical. O estudo publicado por Schlecht et

al. (2003) demonstrou que a associação entre HPV e lesão intraepitelial tem alta magnitude.

A infecção pelo HPV, na maioria dos casos, é um fenômeno transitório, resultando em eliminação do vírus pelo sistema imunológico ou no aparecimento de lesões intraepiteliais de baixo grau, que regredem espontaneamente (FRANCO et al., 1999). O estudo de Molano et al. (2003), realizado na Colômbia, demonstrou que metade das infecções prevalentes persistiu por mais de 6 meses, mas somente 7% depois de 5 anos.

O intervalo entre a exposição e o desenvolvimento da lesão pode ser de poucas semanas a vários meses ou demorar longos anos. Geralmente, os sinais citoarquiteturais de infecção por HPV ocorrem na faixa etária de 20 a 24 anos.

São freqüentemente benignos e declinam com a idade, provavelmente pela imunidade adquirida posteriormente. Alguns estudos sugerem que a infecção é transitória em mulheres jovens e, mais comumente, persistente em mulheres acima de 40 anos (MCLACHLIN, et al., 1997).

Segundo Cronjé (2004), uma pequena proporção das infecções pelo HPV progredirá para lesões precursoras do câncer. A média de idade das pacientes é de 25 anos para a neoplasia intraepitelial grau I, 29 anos para a neoplasia intraepitelial grau II e 34 anos para o grau III. Dois terços das neoplasias intraepiteliais grau I, metade das neoplasias intraepiteliais grau II e um terço das neoplasias intraepiteliais grau III regredem para colo normal. Finalmente, uma pequena proporção desenvolve câncer invasivo com idade em torno de 45 anos.

2.4 Caracterização Viral e Transformação Celular

Os papilomavírus humanos são pequenos vírus de DNA dupla fita, circular, contendo em torno de 8.000 pares de bases (Figura 1). Esses vírus fazem parte da família *Papillomaviridae*, sendo a partícula viral icosaédrica, não envelopada, com um diâmetro aproximado de 55 nm (GALLOWAY; MCDOGALL, 1989). A organização do genoma do HPV está bem caracterizada. A transcrição ocorre em direção única, provavelmente de um único promotor (BEUTNER; TYRING, 1997). O genoma pode ser dividido em três regiões distintas, localizadas na mesma fita de DNA, a região precoce (E - *early*), a região tardia (L - *late*) e a região longa de controle (LCR - *long control region*) (BEUTNER; TYRING, 1997).

A região precoce é constituída de aproximadamente 4.500 pares de base (BEUTNER; TYRING, 1997). Contém sete genes que codificam as proteínas não estruturais E1 e E2, envolvidas na replicação e no controle da transcrição, E4, ligada à maturação do vírus e à alteração da matriz intracelular, e E5, E6 e E7, responsáveis pela proliferação e transformação celular (PARK et al., 1997). Essas proteínas são expressas precocemente nas células da camada basal do epitélio escamoso estratificado do hospedeiro (CHOW; BROKER, 1997).

A região tardia possui dois genes com cerca de 2.500 pares de base que codificam as proteínas do capsídeo viral (BEUTNER; TYRING, 1997). O gene L1 codifica a proteína principal do capsídeo, enquanto o gene L2 codifica a proteína secundária do capsídeo (PARK et al., 1997). Essas proteínas são expressas abundantemente somente em ceratinócitos diferenciados. Estudos de comparação de seqüências entre diferentes tipos virais desta família mostram que E1, E2, L1 e L2 são bem conservadas em todos os membros da família (CHOW; BROKER, 1997).

A proteína E2 é um dímero composto por três domínios diferentes, um na porção amino-terminal ligado à ativação da transcrição, outro na região central responsável pela replicação do DNA e um domínio de ligação ao DNA na porção carboxi-terminal, que regula a atividade da proteína E2 (GIRI; YANIV, 1988). A ligação dessa proteína a seqüências específicas de DNA é o primeiro passo para o início da transcrição e replicação viral (HAM, 1994; DELL, 2003).

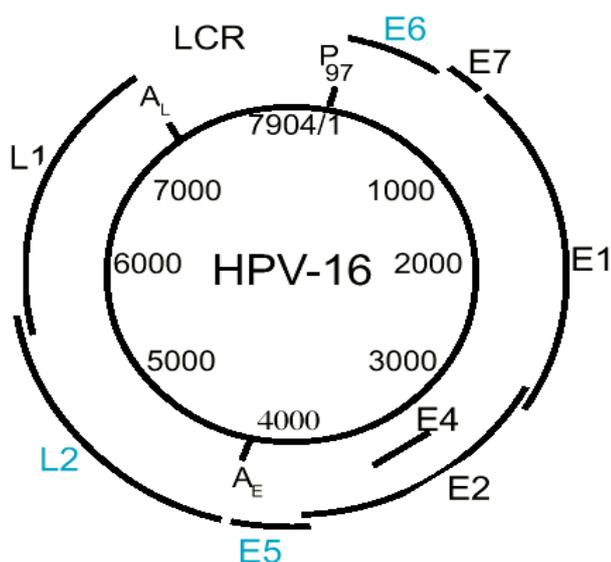


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO HPV 16. OBSERVA-SE UM ESQUEMA DA POSIÇÃO RELATIVA DOS GENES L1, L2, E1,

E2, E4, E5, E6, E7 E DA REGIÃO LCR NO GENOMA DO HPV 16.
P97= PROMOTOR DO GENE E6 (beutner; tyring, 1997).

O produto do gene E2 liga-se ao promotor P97 do HPV 16 e reprime a transcrição das proteínas E6 e E7, responsáveis pela transformação celular (ISHIJI, 2000). Quando o vírus integra no genoma do hospedeiro, a região E2 sofre mais freqüentemente deleção ou interrupção. Este evento libera a transcrição eficiente das proteínas oncogênicas E6 e E7, o que é considerado importante no desenvolvimento e progressão tumoral (GALLO et al., 2003).

O gene E4 situa-se dentro da região central do gene E2 e está sob controle do promotor de L1 (CHOW; BROKER, 1997), contudo, sua expressão foi observada nas células da camada parabasal, coincidindo com o início da replicação vegetativa do DNA viral (ROBERTS et al., 1993). Apesar das novas pesquisas, o papel da proteína E4 ainda é pouco conhecido (ZHAO et al., 2003).

A proteína E5 é hidrofóbica, preferencialmente encontrada no complexo de Golgi e na membrana plasmática, sendo expressa em infecções produtivas (ZUR HAUSEN, 1999). O gene E5 está freqüentemente deletado no carcinoma invasivo e não é necessário para imortalização de células humanas, na sua manutenção ou expressão do fenótipo de malignidade da célula infectada pelo HPV (SCHWARZ et al., 1985). Seu papel nos eventos iniciais da infecção natural da célula pelo HPV é pouco compreendido (ZUR HAUSEN, 2000).

A proteína viral E6 dos HPVs oncogênicos contém 150 aminoácidos (HUIBREGTSE; SCHEFFNER, 1994). Possui afinidade por metal e contém os motivos CR1 e CR2 presentes em E7, sugerindo uma relação evolutiva entre elas (STERLINKO et al, 2003). A proteína E6, quando codificada por um HPV de alto risco, atua formando um complexo terciário com a ubiquitina ligase E6-AP (proteína associada a E6). Este conjunto age como uma proteína de ligação a ubiquitina, induzindo a ubiquitinação e degradação da proteína celular p53 (HUIBREGTSE; SCHEFFNER, 1994).

A p53 desempenha um importante papel na manutenção da integridade do genoma, após exposição a um agente que agride o DNA. A p53 induz uma parada do ciclo celular na fase G1 em resposta ao dano sofrido, o que permite reparar o DNA antes de iniciar a síntese (MANTOVANI; BANKS, 1999). Se o reparo não for possível, a p53 pode induzir a morte celular programada a fim de evitar perpetuação do dano. A disfunção deste mecanismo de defesa da célula torna o genoma instável, podendo levar à transformação maligna (AHN, et al., 2004).

A principal proteína transformante dos HPVs de alto risco 16 e 18 é E7, possuindo aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos (HUIBREGTSE; SCHEFFNER, 1994). A proteína E7 contém três domínios. Os domínios CR1 e CR2, presentes na extremidade amino-terminal, possuem 21 aminoácidos e um domínio de ligação a metal na extremidade carboxi-terminal apresenta dois motivos CxxC separados por 28 aminoácidos. O domínio CR2 contém o motivo LxCxEx, essencial para a interação com pRB, p107 e p130 (HUIBREGTSE; SCHEFFNER, 1994; MUNGER, 2001).

A E7 liga-se a diversas proteínas celulares envolvidas no controle do crescimento celular, incluindo a proteína do retinoblastoma (pRb) e proteínas Rb-relacionadas, p107 e p130 e pode ativar membros da família do fator de transcrição E2F (MUNGER et al., 2001). Quando o DNA é danificado, o supressor de tumor pRB bloqueia o crescimento celular inibindo a progressão do ciclo celular entre as fases G1 e S. Ao formar o complexo com a oncoproteína E7 o efeito protetor da célula é perdido e o ciclo celular é completado inadequadamente (HUIBREGTSE; SCHEFFNER, 1994).

A origem de replicação do vírus está localizada numa região pouco conservada de 500 a 1000 pares de bases entre L1 e E6, chamada região longa de controle (LCR). Nesta região foram mapeados vários sítios para ligação de elementos regulatórios virais e celulares que, em conjunto, determinam a modulação positiva ou negativa da transcrição do genoma viral. Por exemplo, apresentam elementos responsivos a hormônios glicocorticóides e progesterona (DE VILLIERS et al., 2004).

A transcrição do HPV ocorre a partir de um único promotor, localizado à montante do gene E6. O promotor do HPV 16 é chamado de P97e o do HPV 18 é denominado de P105. Deles dependem a transcrição dos genes E6 e E7 (BAUKNECHT, 1995; GALLO, 2003).

O papel oncogênico do papilomavírus está bem estabelecido. A relação do HPV com a carcinogênese depende de vários fatores como tipo (MUÑOZ et al., 2003), presença de variantes intratipos (DE VUYST et al., 2003), carga pró-viral (GIULIANO et al., 2004), presença de infecção múltipla (FREGA, 2003; LEVI, 2004) persistência da infecção e integração com o DNA da célula hospedeira (HUDELIST et al., 2004). Todos estes fatores estão implicados na

expressão de várias oncoproteínas, principalmente E6 e E7 (KANG et al. 2004).

2.5 Formas Episomal e Proviral do HPV

O vírus penetra nas células epiteliais escamosas e só completa o seu ciclo de vida com a diferenciação do ceratinócito (DECHERNEY; NATHAN, 2003).

A fase precoce da replicação viral ocorre nas células da camada basal da epiderme ou mucosa, onde o genoma viral é mantido estabilizado e é distribuído homogeneamente para as células filhas, favorecendo a manutenção da infecção viral (FLAITS; HICKS, 1998). Nas camadas mais diferenciadas do epitélio escamoso estratificado acontece a forma vegetativa da infecção com a formação das partículas virais (FLAIT; HICKS, 1998).

O genoma do HPV é freqüentemente encontrado na forma episomal nas lesões precursoras. Sua integração nos cromossomos é considerada um evento importante na iniciação das alterações malignas e pode acontecer em lesões pré-malignas quando o HPV é do tipo oncogênico (CULLEN et al, 1991). Recentes estudos, como o de Gallo et al. (2003), onde a forma do DNA do HPV16 foi avaliada em mulheres jovens com lesão intraepitelial de baixo grau, mostrou estar integrado em mais da metade dos casos positivos para o HPV 16. Os autores sugerem que este evento molecular é anterior à manifestação da lesão invasiva do colo uterino e que a integração é independente do tempo e do grau da lesão.

Entretanto, o estudo de Hudelist et al. (2004) correlacionou diferentes níveis de integração viral com o grau de lesão do colo uterino. No epitélio normal e na neoplasia intraepitelial grau I e II infectados pelos HPVs 16 e 18 foram encontrados exclusivamente a forma episomal. Já em neoplasia epitelial grau III e carcinoma *in situ*, 50% dos casos de HPV 16 e 94% dos casos de HPV 18 estavam exclusivamente integrados ao genoma do hospedeiro. Do total, 13% dos casos exibiu seqüências nas formas episomais e integradas ao mesmo tempo. Estes achados sugerem que a integração nem sempre é requerida para progressão das lesões infectadas pelo HPV 16 e, em contraste, é sempre importante para transformação eficaz nas pacientes infectadas pelo HPV 18.

2.6 Classificação dos Papilomavírus

Os papilomavirus são vírus epiteliotrópicos, hospedeiro restrito, ocorrendo em muitos mamíferos e aves (STEWART et al., 1996). Mais de 100 diferentes tipos de HPV têm sido identificados em humanos e aproximadamente 40 deles são considerados infectantes de mucosa oral e genital. Destes, 15 são associados ao câncer, sendo conhecidos como oncogênicos (AL, 1999; SOUZA; VILLA, 2003).

Os papilomavírus são tradicionalmente descritos como “tipos”. O primeiro tipo viral foi isolado por Orth et al., em (1977). Nesta época, grandes quantidades de partículas e do DNA genômico virais eram obtidos de pacientes com verrugas comuns e epidermodisplasia verruciformis. Havia dificuldade em se achar um sistema de cultura apropriado para propagação dos vírus e realização de estudos funcionais. Conseqüentemente, a taxonomia baseada em propriedades biológicas não pôde ser estabelecida (DE VILLIERS et al., 2004).

Inicialmente, o desenvolvimento da taxonomia do papilomavírus baseou-se em hibridização cruzada de genomas e padrão de restrição a partir de um sistema baseado em algoritmos filogenéticos que comparam tanto seguimentos genômicos inteiros como seguimentos subgenômicos (BERNARD et al., 1994). Assim, o Comitê de Nomenclatura do Papilomavírus definiu que, para um isolado de HPV ser considerado um novo tipo, a seqüência nucleotídica das ORFs E6, E7 e L1 deveriam apresentar uma similaridade inferior a 90% em relação às seqüências já estabelecidas. Os subtipos virais eram considerados quando os genomas tinham uma variação na seqüência nucleotídica de 2 e 10% nesta mesma região gênica. Enquanto diferenças inferiores a 2% estão relacionadas com a detecção de novas variantes (RHO, 1994; XI, 1997).

Em 1995, um comitê formado por vários pesquisadores definiu que um novo isolado de papilomavirus seria reorganizado em um novo tipo se o genoma completo tivesse sido clonado e a seqüência da ORF L1 diferísse mais que 10% dos tipos clonados já conhecidos. Diferença entre 2% e 10% seria um subtipo e menor que 2%, uma variante. Esta clonagem de genomas completos tem sido abandonada devido à limitação em analisar grande quantidade de

amostras ou porque a seqüência do papilomavirus em questão revelava-se tóxica em vários sistemas de vetores (DE VILLIERS et al., 2004).

Na 18ª Conferência Internacional sobre Papilomavírus em 2002, ficou acordado que os possíveis novos tipos seriam identificados utilizando genomas de comprimento completo obtidos por sobreposição de fragmentos amplificados por meio da reação de polimerização em cadeia. O número do papilomavírus só é obtido após isolamento e caracterização do genoma completo que é, então, depositado no centro de referência para papilomavíroses, onde a seqüência é confirmada como novo tipo (DE VILLIERS et al., 2004).

Após o uso desta técnica, o número de papilomavírus isolados aumentou rapidamente, demonstrando a necessidade de uma nova classificação taxonômica. A realização desta classificação foi debatida por 30 anos, resultando na publicação da nova classificação em março de 2004. O seu objetivo foi estabelecer a relação entre os tipos de papilomavirus, comparar o termo “tipo de papilomavirus” com os termos taxonômicos de gênero e espécie freqüentemente aplicados em virologia e investigar a relação entre a classificação taxonômica e propriedades biológicas e patológicas do vírus (DE VILLIERS et al., 2004).

Esta classificação foi definida levando em consideração os critérios do Comitê Internacional em Taxonomia Viral e comparação de seqüências usando a ORF L1 de 96 tipos de papilomavirus humanos e 22 papilomavirus animais. Assim, a classificação oficial dos grupos filogenéticos dos tipos de papilomavírus ficou estabelecida em gênero, espécie e tipo espécie (DE VILLIERS et al., 2004).

Para o grupamento dos tipos de papilomavírus da ordem superior, como os que infectam a genitália, foi introduzido o termo “gêneros”. Diferentes gêneros apresentam homologia menor que 60% na ORF L1. Já os grupamentos de ordem inferior, foram nomeados de “espécie” e serão considerados dentro de um determinado gênero quando possuírem 60 a 70% de nucleotídeos idênticos. A classificação tradicional de um novo tipo dentro de uma espécie necessita de 71 a 80% de identidade dos nucleotídeos com a ORF L1 completa. Os subtipos continuam sendo definidos como anteriormente, bem como as variantes (DE VILLIERS et al., 2004).

De acordo com a nova classificação, existem 96 tipos isolados e caracterizados completamente. Para exemplificar, os HPVs 6, 11, 16 e 18 fazem parte da família *Papillomaviridae* e pertencem ao gênero Alpha-papilomavírus. Os HPVs 6 e 11 são classificados como baixo risco e os tipos 16 e 18 como alto risco. O tipo espécie HPV16 pertence à espécie 9 e o tipo espécie HPV 18 pertence à espécie 7. Os tipos 6 e 11 pertencem à espécie 10 (DE VILLIERS et al., 2004).

2.7 Variação Genômica do HPV 16

Alguns estudos da diversidade nas seqüências genômicas do HPV 16 demonstraram a presença de múltiplas formas variantes deste vírus. A definição de uma variante é baseada na comparação da seqüência encontrada com a seqüência do primeiro isolado de um carcinoma cervical invasivo identificado na Alemanha (SEEDORF et al., 1985). Essas variantes têm sido isoladas de regiões geográficas diferentes e identificadas pelo sequenciamento das regiões E6, L1, L2 e região longa de controle (LCR). Elas são conhecidas como Européia (E), Asiática (As), Americana-Asiática (AA), Africana (Af1 e Af2) e Norte Americana (NA) (STEWART et al., 1996).

A atual classificação dos papilomavírus identifica uma variante quando a seqüência da região L1 diferencia-se em até 2% dos seus nucleotídeos (DE VILLIERS et al., 2004). A maior parte da literatura concentra as suas atenções na variação da seqüência L1 e na região de controle longa (LCR) (BUONAGURO et al., 2000). No entanto, estudos de variação da região E6 têm sido realizados por diversos pesquisadores (GONZÁLEZ-LOSA et al., 2004).

Cepas variantes do HPV 16 têm sido apontadas como fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2001). No Brasil, Villa et al., (2000) sequenciando um seguimento do gene LCR do HPV 16 demonstraram que mulheres com variantes diferentes do protótipo europeu (EP) tendem a ter infecção persistente e que essas variantes são fortemente associadas com as lesões intraepiteliais de alto grau. Hildesheim et al. (2001), ao analisarem as seqüências da mesma região, identificaram substituição em diversas bases. Uma provável razão para o possível papel dessas variantes na

carcinogênese seria a modificação das ligações com os fatores de transcrição, alterando o padrão de expressão deste gene (ZUR HAUSEN, 2001).

Na Suíça, Zehbe et al. (1998) pesquisaram as variantes dos genes E6 e E7 do HPV 16, encontrando a maior freqüência de variação no resíduo 83 da seqüência E6. Este polimorfismo isolado ou combinado foi visto em 88% dos cânceres cervicais invasivos e 44% das neoplasias intraepiteliais grau III. Neste país, a variante L83V foi mais freqüente no câncer cervical do que o protótipo europeu (EP), sinalizando um maior risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino para as mulheres positivas. Variações no gene E7 foram extremamente raras e, quando presentes, ocorreram em associação com variações do gene E6, sugerindo que E7 é uma região mais conservada.

Na Índia, Pillai et al. (2002) identificaram cinco grupos de mutações no gene E6 do HPV 16 em adição à seqüência E6 original. O protótipo Europeu (350T) foi detectado em 9,1% do grupo estudado, enquanto a variante Européia 350G foi visto em 28% dos pacientes. O restante das variantes que é uma combinação da 350G com 335T, 145T ou 419G foi representada nas demais amostras. A variante 350G + 145T foi mais encontrada em mulheres jovens e as demais variantes mostraram predominância no grupo de maior idade, com exceção da 350G + 419T. Isto sugere que essas mutações representam maior agressividade do HPV 16, provavelmente por alterar a forma da inativação da p53, possibilitar uma ineficiente diferenciação dos ceratinócitos e alterar a resposta do sistema imune para estes mutantes E6 oncogênicos.

Um estudo das variantes do gene E6 do HPV 16, realizado em lesões intraepiteliais de baixo grau e câncer invasivo, no México por González-Losa et al. (2004) identificaram que a variante EP do HPV 16 foi predominante, tendo sido encontrada em 42,5% de todas as amostras. Nas lesões epiteliais de baixo grau o percentual foi de 66% da variante EP e 33% da variante EP350G. No grupo dos carcinomas invasivos, foi encontrado 44% da variante AA, 28% da EP, 24% da EP350G e 4% da F2.

Stewart et al. (1996) analisaram as variações intratipos nos HPV de menor prevalência na população mundial, utilizando as seqüências da região L1 amplificadas com os oligonucleotídeos MY09 e MY11. Espécimes encaminhados de diversos países foram incluídos neste estudo, dentre eles, o

Brasil. Os pesquisadores concluíram que, dentro de um mesmo tipo viral, a diversidade de nucleotídeos variou entre 0,2 and 2,9% e que a maioria das alterações eram similares.

Buonaguro et al. (2000) realizaram uma pesquisa com o objetivo de conhecer a prevalência dos HPVs e das variantes do HPV 16 presentes nas lesões anogenitais em homens e mulheres da Uganda. As regiões E6/E7, E2, L1 e LCR foram sequenciadas e identificaram seqüências da variante Af1 em 100% dos tecidos tumorais e 6,25% dos esfregaços. Os autores sugerem que pacientes portadores destas variantes estariam mais sujeitos à evolução para câncer.

O seqüenciamento dos HPVs oncogênicos em diversas regiões do mundo é importante para estabelecer uma base de dados que permita desenvolver vacinas, ferramentas eficientes para o diagnóstico, estudar o relacionamento entre genótipo e fenótipo e ainda, estudar a taxonomia e características evolutivas (GONZÁLEZ-LOSA et al., 2004).

2.8 Associação dos Papilomavírus oncogênicos com Lesões Intraepiteliais e Câncer Cervical

A associação entre HPVs de alto risco e câncer cervical é conhecida. Quanto às lesões intraepiteliais, a relação entre os tipos de HPV e o nível de acometimento histológico é menos clara (PARK et al., 1997). No entanto, os estudos têm demonstrado a maior prevalência do HPV 16 e 18 em lesões de alto grau em algumas partes do mundo, o que confirma o papel oncogênico atribuído a estes vírus (SCHLECHT et al., 2001).

Estudo realizado por Kalantari e Karlsen (1997) demonstrou que 71% das amostras examinadas foram HPV positivo em NIC I, sendo que o tipo 6 e 16 foram encontrados em igual quantidade. Em NIC II, o HPV 16 foi o tipo mais comum, embora o HPV 6 tenha ocorrido em 7,5% das amostras. Nos casos de NIC III, o tipo mais comum foi o HPV 16, seguido do HPV 33. Em todos os grupos ocorreu também infecção dupla ou múltipla.

CHO ET AL. (2003) REALIZARAM UM ESTUDO COMPARATIVO EM 685 ESFREGAÇOS CERVICOVAGINAL. 150 PACIENTES APRESENTAVAM LESÃO INTRAEPITELIAL DE BAIXO GRAU E 72, LESÃO INTRAEPITELIAL

DE ALTO GRAU. PARA O DIAGNÓSTICO FOI UTILIZADO MICROARRANJO DE DNA COMPOSTO DE 22 GENÓTIPOS, 15 DELES DE ALTO RISCO. EM RELAÇÃO À DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS 16 E 18 NAS LESÕES PRECURSORAS, O ESTUDO REVELOU QUE 26% DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS DE BAIXO GRAU ESTAVAM INFECTADAS COM HPV16 E 7,3% COM O HPV18. NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS DE ALTO GRAU, O PAPILOMAVÍRUS 16 FOI POSITIVO EM 51,3% NO HPV18 EM 9,7%.

O estudo realizado por Rosenblatt et al. (2004), no Brasil, objetivou encontrar incidência de HPV em mulheres com e sem lesões intraepiteliais e em seus respectivos parceiros. Este mostrou que 76% das mulheres com lesão intraepitelial tinham DNA do HPV e destes, 73% eram do tipo oncogênico de alto risco. Somente 23% dos parceiros eram portadores do vírus, sendo a maior parte deles do tipo de baixo risco oncogênico. No grupo sem lesão intraepitelial, 15% das mulheres tinham DNA do HPV versus 11% de seus parceiros.

Na população portadora do vírus sem lesão aparente, o HPV 16 é o tipo mais comum, embora somente a minoria destas mulheres desenvolverá o câncer cervical (XI et al.,1997). O trabalho de Cho et al. (2003) confirmou que, tanto em mulheres com o colo normal como naquelas com lesões inflamatórias ou metaplásicas, o HPV mais prevalente foi o 16 seguido do 18.

2.9 Fatores de Risco Adicionais para o Desenvolvimento do Câncer Cervical

A progressão das lesões do colo uterino infectado pelo HPV de alto risco ocorre em menos de 1% dos casos (CRONJÉ, 2004). Seu desenvolvimento requer um período prolongado envolvendo duas ou três décadas e obedece a múltiplos passos, indicando que fatores adicionais são requeridos para o processo de carcinogênese (CID-ARREGUI, 2003; BOYLE, 2003).

Os fatores de risco considerados mais importantes são o início precoce da vida sexual e o número de parceiros durante a vida (BORNSTEIN et al., 1995).

Isto ocorre principalmente devido à exposição precoce da junção escamo-colunar a agentes físicos, químicos e biológicos, além dos microtraumas que

ocorrem durante o coito, possibilitando a instalação dos vírus (MUÑOZ et al., 1996).

O comportamento sexual de risco predispõe à aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) além do papilomavírus (MAIMAN et al., 1998). A imunossupressão induzida pelo HIV aumenta a suscetibilidade à infecção pelo HPV (PETRY et al., 1994). Pereira et al. (2003) confirmaram que mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana têm alta taxa de prevalência de HPV e de persistência das lesões intraepiteliais.

O tabagismo aumenta o risco relativo para carcinoma de células escamosas, dependendo do tempo de exposição ao tabaco e quantidade de cigarros por dia. A nicotina e cotinina, constituintes do tabaco, geralmente estão presentes no muco cervical e podem provocar efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BORNSTEIN et al., 1995). Outro efeito provável é a depleção das células de Langerhans, que atuam na imunidade local contra a infecção pelo HPV, apresentando os antígenos aos linfócitos, tanto no colo normal como no infectado pelo HPV (POPPE et al., 1996).

O estudo realizado por Harris et al. (2003) confirmou que os produtos do cigarro podem contribuir para a evolução precoce das lesões relacionadas ao HPV, aumentando a taxa de células transformadas. Também o trabalho de Steckley et al. (2003), cujo objetivo era rever o papel do cigarro em diversos países, mostrou a importância do tabagismo no câncer cervical, principalmente nos países desenvolvidos. No Brasil, Cavalcanti et al. (2000) não conseguiram verificar a relação do cigarro com o estabelecimento do câncer, mas demonstraram seu significativo papel como cooperador na progressão da neoplasia.

Anormalidades citogenéticas dos cromossomos 1, 3, 11 e 17 nos carcinomas invasivos da cérvix são associados a carcinoma cervical causados pelos HPVs de alto risco 16, 18, 31 e 33, pois levam à instabilidade genômica (SOUTHERN et al., 1997). Na pesquisa desenvolvida por Dasgupta et al. (2003), na Índia, foi descrita a presença de deleção do cromossomo 3 e sua forte associação com a progressão de lesões pré-malignas para o câncer cervical. Também o cromossomo 4 apresentou deleção nos carcinomas cervicais, identificada por Sherwood et al. (2000).

O efeito dos esteróides sexuais estimulando o desenvolvimento das lesões induzidas pelo HPV é controverso. Evidências clínicas mostram que pode haver clara relação entre HPV e hormônios. Dentre elas estão o pico de incidência das lesões por HPV na 3ª década de vida, que é o período de efervescência hormonal da mulher, maior aparecimento das lesões induzidas por HPV durante a gestação e também durante o uso prolongado de anticoncepcional oral. A raridade da infecção na infância e na menopausa confirma esta suspeita (HILDESHEIN et al., 1990).

A longa região de controle (LCR) do genoma do HPV 16 contém sítios de ligação para os glicorticóides e a progesterona, com a função de modular a replicação celular (VERESS et al., 1996). O mecanismo de ação dos glicorticóides e da progesterona é estimular a transcrição do RNA, aumentando a expressão dos genes virais. Embora estes hormônios não sejam indispensáveis para o desenvolvimento das lesões virais, o HPV tem preferência pelas células com receptores para progesterona e cuja expressão é estimulada pela ovulação e gestação (PATER et al., 1994).

Negrine et al. (1990) mostraram um risco relativo de 4,6 vezes para o desenvolvimento de lesão intraepitelial em mulheres usuárias de anticoncepcional oral por mais de 5 anos. A persistência do HPV de alto risco em mulheres acima de 30 anos tem sido relacionada também com fatores hormonais. A prevalência de HPV 16 tem sido mostrada significativamente alta na fase lútea do ciclo menstrual (VERESS et al., 1996).

Adan et al. (2000) demonstraram que presença do HPV de alto risco e história de multiparidade são fatores de risco significativos nas lesões intraepiteliais de alto grau. Também a revisão realizada por Castellsagué et al. (2002) apresenta dados de diversos estudos epidemiológicos importantes que conferem risco adicional em mulheres múltiparas e naquelas que usam anticoncepcionais por longo tempo. Além disso, mulheres menopausadas usuárias da terapia de reposição hormonal combinada por longo tempo foram avaliadas por Smith et al. (2002) e os pesquisadores concluíram que há aumento significativo do risco de detecção das lesões causadas pelo HPV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Clínicas

A coleta de amostras deste estudo foi realizada no período de setembro de 2002 a dezembro de 2003. Os critérios de inclusão neste estudo foram a presença de vida sexual ativa em mulheres de 15 a 80 anos, útero preservado, ausência do uso de medicações vaginal por pelo menos quinze dias antes da coleta, ausência de tratamento das lesões intraepiteliais há 6 meses e diagnóstico prévio de lesões por meio da citologia ou colposcopia, confirmadas pelo exame histológico. Das pacientes encaminhadas à Unidade de Referência do Município de Ilhéus, Bahia, para tratamento das patologias do trato genital, foram incluídas 104 mulheres.

As pacientes responderam a um questionário sobre dados clínicos e epidemiológicos (Apêndice 1) para fornecer informações a respeito dos fatores de risco presentes na amostragem. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Itabuna-Bahia (Anexo).

A coleta foi realizada na cérvix uterina com escova ginecológica e espátula de Ayres, após consentimento livre e esclarecido (Apêndice 2). O material coletado foi agitado em tampão TE (100 mmol.L^{-1} de Tris pH 7.4 e 50 mmol de EDTA - etilenodiaminotetraacético) e encaminhado ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em Ilhéus, Bahia, em isopor contendo gelo, onde foi congelado a 20°C negativos por até um ano.

3.2 Extração de DNA

O DNA total foi extraído a partir de amostras de pacientes portadoras de lesões intraepiteliais cervicais utilizando-se o QIAamp® DNA Mini Kit (QUIAGEN) indicado para extrações de DNA humano. O procedimento de purificação consistiu de uma digestão prévia de 200 uL da amostra com proteinase K 0,2 ug/ul (INVITROGEN) por 10 minutos a 56 °C em 200 uL de tampão PBS (100 mmol/L de Na₂HPO₄, 27 mmol/L de KCl e 137 mmol/L de NaCl, pH 7,4), juntamente com 200 uL do tampão de extração do Kit. Os tubos, acrescidos de 200 uL de etanol 96%, foram centrifugados por 30 segundos a 6000 x g. Esta mistura foi passada pelas minicolunas por meio de centrifugação a 6000 x g durante 1 minuto para que somente o DNA ficasse ligado à coluna. Procedeu-se então a duas lavagens com tampões fornecidos pelo fabricante. O DNA foi eluído em água e ficou estocado a 20 °C negativos até o processamento.

3.3 Diagnóstico por PCR

3.3.1 Controle Interno das Amplificações

A detecção e identificação dos papilomavirus 16 e 18 foram baseadas em amplificação de DNA por meio da PCR, utilizando-se o termociclador PTC-200 da MJ Research. Os oligonucleotídeos (Tabela 1), GH20 e PCO4 foram usados como controle interno da amplificação e produziram um fragmento de 268 pb, correspondendo ao gene da β -globina (SAIKI et al., 1988). As condições para amplificação das amostras foram 95 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e, por fim, um tempo adicional de extensão de 10 minutos a 72 °C.

3.3.2 Detecção do DNA viral

OS OLIGONUCLEOTÍDEOS CONSENSO DEGENERADOS MY09 E MY11 (TABELA 01) FORAM UTILIZADOS PARA AVALIAR A PRESENÇA DE HPV NAS AMOSTRAS. ESTES OLIGONUCLEOTÍDEOS AMPLIFICAM A REGIÃO L1 DO GENOMA VIRAL, BASTANTE CONSERVADA EM TODOS OS

TIPOS DE HPV, GERANDO UM FRAGMENTO DE APROXIMADAMENTE 450PB (GRAVITT ET AL., 1998). AS CONDIÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS FORAM 95^o POR 5 MINUTOS, 40 CICLOS DE 95^o C POR 1 MINUTO, 55^o C POR 1 MINUTO, 72^o C POR 1 MINUTO, 72^o C POR 10 MINUTOS.

3.3.3 Detecção dos HPVs 16 e 18

O DNA EXTRAÍDO DAS 104 AMOSTRAS FORAM ANALISADAS POR PCR PARA DETECÇÃO DOS HPVS 16 OU 18, UTILIZANDO-SE OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS QUE AMPLIFICAM REGIÃO LCR DO GENOMA VIRAL. AS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E OS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS FORAM BASEADOS NA METODOLOGIA DESCRITA POR CUZICK ET AL. (1994), COM PEQUENAS ALTERAÇÕES. PARA O HPV16 OS OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS FORAM O 16A E O 16S (TABELA 1) E AS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO FORAM 95^o C POR 5 MINUTOS; 40 CICLOS DE 92^o C POR 30 SEGUNDOS, 54^o C POR 15 SEGUNDOS, 72^o C POR 30 SEGUNDOS E UM PASSO FINAL DE 72^o C POR 8 MINUTOS. PARA O HPV 18 OS OLIGONUCLEOTÍDEOS FORAM O 18A E O 18S E AS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO FORAM 92^o C POR 5 MINUTOS, 40 CICLOS DE 94^o C POR 30 SEGUNDOS, 70^o C POR 20 SEGUNDOS, 72^o C POR 30 SEGUNDOS, 72^o C POR 8 MINUTOS.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados, suas seqüências e a regiões correspondentes no genoma do HPV

Nome	Seqüência	Gene ou região correspondente	Produto esperado (pb)
GH20	5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'	β-globina humana	
PCO4	5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'	β-globina humana	268
My09	5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3'	Consenso - L1	
My11	5' GCMCAGGGWCTATAAYAATGG 3'	Consenso - L1	450
16 A	5' GCGATCCTGTCTGCTTTTATACTAA 3'	LCR	
16 S	5' AAGGCCAACTAAATGTCAC 3'	LCR	228
18 A	5' TGCAGCACGAATGGCACTGGCCTG 3'	E6	
18 S	5' CACGGCGACCCTACAAGCTACCTG 3'	E6	405

OBS: M = A + C, R = A + G, W = A + T, Y = C + T

TODAS AS REAÇÕES FORAM FEITAS PARA UM VOLUME FINAL DE 25 UL. UTILIZOU-SE O TAMPÃO TRIS-KCL (100MMOL/L DE TRIS, 50 MMOL/L KCL), 200 UMOL/L DE CADA DEOXINUCLEOTÍDEO, 25 PMOL DE CADA OLIGONUCLEOTÍDEO, 0,5 UNIDADES DE TAQ POLIMERASE (Ludwig, RS, BR), 2 MMOL/L DE CLORETO DE MAGNÉSIO (MGCL₂) E APROXIMADAMENTE 10 NG DE DNA.

OS PRODUTOS DAS AMPLIFICAÇÕES FORAM ANALISADOS POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,5%, CONTENDO BROMETO DE ETÍDIO NA CONCENTRAÇÃO 25UG/UL E DIGITALIZADA NO FOTODOCUMENTADOR EDAS 240 DA KODAK.

3.4 Sequenciamento Direto das Amostras Positivas para HPV 16

Quarenta e três amostras positivas para HPV16 foram submetidas ao seqüenciamento. Para tanto, as amostras foram inicialmente amplificadas com os oligonucleotídeos específicos para o HPV16 (Tabela 01) de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. Os fragmentos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5%, reamplificados e em seguida dessalinizados com o Prep A Gene - DNA Purification Systems Kit (Bio-RAD). Foram feitas quatro reações para seqüenciamento de cada fragmento, duas usando o oligonucleotídeos 16S e duas usando o 16A. Nas reações foram utilizados oligonucleotídeos na concentração de 3,5 umol/L e cerca de 2,5 µL do fragmento amplificado como molde, o que corresponde a cerca de 30 ng de DNA molde. Os demais parâmetros da reação obedeceram às recomendações do fabricante do "DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Premix" (MegaBace™) (Amersham Pharmacia Biotech Inc). A amplificação foi feita no termociclador PTC-200 (MJ Research) utilizando 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 01 minuto e 20 segundos por 39 ciclos. Os produtos das reações foram submetidos à análise no seqüenciador MegaBACE DNA Analysis System 1000 (Amersham & Life Science).

3.5 Análise de seqüências

As seqüências dos HPVs obtidas foram submetidas a comparações com seqüências previamente depositados no GenBank, utilizando o programa BLAST disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (ALTSCHUL, et al., 1997). Após a análise de comparação as seqüências foram montadas no programa CAP EST *Assembler* cujo endereço eletrônico é <http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>. Posteriormente foi feito um quadro para identificação de possíveis variantes por meio de alinhamento de seqüências no programa Multalin, disponível no endereço eletrônico <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin.html> usando como seqüência de referência o HPV16URRCC16.

3.6 Análise Estatística

A relação entre o grau de lesão e o tipo de vírus foi avaliada por análise não-paramétrica NPAR1WAY - SAS (SAS INSTITUTE, 1988). A associação entre o histórico de vida e o grau da lesão foi demonstrada pela análise multivariada, usando como variáveis a idade, o início da primeira relação sexual, o número de parceiro sexual, a paridade, o tabagismo e a presença do vírus. Os resultados da análise multivariada para tabagismo foram confirmados por meio da análise de qui-quadrado, NPAR1WAY - SAS (SAS INSTITUTE, 1988)

A inter-relação entre a infecção com os HPVs 16 e 18 e o histórico de vida também foi analisada por meio da análise multivariada considerando as variáveis anteriormente citadas. Para as duas análises foi utilizado o sistema MANOVA – SAS (SAS INSTITUTE, 1988).

Como o grau de associação entre duas variáveis pode ser resultado do efeito que tem uma terceira ou um grupo de variáveis sobre estas duas variáveis, foram analisadas as correlações parciais entre as variáveis relacionadas ao histórico de vida com presença da lesão. A análise do histórico de vida das pacientes com ausência ou presença dos HPVs 16 e 18 foi realizada para uma interpretação mais adequada dos resultados das análises multivariadas (CRUZ, 1997; CRUZ; REGAZZI, 1997). As correlações parciais representam as correlações em que os efeitos das demais variáveis são extraídos.

A identificação das diferenças a respeito do histórico de vida das pacientes com diferentes graus de lesão foi representada em figuras tridimensionais, com os eixos definidos pelos valores das variáveis relacionadas

ao histórico para simplificar a interpretação dos dados fornecidos pela análise (SAS gráfico).

4. RESULTADOS

4.1 Detecção dos Papilomavírus 16 e 18

As participantes apresentaram média de idade de 33 anos, variando entre 18 e 67 anos. A faixa etária de maior prevalência das lesões observadas pela histologia foi de 20-30 anos, seguida da faixa etária de 30-40 anos.

Todas as amostras foram adequadamente amplificadas com os oligonucleotídeos para o gene da β -globina humana GH20 e PCO4 (Tabela 1), indicando que o DNA genômico era viável para análise (Figura 4).

Uma primeira reação para detecção do DNA viral foi realizada com o par de oligonucleotídeos consenso degenerado MY09 e MY11 (Tabela 1), esperando-se amplificação de um fragmento de 450 pb. A maior parte das amplificações foi inespecífica (Figura 6), apesar das modificações realizadas na temperatura de anelamento e na concentração de magnésio. Por este motivo, esses dados não serão analisados neste momento.

Optou-se, portanto, por submeter todas as 104 amostras diretamente à amplificação com os oligonucleotídeos específicos para os tipos 16 e 18 (Figuras 7 e 8), correspondentes aos tipos de HPV de alto risco oncogênicos mais frequentes na população mundial. A maior prevalência foi do HPV16 correspondendo a 41,34% (43 das 104 amostras) da população estudada (Figura 2). O HPV18 estava presente em apenas 12,50% (13 das 104 amostras) (Figura 2). A taxa de infecção por ambos tipos de HPVs foi de 3,85%. As amostras negativas para estas reações podem representar a ocorrência de um outro tipo viral não avaliado nesta pesquisa.

4.2 Identificação dos HPVs 16 e 18 por grau de lesão intraepitelial

As 104 amostras foram divididas em dois grupos baseados no diagnóstico histológico, obedecendo à classificação de Bethesda revisada em 2001. O grupo 01 foi composto por 67 pacientes apresentando lesões intraepiteliais de baixo grau (LIE-BG) e o grupo 02 formado por 37 portadoras de lesões intraepiteliais de alto grau (LIE-AG).

De acordo com os grupos, a prevalência do HPV16 foi detectada em 31,34% (21/67) das pacientes com LIE-BG (Figura 3) e em pacientes com LIE-AG 54,05% (20/37) (Figura 4). O HPV 18 foi positivo em 8,95% (6/67) das pacientes com LIE-BG (Figura 3) e em 18,91% (7/37) das pacientes com LIE-AG (Figura 4), com maior presença nas lesões de alto grau. Em relação a infecção dupla, 4,47% das 67 pacientes com LIE-BG e 2,70% das 37 pacientes com LIE-AG possuíam os dois tipos virais.

Segundo o teste estatístico não-paramétrico há diferença significativa para o grau de lesão com a presença do HPV16 e HPV18 e a ausência de ambos (probabilidade Qui-quadrado = 0,0014) e não há diferenças para grau de lesão entre a presença de HPV16 e HPV18 (probabilidade Qui-quadrado = 0,3727).

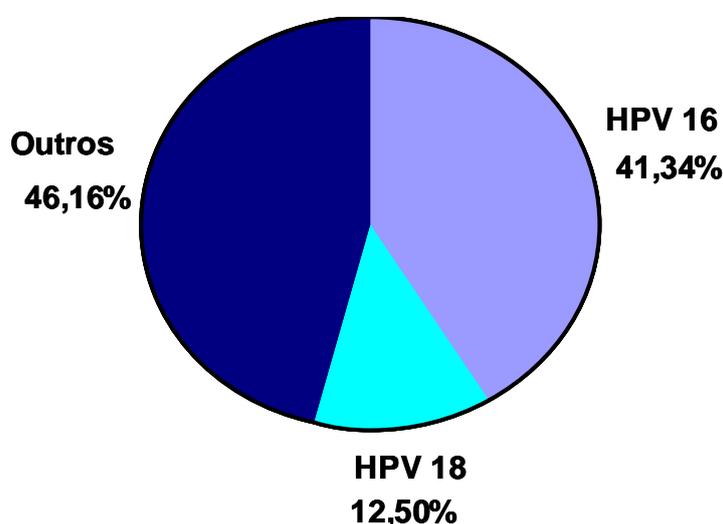


Figura 2 - Representação gráfica da porcentagem de detecção dos HPV16 e 18 nas 104 amostras coletadas. **Outros** representam as amostras que tiveram a lesão intraepitelial, mas estes tipos virais não foram identificados.

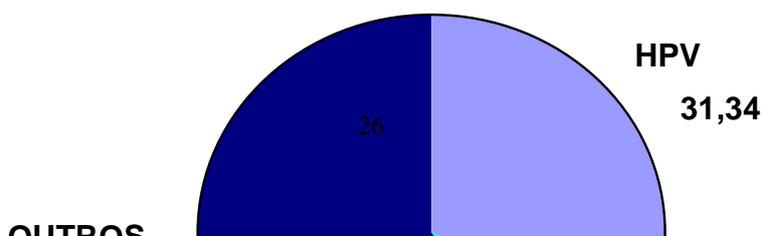


Figura 3 - Representação gráfica da percentagem de lesões intraepiteliais de baixo risco positivas para os HPVs 16 e 18 nas 104 amostras coletadas. **Outros representam as amostras que tiveram a lesão intraepitelial, mas não foi identificada a presença destes tipos virais.**

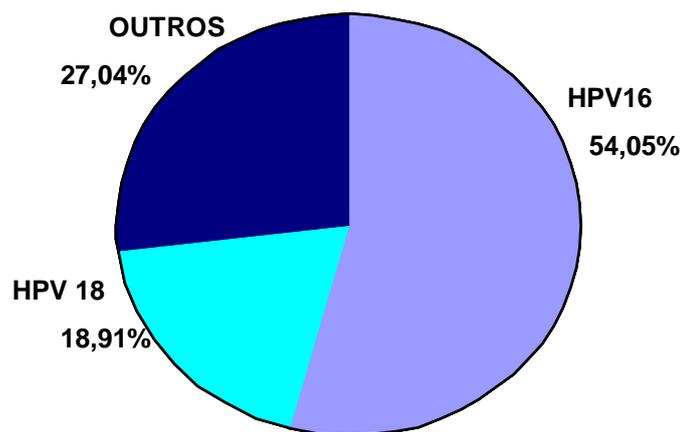


Figura 4 - Representação gráfica da percentagem de lesões intraepiteliais de alto risco positivas para os HPVs 16 e 18 nas 104 amostras coletadas. **Outros representam as amostras que tiveram a lesão intraepitelial, mas não foi identificada a presença destes tipos virais.**

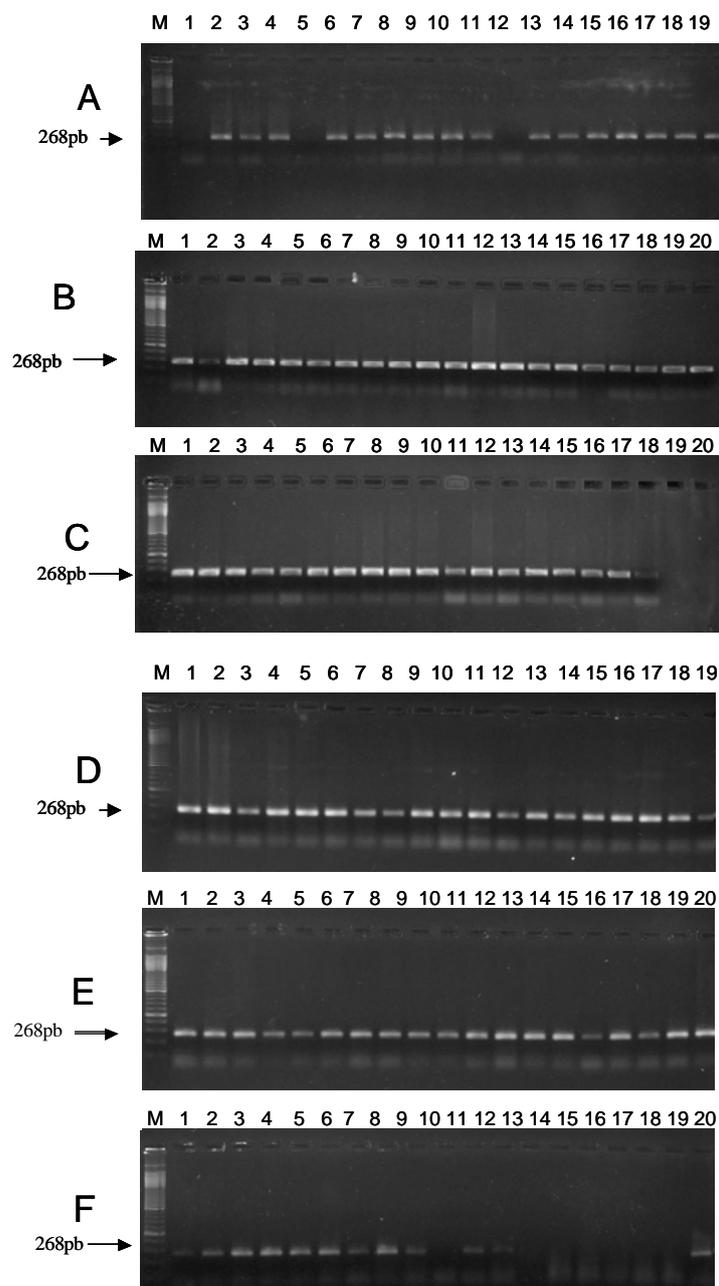


Figura 5 – Amplificação para a β -globina. Géis de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (0,25 ug/uL), mostrando o resultado da amplificação da região limitada pelos primers GH20 e PCO4 no gene da beta-globina humana. M = marcador de 100 pb (Life Technologies). As letras A a F, ao lado das fotos, indicam grupos de canaletas de um mesmo gel, e os números acima das fotos, cada uma das canaletas onde foram aplicados 25 uL da reação para cada amostra. As setas indicam o tamanho das bandas esperadas.

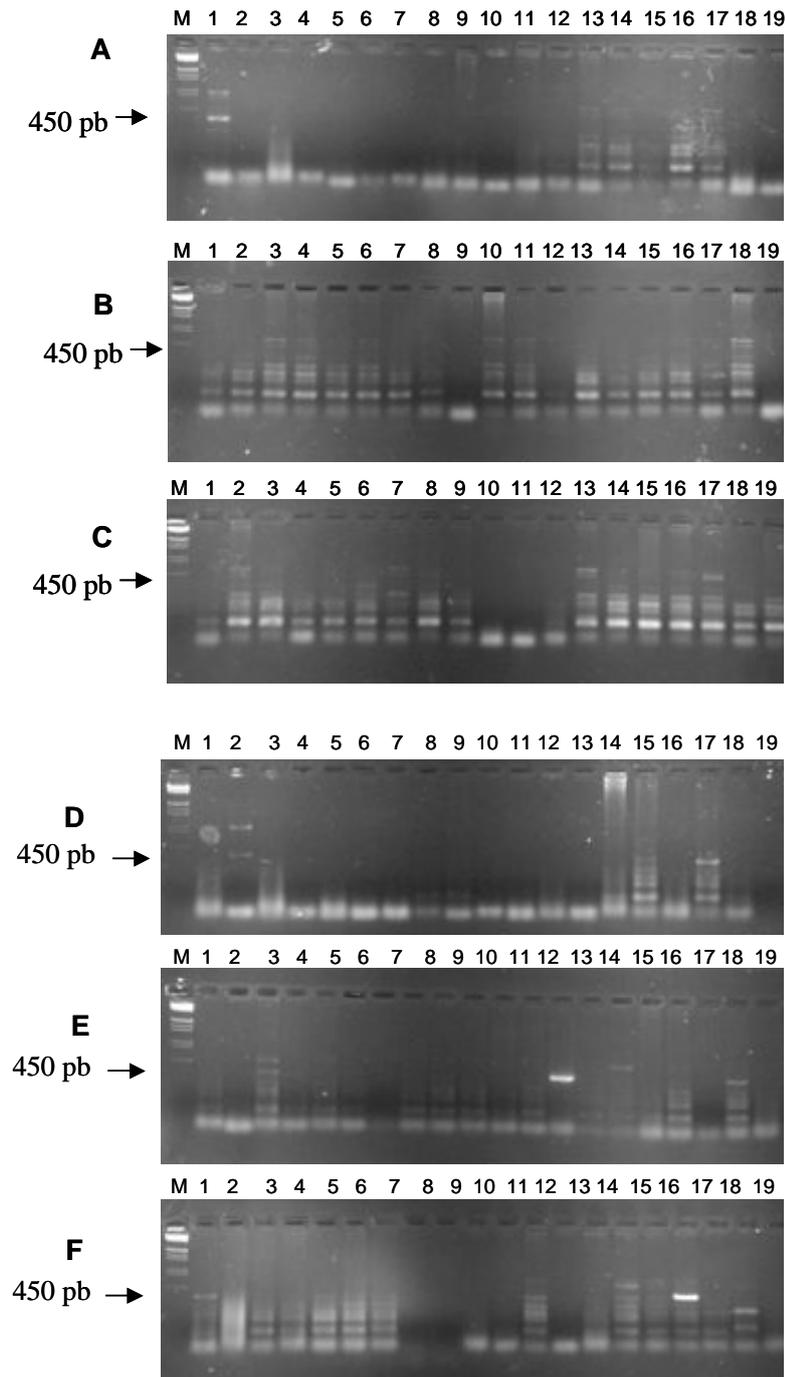


Figura 6 – Amplificação para a região consenso. Géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio (0,25 ug/uL) mostrando o resultado da amplificação da região limitada pelos primers MY09 e MY11. M = marcador de pb (Fago λ digerido com *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III). As letras A a C e D a F, ao lado das fotos, indicam grupos de canaletas de um mesmo gel, e os números no gel, cada uma das canaletas onde foram aplicados 25 uL da reação para cada amostra. As setas indicam o tamanho das bandas esperadas.

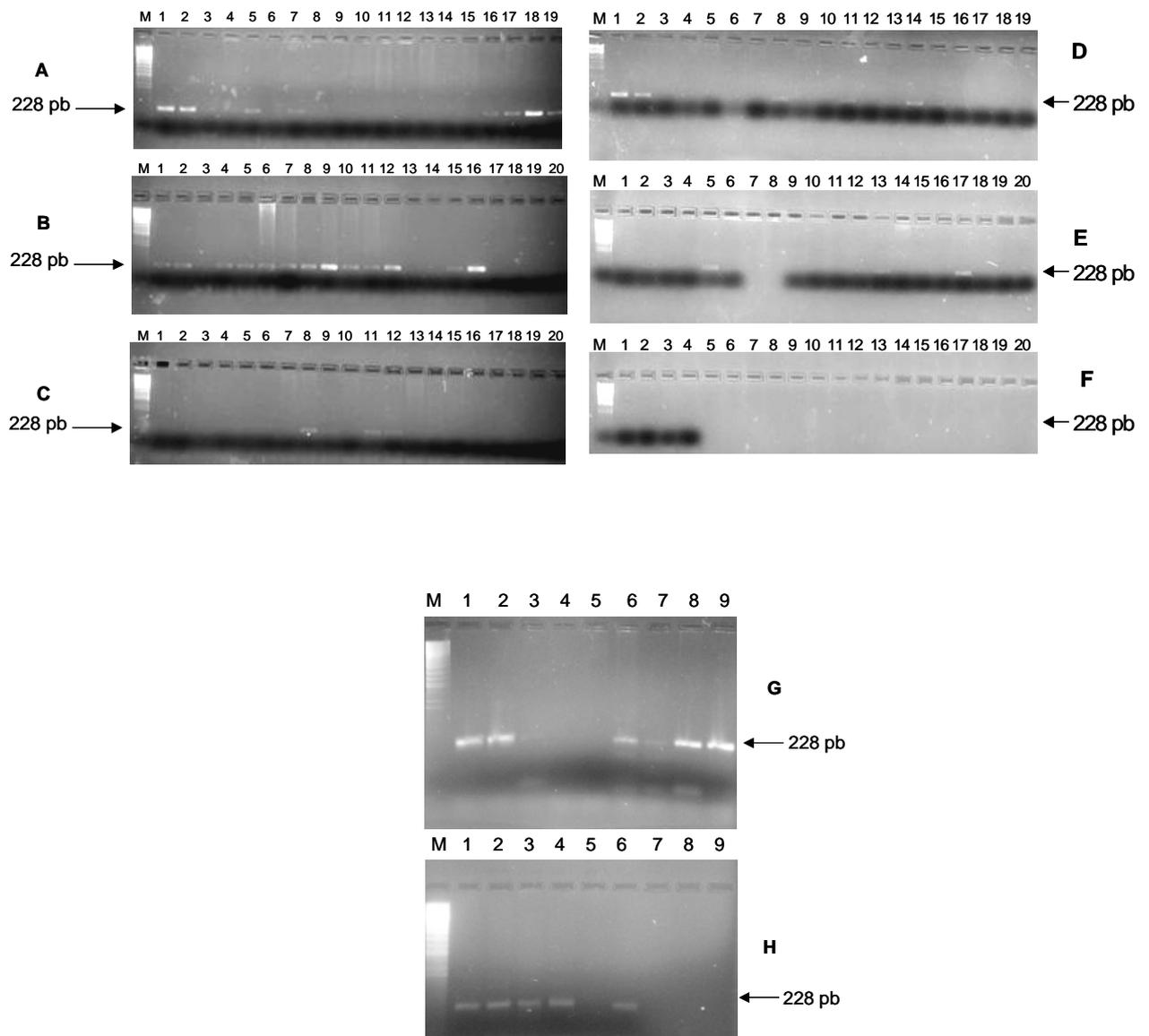


Figura 7 – Amplificação para o HPV 16. Géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio (0,25 ug/uL) mostrando o resultado da amplificação da região limitada pelos primers 16A e 16S. M = marcador de 100 pb (Life Technologies). As letras A a C, D a F e G a H, indicam conjuntos de canaletas diferentes dum mesmo gel e os números no gel, cada uma das canaletas onde foram aplicados 25 uL da reação para cada amostra. As setas indicam o tamanho das bandas amplificadas.

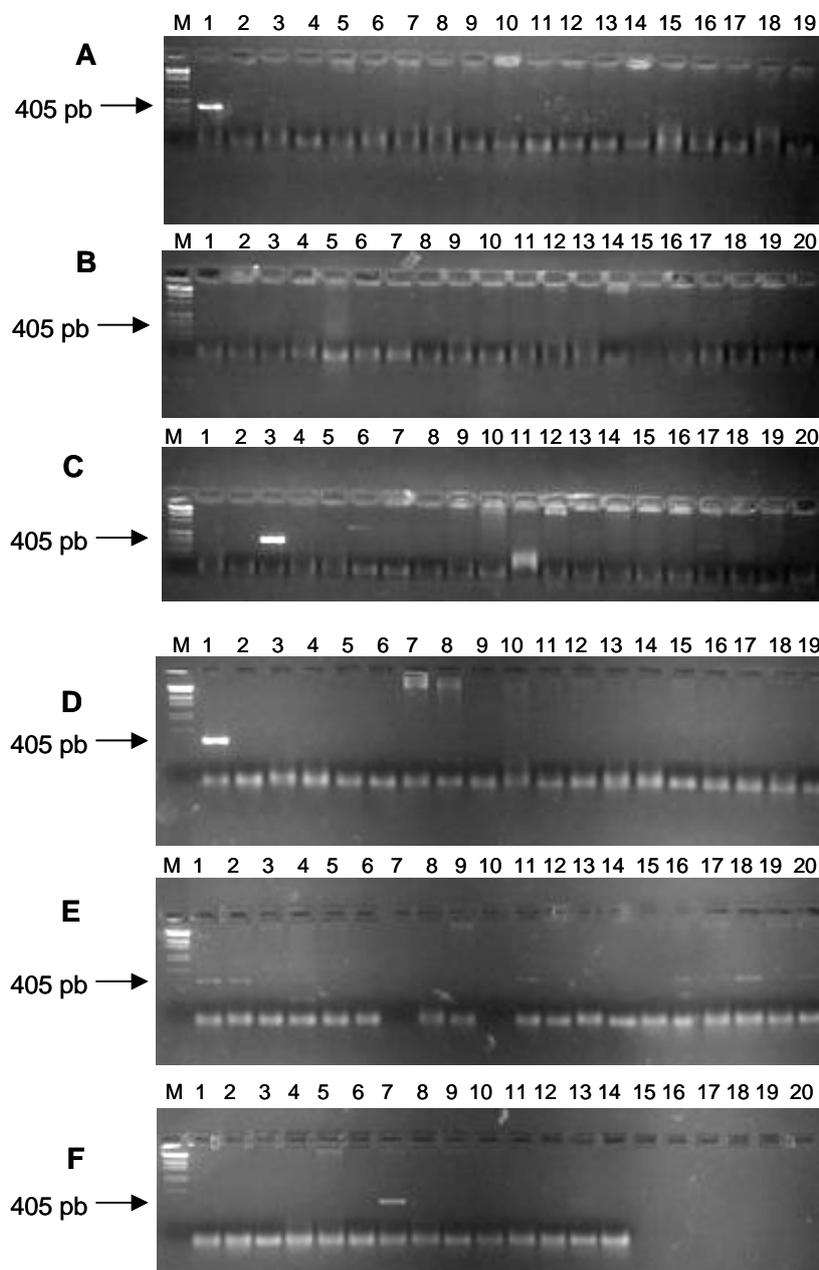


Figura 8 – Amplificação para o HPV 18. Géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio (0,25 ug/uL), mostrando o resultado da amplificação da região limitada pelos primers 18A e 18S. M = marcador de 100 pb (Fago λ digerido com *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III). As letras A a C e D a E indicam os conjuntos de canaletas diferentes de um mesmo géil e os números no gel, cada uma das canaletas onde foram aplicados 25 uL da reação para cada amostra. As setas indicam o tamanho das bandas amplificadas.

4.3 Detecção das variantes do HPV 16

Das 43 amostras positivas para o HPV16 encaminhadas ao seqüenciamento, apenas 25 resultaram em seqüências com qualidade e tamanho significativo, ou seja, maior que 100pb. Como resultado, foram alinhadas apenas 13 seqüências de HPV16 detectadas em pacientes com lesão intraepitelial cervical, que posteriormente foram analisadas, a fim de identificar e diferenciar os isolados. Essas treze seqüências foram escolhidas por apresentarem uma sobreposição da amplificação em 100 pares de bases (Figura 7). As demais necessitariam de novo seqüenciamento para que essa região fosse completada.

O isolado do HPV16 escolhido como molde para o alinhamento e determinação de possíveis variantes foi o seqüenciado de um carcinoma cervical da Alemanha, por ter sido o primeiro HPV a ser seqüenciado (SEEDORF et al., 1985). As seqüências apresentaram heterogeneidade menor que 2,8%, apontando para uma possível detecção de variantes (Figura 7).

Na seqüência E06 foram identificadas inserções de G e T nos nucleotídeos 56 e 76, respectivamente, quando comparado com o isolado padrão. A amostra C12 apresentou deleção do nucleotídeo C na posição 78. Na B05 ocorreram mutações nas posições 54 (T →G) e na 96 (C →T) e uma inserção de T na posição 98. Na B09 um T foi inserido na posição 26 e uma mutação aconteceu na posição 75 (A→T). A amostra B01 sofreu deleção dos nucleotídeos das posições 87 e 88, juntamente com

AMOSTRA	POSIÇÃO DO NUCLEOTÍDEO										
	26	29	54	56	75	76	78	87	88	96	98
E06				G		T					
C12							-C				
B05			T→G							T→C	T
B09	T				A→T						
B01		T→C						-T	-A		

Figura 7 – Alterações detectáveis por comparação das seqüências obtidas das amostras E06, C12, B05, B09 e B01 com o primeiro HPV16 seqüenciado na Alemanha. **As setas indicam substituição das bases nucleotídicas, os traços precedendo às letras indicam deleção da base.**

a mutação do nucleotídeo da posição 29 (T→C). s demais amostras foram expostas a múltiplas alterações, o que inviabiliza uma análise adequada. Um

novo seqüenciamento desses fragmentos será feito para confirmar a existência dessas diferenças.

4.4 Associação das lesões intraepiteliais ao histórico de vida

4.4.1 Análise Univariada

A idade, o início da relação sexual, o número de parceiros, a paridade e o tabagismo são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical e nas análises univariadas foram identificadas tendências a influenciar o aparecimento de lesão (Tabela 2) o tabagismo (0,0022 para F confirmada por não paramétrica – probabilidade Qui-quadrado= 0,0029).

4.4.2 Análise Multivariada

A análise multivariada do conjunto destes fatores mostrou diferenças significativas para os grupos de pacientes com alto e baixo grau de lesão em respeito ao histórico de vida (teste de Wilks significativo a 5% e valor de $p = 0,0289$). As pacientes com lesão intraepitelial de alto grau eram mais velhas (Figura 9), apresentavam um maior número de parceiros (Figura 9), iniciaram a vida sexual mais cedo (Figura 11), pariram mais (Figura 11) e eram, mais freqüentemente, tabagistas (Figura 10). As pacientes com lesão de baixo grau eram mais jovens (Figura 9), iniciaram a vida sexual mais tarde (Figura 11), tiveram um menor número de parceiros (Figura 11), menor número de filhos (Figura 11) e fumavam menos (Figura 10).

A análise multivariada da interação do histórico de vida com pacientes infectadas pelos HPVs 16 ou 18 foi realizada para analisar a importância de fatores de risco no comportamento do agente viral. Das cinco variáveis relatadas, foram consideradas quatro que mostraram alguma tendência de associação, como a idade da primeira relação sexual (probabilidade para F = 0,0215), número de parceiros (0,0860), paridade (0,1238) e tabagismo (0,0306). Foi identificada diferença significativa ($P = 0,0050$ para o teste de Wilks) entre os grupos com a consideração conjunta dos caracteres (Tabela 3). Esta análise dividiu as pacientes em dois grupos: as que tinham lesão intraepitelial e não eram infectadas pelo HPV 16 ou 18 eram mais velhas, iniciaram a vida sexual mais tarde, fumavam menos, no entanto, tiveram maior número de parceiros e

pariram mais e as pacientes que tinham lesão intraepitelial e eram infectadas pelo HPV 16 ou 18 ou ambos apresentaram um maior número de parceiros, pariram menos, no entanto eram mais jovens, iniciaram a vida sexual mais cedo e fumavam mais. Esta análise mostra que estes fatores de risco adicionais podem estar influenciando conjuntamente o desenvolvimento da lesão intraepitelial.

4.4.3 Análise de Correlação Parcial

Como as variáveis relativas ao histórico de vida estão interassociadas, não é possível afirmar que todas são, por si só, fatores de risco; e, analisando as

Tabela 2 – Análise de variância univariada dos fatores de risco

	Fatores de Risco				
	Idade	1ª Relação Sexual	N. de Parceiros	Paridade	Tabagismo
Probabilidade para F	0,2372	0,1603	0,1717	0,0792	0,0022

correlações entre estas e a presença de lesão constata-se que apenas o tabagismo preserva seus valores quando extraídos os efeitos das demais (Tabela 4). Quando analisada a inclusão da presença ou ausência dos vírus na consideração dos fatores que definem a presença de lesão, o tabagismo perde seu efeito e somente há correlação parcial significativa para a presença dos vírus oncogênicos (Tabela 5). Esta análise identifica os HPVs 16 e 18 como principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais e o efeito do tabagismo é explicado através da maior frequência dos vírus entre tabagistas.

Tabela 3 - Análise Multivariada da Interação entre o Histórico de Vida e a Presença de HPV 16 ou 18.

Fatores de Risco					
Infecção	Idade Média	Idade da 1ª Relação Sexual	N. de Parceiros	Paridade	Tabagismo
Outros HPVs	34	16	6	3	0.0943
HPV16 e 18	32	18	4	2	0.2549

P = 0,0050

Tabela 4 – Correlação parcial entre histologia e fatores de risco.

Pares de Variáveis	r simples	r parcial	t	Teste (1e5%)	Significância (%)
histologia x idade	0.1063	-0.0066	-0.0636	ns	94.7854
histologia x 1ªRS	-0.1199	-0.0222	-0.2151	ns	82.4863
histologia x parceiros	0.1187	0.0690	0.6702	ns	51.1626
histologia x paridade	0.1656	0.1018	0.9921	ns	67.5213
histologia x tabagismo	0.2683	0.2438	2.4369	*	1.5959

Tabela 5 – Correlação parcial dos fatores de risco com histologia

Pares de Variáveis	r simples	r parcial	t	Teste (1e5%)	Significância (%)
histologia x idade	0.1169	0.0499	0.4923	ns	62.9314
histologia x DPRS	-0,1387	-0.1148	-1.1387	ns	25.6575
histologia x parceiros	0.1350	0.1261	1.2522	ns	21.0908
histologia x paridade	0.1729	0.1039	1.0291	ns	30.6889
histologia x tabagismo	0.2971	0.1704	1.7028	ns	8.7879
histologia x HPV 16 ou 18	0.3156	0.3465	3.9381	*	0.0550

DPRS= idade da 1ª relação sexual

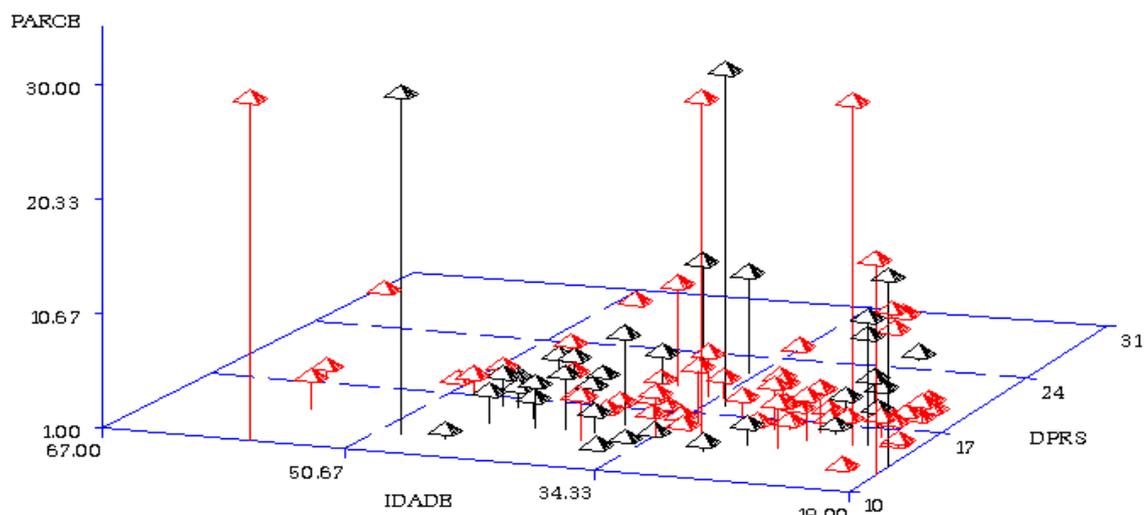


Figura 7 – Simulação, em três dimensões, da correlação entre o grau histológico da lesão e o número de parceiros, a idade e o início da vida sexual. Observa-se em Y o número de parceiros, em X, a idade e em Z, a data da primeira relação sexual (DPRS). Em vermelho, lesão intra-epitelial de baixo grau e em preto, lesão intra-epitelial de alto grau.

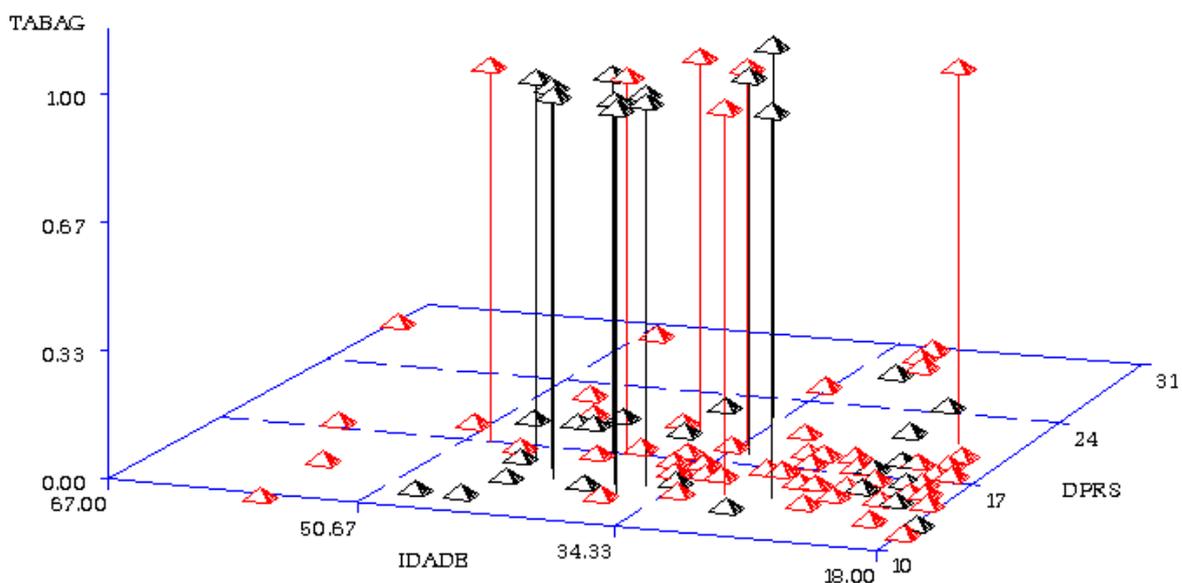


Figura 8 – Simulação, em três dimensões, da correlação entre o grau histológico da lesão e o tabagismo, idade e início da vida sexual. Observa-se em Y o número de pacientes que fazem uso do tabaco, em X, a idade e em Z, a data da primeira relação sexual (DPRS). Em vermelho, lesão intra-epitelial de baixo grau e em preto, lesão intra-epitelial de alto grau.

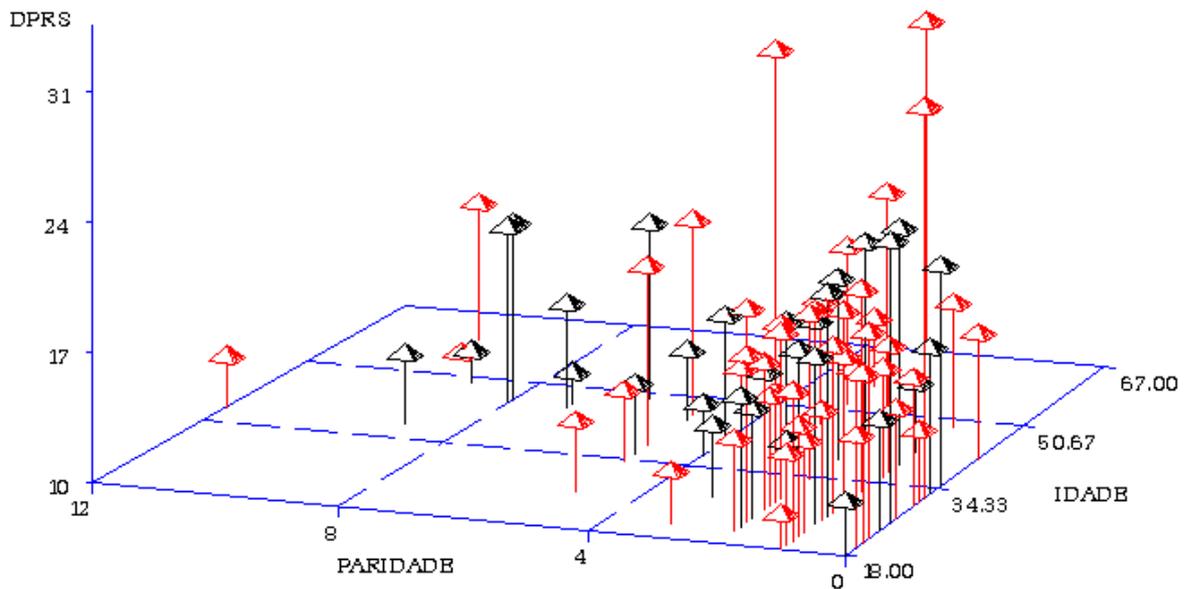


Figura 9 – Simulação, em três dimensões, da correlação entre o grau histológico da lesão e a paridade, início da vida sexual e idade. **Observa-se em Y a data da primeira relação sexual (DPRS), em X, a paridade e em Z, a idade. Em vermelho, lesão intra-epitelial de baixo grau e em preto, lesão intra-epitelial de alto grau.**

5. DISCUSSÃO

A identificação dos HPVs de alto risco e suas variantes em lesões precursoras do carcinoma cervical tem valor na medida em que poderiam indicar o risco de transformação maligna a que essas mulheres estariam sujeitas. Nas pacientes estudadas, o HPV 16 foi mais prevalente que o HPV 18.

Os resultados para a população estudada no presente trabalho coincidem com os encontrados na maioria dos países. Os HPV 16 e 18 foram os mais detectados em mulheres na França por Muñoz et al. (2003) e no México por Calleja-Macias et al. (2004). Aqui no Brasil, o estudo realizado no Estado do Pará por Cavalcante (1998) mostrou HPV16 positivo em 54,5% das pacientes com lesão intraepitelial de alto grau.

No entanto, em outras regiões do mundo, o tipo de vírus predominante foi diferente. Em Nairobi, Kenia, De Vuyst et al. (2003) mostraram que os tipos mais encontrados foram o HPV53, seguido do 16. No oeste da África, a maior frequência foi do tipo 45 e o tipo 39 tenha predominou na América Central e em alguns países da América do Sul (BOYLE et al, 2003). O HPV18 foi particularmente comum no sul e leste da Ásia (MUÑOZ et al., 2003). Estes dados confirmam a importância da identificação dos tipos virais em diversas regiões do mundo e reforçam o interesse em continuar o presente estudo no sentido de identificar os outros tipos virais contidos nas amostras selecionadas.

A taxa de infecção dupla por HPV 16 e 18 foi de 3,85%, envolvendo pacientes com lesão de baixo risco e de alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical. A infecção múltipla parece estar envolvida na progressão da doença, segundo a literatura, mas não foi o foco deste estudo. Vários pesquisadores têm identificado co-infecção viral em uma mesma amostra como Levi et al., (2000), no Brasil, e Huang et al. (2003) em Taiwan. O interesse dos pesquisadores sobre este assunto tem aumentado em resposta à possibilidade

de desenvolvimento de vacinas, pois a resposta imune do hospedeiro parece ser tipo específico.

No estudo multicêntrico realizado por Rousseau et al. (2001), envolvendo o Brasil, Canadá e Estados Unidos da América, um quinto da população estudada apresentou infecção múltipla, mas a progressão das lesões foi independente da presença de co-infecção. No entanto, em Jacarta, na Indonésia, Schellekens et al. (2004) estudaram a distribuição dos tipos virais em carcinoma e adenocarcinoma do colo uterino e uma prevalência significativa de infecção múltipla estava presente nos adenocarcinoma. As pacientes com infecção dupla, identificadas no presente estudo, deverão ser acompanhadas para observação do comportamento destes vírus após o tratamento das lesões intraepiteliais.

Uma limitação encontrada no presente trabalho foi a impossibilidade de detecção de um amplo espectro de HPV nas amostras utilizando os oligonucleotídeos consenso MY09 e MY11. Esta análise não foi possível por causa da ocorrência de ampliações inespecíficas (Figura 3). Estes oligonucleotídeos, atualmente, têm sido utilizados em conjunto com outros grupos de oligonucleotídeos como o GP5+ e GP6+, uma vez que foi relatada uma taxa inadequada de falso-negativos com o seu uso exclusivo (REMMERBACH et al., 2004). No presente trabalho, a amplificação irregular pode ter sido devido a parâmetros inadequados. Posteriormente, a discriminação de amostras contendo o vírus pode ser realizada associando um novo par de oligonucleotídeos, como sugerido na literatura, ou por meio de Southern Blotting.

O presente estudo se propôs avaliar a associação entre a prevalência de cada tipo viral estudado por grau de lesão histológico. Confirmando o relato da literatura, tanto o HPV16 como o HPV18 foram mais prevalentes em lesões intraepiteliais de alto grau, 54,05% e 18,91%, respectivamente. Quando foi analisada a possível associação entre o diagnóstico de HPV oncogênico e lesão histológica, o teste do qui-quadrado foi significativo ($p = 0,0014$), demonstrando que a presença do vírus está associada com a agressividade da lesão nas pacientes investigadas.

As taxas de positividade dos HPVs de alto risco em cada grupo histológico correspondem aos encontrados em outros estudos realizados no Brasil e em vários países. A pesquisa de Borges et al. (2004) realizada em Minas Gerais, no Brasil, observou que, das 110 mulheres estudadas, 71 tinham diagnóstico de lesão de alto grau. Destas, 85,9% eram positivas para HPVs de

alto risco. Na Espanha, De Sanjose et al., (2003) demonstraram forte associação entre a presença de HPV e lesão intraepitelial de alto grau.

Os dados de sequenciamento do HPV16 obtidos neste presente trabalho são preliminares. Apenas 5 seqüências apresentaram diversidade de nucleotídeos menor que 2,8%. As alterações encontradas, como inserções, deleções e substituições, não permitiram confirmar a identificação de uma variante, porque a região analisada é considerada pequena (Figura 6). Além disso, não foram suficientes para realizar o agrupamento das alterações dos nucleotídeos verificadas durante o sequenciamento desses fragmentos. Isto seria importante para validar a presença de novas variantes na população estudada ou verificar se já foram descritas em outros estudos. Todas as amostras serão novamente sequenciadas a fim de obter resultados que permitam este tipo de análise, e, no caso de serem identificadas variantes, relacioná-las com o grau de lesão presente nas pacientes deste estudo.

Os problemas encontrados no seqüenciamento deveram-se, possivelmente, à implementação da metodologia do seqüenciamento direto no Laboratório de Biologia Molecular - UESC durante a obtenção desses dados, o que levou a perdas no processamento das amostras, além da pequena quantidade de DNA resultante do procedimento de purificação, uma vez que as recomendações do Kit Prep-A-gene (Bio-Rad) esperam perdas consideráveis de DNA no caso de fragmentos com tamanho inferior a 300pb.

Na análise univariada, os fatores de risco adicionais mostraram uma tendência a influenciar no grau de lesão, mas apenas o tabagismo pôde ser considerado como fator de risco adicional.

Em relação à associação entre o histórico de vida e o grau de lesão, com as variáveis analisadas em conjunto pela análise multivariada, nota-se, com clareza, a presença de dois grupos distintos. As pacientes com lesão intraepitelial de baixo grau que tiveram um histórico de vida mais saudável e as pacientes com lesão de alto grau que tiveram um histórico de vida mais favorável ao desenvolvimento de lesões, principalmente quando analisados o tabagismo e a paridade. Para as pacientes com lesão de baixo grau, o fato de manterem uma vida mais saudável, não foi suficiente para impedir o desenvolvimento de lesões. Isto sugere que a presença do vírus oncogênico influenciou no desenvolvimento da lesão. Entretanto, o histórico de vida menos

saudável do segundo grupo parece ter influenciado o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau.

Quando foi extraído o efeito de outras variáveis sobre o tabagismo e a presença de lesões, foi verificada uma correlação parcial significativa, demonstrando que o tabagismo poderia estar influenciando diretamente o desenvolvimento dessas lesões. No entanto, com a inclusão da presença ou ausência dos vírus na consideração dos fatores que definem a presença de lesão, verifica-se que a relação entre o tabagismo e a presença da lesão se perde, de modo que o fator primário para o desenvolvimento de lesões é a presença dos vírus. A análise de correlação parcial entre a presença dos vírus 16 e 18 e o grau de lesão mostrou forte associação destes vírus e as lesões intraepiteliais ($p = 0,0550$ à 5%), confirmando que a presença do vírus oncogênico é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais.

Através destas análises, ficou evidente que há maior frequência dos vírus entre tabagistas, mas não está claro qual é o efeito do tabagismo no desenvolvimento das lesões. O tabagismo pode estar atuando como facilitador da instalação da infecção viral, provavelmente agindo sobre as células de Langerhans como já descrito, mas necessita de maiores investigações. Diversos estudos provam a participação do tabagismo neste processo, como exemplo, Matsumoto et al. (2003), que relataram interação significativa entre o tabagismo e a presença de lesão intraepiteliais cervical em mulheres do Japão. Castellsagué et al. (2002) chegaram à conclusão que as pacientes positivas para HPV que evoluíram para lesão intraepiteliais de alto grau e câncer invasivo fumavam mais e tinham maior número de filhos. Outros co-fatores como longo tempo de uso do anticoncepcional oral e outros agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis também foram identificados como associados ao risco de progressão das lesões, mas não foram pesquisados no presente trabalho.

No entanto, nos Estados Unidos da América, Ho et al. (1998) mostraram que o risco de adquirir a infecção pelo HPV foi maior em mulheres mais jovens e a persistência da infecção por mais de seis meses foi relatada nas mulheres mais velhas, portadoras de HPVs oncogênicos e com múltiplos tipos, mas não observaram associação com tabagismo.

Outros fatores, não analisados neste estudo, principalmente o nível social das pacientes, condições nutricionais, higiene e doenças sexualmente transmissíveis podem estar influenciando o grau das lesões estudadas. No caso desta população, quanto ao nível social, parece não haver ampla distinção entre as classes sociais, pois inclui pacientes usuárias do serviço público, entretanto estes dados necessitam de melhor investigação. Os fatores de risco adicionais que apenas demonstraram tendência à influenciar o desenvolvimento do câncer, avaliados no presente estudo podem apresentar análise estatística significativa em outros trabalhos como é o caso da pesquisa realizada por Boyle et al. (2000). Provavelmente, a importância dos fatores de risco adicionais poderia ser melhor avaliada aumentando-se a população estudada e ajustando-se o desenho deste estudo.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O tipo de HPV oncogênico pesquisado mais prevalente foi o HPV16, comparado com o 18, principalmente entre as pacientes com lesão de alto grau.

A presença dos vírus oncogênicos é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais do colo uterino na população estudada, concordando com a maioria dos estudos realizados em todo o mundo.

Os resultados do sequenciamento ainda não são conclusivos, mas apontam para a detecção de variante do HPV16. Se isto for confirmado, este estudo poderá contribuir para o programa de desenvolvimento de vacinas capazes de imunizar as mulheres residentes nesta área e em outras localidades do mundo.

O fator de risco adicional mais significativo nesta população foi o tabagismo, agindo provavelmente como facilitador da infecção viral. A partir destes dados, pode-se montar estratégias a fim de educar a população a ter hábitos de vida mais saudáveis, ajudando a promover a saúde e prevenir o aparecimento do câncer cervical.

A perspectiva para um futuro próximo é a continuação deste trabalho, com a padronização das condições de amplificação dos oligonucleotídeos MY09 e MY11 além da utilização dos oligonucleotídeos GP5+ e GP6+ para detecção de DNA dos papilomavirus e o uso de oligonucleotídeos específicos para os demais tipos de HPV, a fim de inferir a taxa de infecção múltipla nas pacientes estudadas. Além disso, fazer novamente o sequenciamento das amostras positivas para o HPV16, para a confirmação da presença de variantes no Sul do Estado da Bahia.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAM, E.; BERKOVA, Z.; DAXNEROVA, Z; ICENOGLE, J. et al. Papillomavirus detection: Demographic and Behavioral Characteristics Influencing the Identification of Cervical Disease. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 182, p.257-264, 2000.

AHN, W.L., BAE, M.S.; LEE, M.J. et al. **Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and Cell-specific growth suppression of human Cervical Cancer Cells in vitro and vivo.** Gynecologic Oncology, v. 92, p. 611-621, 2004.

AL, W.; TOUSSAINT, E. e ROMAN A. CCAAT Displacement Protein Binds to and Negatively Regulates Human Papillomavirus Type 6 E6, E7, and E1 Promoters. **Journal of Virology**, v. 73, p. 4220-4229, 1999.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs.** Nucleic Acids Research v. 25, p. 3389-3402 1997.

BAUKNECHT, T; JUNDT,F; HERR, I; OEHLER,H.D.; SHI, Y; ANGEL,P; ZUR HAUSEN, H.. A Switch Region Determines the Cell Type-Specific Positive or negative Action of the Human Papillomavirus Type 18 Promoter. **Journal of Virology**, v. 69, p. 1-12, 1995.

BERNARD H-U.; CHAN S.; MANOS, M.; ONG, C-K., VILLA, L.; DELIUS, H.; PEYTON, C; BAUER,H; WHEELER, C.. Identification and Assessment of Known and Novel Human Papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction Fragment Length Polymorphisms, Nucleotide Sequence, and Phylogenetic Algorithms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170 p.1077-1085, 1994.

BEUTNER, K.R.; TYRING, S. Human Papillomavirus and Human Disease. **The American Journal of Medicine**, v. 107, p. 9-15, 1997.

BORGES, S.C.V.; MELO, V.H.; JÚNIOR, G.M. et al. Detection Rate of Human Papillomavirus by Hybrid Capture II in Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. **RBGO**, v. 26, p. 105-110, 2004.

BORNSTEIN, J.; RAHAT, M. A. e ABRAMOVICI, H. Etiology of Cervical Cancer: Current Concepts. **5 CME REVIEW ARTICLE- Obstetrical and Gynecological**, v. 50, 1995.

BOYLE, P.; MAISONNEUVE, P.; AUTIER, P. Update on Cancer Control in Women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.70, p. 263-303, 2000.

BOYLE, P.; AUTIER, P.; BARTELINK, H.; BASELGA, J.; BOFFETTA, P.; BURN, J.; BURNS, H.J.G.; CHRISTENSEN, I. et al. European Code Against Cancer and Scientific Justification: Third Version (2003). **Annals of Oncology**, v.14, p. 973-1005, 2003.

BUONAGURO, F.M.; TORNESELLO, M.L.; SALATIELLO, I.; OKONG, P.; BUONAGURO, L.; BETH-GIRALDO, E.; BIRYAHWAHO, B.; SEMPALA, S.D.K.; GIRALDO, G. The Uganda Study on HPV Variants and Genital Cancers. **Journal of Clinical Virology**, v. 17, p. 31-41, 2000.

CALLEJA-MACIAS, I.E.; KALANTARI, M.; HUH, J.; ORTIZ-LOPES, R. AND et al. Genomic Diversity of Papillomavirus-16, 18, 31, and 33 Isolates in a Mexican Population and Relationship to European, African, and Native American Variants. **Virology**, v. 319, p. 315-323, 2004.

CATES, W.. Estimates of the Incidence and Prevalence of Sexually Transmitted Diseases in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 26, p. 2-7, 1999.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; Environmental Co-Factors in HPV Carcinogenesis. **Virus Research**, v. 89, p. 191-199, 2002.

CAVALCANTE, V.L.N. Human Papillomavirus Associated with Lesions of Uterine Cervix. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 399-400, 1998.

CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; PASSOS, M.R.L.; OLIVEIRA, L.H.S. Epidemiological Aspects of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer in Brazil. **Journal of Infection**, v. 40, p. 80-87, 2000.

CHO, N.H.; AN, H.J., JEONG, J.K., KANG, S; KIM, J.W.; KIM, Y.T.; ARK, T.K.. Genotyping of Human Papillomavirus Types by DNA Chip in Chorean Women: Comparison with Cytologic Diagnosis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 188, p. 56-62, 2003.

CHOW, L.T.; BROKER, T.R. Small DNA Tumor Viruses In Viral Pathogenesis, Ed Lippincott Raven Publishers Philadelphia e New York, cap. 12, 1997.

CID-ARREGUI, A.; JUÁREZ, V.; ZUR HAUSEN, H.. A Synthetic E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16 That Yields Enhanced Expression of the Protein in Mammalian Cells and Is Useful for DNA Immunization Studies. **Journal of Virology**, v. 77, p. 4928-4937, 2003.

CRONJÉ, H.S. Screening for Cervical Cancer in Developing Countries. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 84, p. 101-108, 2004.

CRUM, C.P. Symposium Part 1: Should the Bethesda System Terminology be Used in Diagnostic Surgival Pathology?: Point. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 22, p. 5-12, 2002.

CRUZ, C.D. Programa GENES; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, UFV, 442p., 1997.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, UFV, 390p., 1997.

CULLEN, A.P.; REID, R.; CAMPION, M.J.; LORINCZ, A.T. **Analysis of the Physical State of Different Human Papillomavirus DNAs in Intraepithelial and Invasive Neoplasm.** Journal of Virology, v.65, p. 606-612, 1991.

CUZICK, G. TERRY, L.H. **Type-Specific Human Papillomavirus DNA in Abnormal Smears as a Predictor of High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia.** Journal of Cancer, v. 69, p. 167-171, 1994.

DASGUPTA, S.; CHAKRABORTY, S.B.; ROY, A.; ROYCHOWDHURY, S.; PANDA, C.K. **Differential Deletions of Chromosome 3p Are Associated with the Development of Uterine Cervical Carcinoma in Indian Patients.** Journal Clinical of Pathology: Molecular Pathology, v. 56, p. 263-269, 2003.

DECHERNEY, AH.; NATHAN, L.. Current. Obstetric & Gynecologic. Diagnosis & Treatment. **Ninth edition, ed. Mc Graw Hill, p. 581, 2003.**

DELL, G.; TRANTER, R.; PARISH, R.L.B; GASTON, K. Comparison of the Structure and DNA-binding Properties of the E2 Proteins from an Oncogenic and a Non-Oncogenic Human Papillomavirus. **Journal of the Molecular Biology, v. 334, p. 979-991, 2003.**

DE PALO, G. **Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior.** Editora Médica e Científica (MEDSI), 1993.

DE SANJOSE, S.; ALMIRALL, R.; LLOVERAS, B. et al. **Cervical Human Papilomavirus Infection in the Female Population in Barcelona, Spain.** Sexually Transmitted Diseases, p. 788-793, 2003.

DE VILLIERS, E-M.; FAUQUET, C; BROKER, T.; BERNARD H-U; ZUR HAUSEN, H. **Classification of Papillomaviruses.** Virology, v. 324, p. 17-27, 2004.

DE VUYST, H.; STEYAERT, S.; VAN RENTERGHEM, L. et al. Distribution of Human Papillomavirus in a Family Planning Population in Nairobi, Kenya. **Sexually Transmitted Diseases, v. 30, p.137-142, 2003.**

FLAITZ, C.M.; HICKS, M.J. Molecular Piracy: The Viral Link to Carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 34, p. 448-453, 1998.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P. ET AL. Epidemiology of Acquisition and Clearance of Cervical Human Papillomavirus Infection in Women from a High-risk Area for Cervical Cancer. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1415-1423, 1999.

FREGA, A.; STENTELLA, P.; DE IORIS, A.; PIAZZE, J.J.; FAMBRINI, M.; MARCHIONNI, M.; COSMI, E.V.; Young Women, Cervical Intraepithelial Neoplasia and Human Papillomavirus: Risk Factors for Persistence and Recurrence. **Cancer Letters**, v. 196, p. 127-134, 2003.

GALLO, G.; BIBBO, M.; BAGELLA, L.; ZAMPARELLI, A.; SANSEVERINO, F.; GIOVAGNOLI, M. R.; VECCHIONE, A.; GIORDANO, A.. Study of Integration of HPV-16 in Yong Patients with LSIL. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 532-536, 2003.

GALLOWAY, D.A.; MCDUGALL, J.K. Human Papilomavírus and Carcinoma. **Viruses Research**, v. 37, p. 125-171, 1989.

GIRI, Y.; YANIV, M.. Structural and Mutational Analysis of Trans-activating proteins of papilomaviroses Reveals three distinct Functional Domain. **EMBO**, v. 7, p. 2823-2829, 1988.

GIULIANO, A. R.; PAPENFUSS, M.; DE GALAZ, E. M.; FENG, J.; ABRAHAMSEN, M.; DENMAN, C.; DE, J. G.; HENZE, J. L. N.; GARCIA, F.; HATCH, K. Risk Factors for Squamous Intraepithelial Lesions (SIL) of The Cervix a Women Residing at the US-Mexico Border. **International Journal of Cancer**, p. 112-8, 2004.

GONZÁLEZ-LOSA, M. R. TERAN, M.A.L.M.; PUERTO-SOLIS, M.; GARCIA-CARRANCÁ, A. Molecular Variants of HPV Type 16 E6 Among Mexican Women with LSIL and Invasive Cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, p. 95-98, 2004.

GRAVITT, P.E.; PEYTON, C.L.; APLE, R.J.; WHEELER, C.M. Genotyping of Human Papillomavirus Types by Using L1 Consensus PCR Products by a Single Hybridization

Reverse Line Blot Detection Method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 3020-3027, 1998.

HAM, J.; STEGER, G.; YANIV, M. Cooperativity in Vivo Between the E2 Transactivator and the TATA box Binding Protein Depends on Core Promoter structure. ***EMBO*, v. 13, p. 147-157, 1994.**

HARRIS, T.G.; KULASINGAM, S.L.; KIVIAT, N.B.; MAO, C.; AGOFF, S.N.; FENG, Q.; KOUTSKY, L.A. Cigarette Smoking, Oncogenic Human Papillomavirus, Ki-67 Antigen, and Cervical Intraepithelial Neoplasia. ***American Journal of Epidemiology*, v. 159, p. 834-842, 2004.**

HILDESHEIM, A; REEVES, W.C.; BRINTON, L.A. Association of Oral Contraceptive Use and Human Papillomaviruses in Invasive Cervical Cancer. ***International Journal of Cancer*, v. 46, p. 5-8, 1990.**

HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.; BROMLEY, C. et al. Human Papillomavirus Type 16 Variants and Risk of Cervical Cancer. ***Journal of the National Cancer Institute*, v. 93, p. 315-318, 2001.**

HO, G.Y.F.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHEE, J.; BURK, R.D. Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in young women. ***The New England Journal of Medicine*, v. 338, p. 423-428, 1998.**

HUANG, L-W.; CHAO, S-L.; CHEN, P-H.; CHOU, H-P. Multiple HPV Genotypes in Cervical Carcinomas Improved DNA detection and Typing in Archival Tissues. ***Journal of Clinical Virology*, v. 24, p. 271-276, 2004.**

HUDELIST, G.; MANAVI, M.; PISCHINGER, K.I.D.; WATKINS-RIEDEL, T.; SINGER, C.F.; KUBISTA, E.; CZERWENKA, K.F. Physical State and Expression of HPV DNA in Benign and Dysplastic Cervical Tissue: Different Levels of Viral Integration are Correlated with Lesion Grade. ***Gynecologic Oncology*, v. 92, p. 873-880, 2004.**

HUIBREGTSE, J.M.; SCHEFFNER, M. Mechanisms of Tumor Suppressor Protein Inactivation by the Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins. ***Seminars in Virology*, v. 5, p. 357-367, 1994.**

INCA (Instituto Nacional de Câncer). MINISTÉRIO DA SAÚDE **Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 1998**. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 01 fevereiro 2003.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. **Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativas>. Acesso 03 julho 2004.**

ISHIJI, T. Molecular Mechanism of Carcinogenesis by Human Papillomavirus-16. **Journal of Dermatology**, v. 27, p. 73-86, 2000.

KALANTARI M.; KARLSEN F. Human Papillomavirus Findings in Relation to Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade: A Study on 476 Stockholm Women, Using PCR for Detecção and Typing of HPV. **Human Pathology**, v. 28, p. 899-903, 1997.

KANG, H.T.K.; LEE, C.J.; SEO, E.J.; BAHN, Y.J.; KIM, H.J.; HWANG, E.S. Transition to an irreversible state of senescence in HeLa cells arrested by repression of HPV E6 and E7 genes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 31-40, 2004.

LEVI, J.E.; FERNANDES, S.; TATENO, A.F.; MOTTA, E.; LIMA, L.P; ELUF-NETO, J.; PANNUTI, C.S. Presence of Multiple Human Papillomavirus Types in Cervical Samples from HIV-infected Women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p. 225-231, 2004.

MAIMAN, M.; FRUCHTER, R.G.; SEDLIS, A.; et al. Prevalence, Risk Factors, and Accuracy of Cytologic Screening for Cervical Intraepithelial Neoplasia In Women with the Human Immunodeficiency Virus. **Gynecologic Oncology**, v. 68, p. 233-239, 1998.

MATSUMOTO, K; YASUGI, M.K.; OKI, A. et al Are Smoking and Chlamydial Infection Risk Factors for CIN? Different Results after Adjustment for HPV DNA and Antibodies. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 831-833, 2003.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The Interaction Between p53 and Papillomaviruses. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, p. 387-395, 1999.

MCLACHLIN, C.M., SHEN, L.H.; SHEETS, E.E. et al. Disparities in Mean Age and Histopathologic Grade Between Human Papillomavirus Type-Specific Early Cervical Neoplasms. **Human Pathology**, v. 28,p. 1226-1229, 1997.

MOLANO, M.; BRULE, A.; WEIDERPASS, E.; POSSO,H.; ARSLAN, A; MEIJER, C.J.L.M.; MUÑOZ, N,; FRANCESCHI, S., et al. Determinants of Clearance of Human Papillomavirus Infections in Colombian Women with Normal Cytology: A Population-based, 5-Year Follow-up Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 158, p. 486-494, 2003.

MUNGER, K.; BASILE, J.R.; DUENSING, S.; EICHTEN, A.; GONZALEZ, S.L.; GRACE, M.; ZACNY, V.L. Biological Activities and Molecular Targets on the Human Papillomavirus E7 Oncoproteins. **Oncogene**, v.20, p. 7888-7898, 2001.

MUÑOZ, N.; GILI, M.; KATO, I. et al. Risk Factors for HPV DNA Detection in Middle-Aged Women. **Journal of the American Sexually Transmitted Diseases Association**, v. 23, p. 504-509, 1996.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

NEGRINE, B. P.; SCHIFFMAN, M. H.; KURMAN, W. B., et al. Oral contraceptive use, Human Papilomavirus Infection, and risk of Early Cytological Abnormalities of the Cervix. **Cancer Research**, v.50, p. 4670-4679, 1990.

NPAR1WAY - SAS (SAS INSTITUTE INC) SAS/STAT User's Guide. Release 6.03.
Cary, NC: SAS Institute Inc, p. 1028., 1988.

ORTH, G.; JABLONSKA, S.; FAVRE, M.; CROISSANT, O. Characterization of the a New Type on Human Papillomavirus that Causes Skin Warts. **Journal of Virology**, v. 34, p.108-120, 1977.

PARK, J.S.; HWANG, E.S., PARK, S.N. et al. Physical Status and Expression of HPV Genes in Cervical Cancers. **Gynecologic Oncology**, v. 65, p. 121-129, 1997.

PATER, M.M.; MITRAL, R.; PATER, A. A Role of Steroids Hormones in Potentiating Transformation of Cervical Cell by Human Papillomaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 2, p. 229-234, 1994.

PEREIRA, D.B.; ANTONI, M.; DANIELSON, A; et al. Life Stress and Cervical Squamous Intraepithelial Lesions in Women with Human Papillomavirus and Human Immunodeficiency Virus. **Psychosomatic Medicine**, v. 65, p. 427-434, 2003.

PETRY, K.U.; SCHEFFE, D.; BODE, U.; et al. Cellular Immunodeficiency Enhances the Progression of Human Papillomavirus-associated Cervical Lesions. **International Journal of Cancer**, v. 57, p. 836-840, 1994.

PILLAI, M.R.; SREEVIDYA, S.; POLLOCK, B.H.; JAYAPRAKASH, P.G.; HERMAN, B. Human Papillomavirus type 16 E6 and E7 Gene Variations in Indian Cervical Cancer. **Gynecologic Oncology**, p. 1-7, 2002.

POPPE, W.A.; PEETERS, R; DRIJKONINGEN, M. ET AL. Cervical Cotinine and Macrophage-Langerhans Cell Density in the Normal Human Uterine Cervix. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 41, p. 253-259, 1996.

REMMERBACH, T.W.; BRINCKMANN, U.T.; HEMPRICH, M.C.; KUHUEDEL, K; LIEBERT, U.G. **PCR Detection of Human Papillomavirus of the Mucosa: Comparison Between MY09/11 and GP5+/6+ Sets.** Journal of Clinical Virology, 2004. Disponível em: www.sciencedirect.com Acesso em: 25 maio 2004.

RHO,J; ROY-BURMAN, A; KIM, H; DE VILLERS, E-T; MATSUKURA, T., CHOE, J.. Nucleotide Sequence and Phylogenetic Classification of Human Papillomavirus Type 59. **Virology**, v. 203, p. 168-161, 1994.

ROBERT, S.; ASHMOLE, I.; JOHNSON, G.D.; KREIDER, J. W., GALLIMORE, P.H.. Cutaneous and Mucosal Human Papillomavirus E4 Proteins Form Intermediate Filament-like Structures in Epithelial Cells. **Virology**, v.197, p. 176-187, 1993.

ROCHA-ZAVALETA, L.; YESCAS, G.; CRUZ, R.M.; CRUZ-TALONIA, F.. **Human Papillomavirus Infection and cervical ectopy.** Gynecology & Obstetrics, 2003. Disponível em: <www.sciencedirect.com> Acesso em: 25 maio 2004.

ROSENBLATT, C.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G.; PINOTTI, J.A; ARAP, S.; RUIZ,C.A.. HPV Prevalence Among Partners of Women with Cervical Intraepitelial Neoplasia. International Journal of Gynecology & Obstetrics, vol. 84, p. 156-161, 2004.

ROUSSEAU, M.C.; PEREIRA, J.S.; PRADO, J.C.M., VILLA, L.L., ROHAN, T.E., FRANCO, E.L. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. Journal of Infectious Diseases, v. 184, p. 1508-1517, 2001.

SAIKI, R.K.; CHANG, C.A.; LEVENSON, C.H.; WARREN, T.C.; BOEHM, C.D.; KAZAIAN, H.H. **DIAGNOSIS OF SICKLE CELL ANEMIA AND B-THALASSEMIA WITH ENZIMATICALLY AMPLIFIED DNA AND NON-RADIOACTIVE ALLELE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES.** NEW ENGLAND MEDICAL, V. 319, P. 537-541, 1988.

SASCO A. **Epidemiologia del Câncer de Cuello Uterino.** Encyclopédie Médico – Chirurgicale, E- 605- A- 10, 2002.

SHELLEKENS, M.C.; DIJKMAN, A.; AZIZ, M.F. et al. **Prevalence of single and Multiple HPV Types in Cervical Carcinomas in Jakarta, Indonesia.** Gynecologic Oncology, 2004. Disponível em: <www.sciencedirect.com> Acesso em: 25 maio 2004.

SCHLECHT N.F.; KULAGA S.; ROBITAILLE J.; FERREIRA S.; SANTOS M. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervial Intraepitelial Neoplasia. JAMA – Journal of the American Medical Association, v. 286, p. 3106- 3114, 2001.

SCHLECHT, N.F.; ROBERT, W.P.; ABDISSA, A.; DUARTE-FRANCO, E; ROHAN, T.E., FERENCZY,A.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L.. Modeling the Dependence of the Association Between Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Precursor Lesion. **American Journal of Epidemiology**, v. 158, p. 878-886, 2003.

SCHWARZ, E.; FREESE, U.K.; GISSMANN, L.; MAYER, W.; ROGGENBUCK, B. ZUR HAUSN, H. Structure and Transcription of Human Papillomavirus Type 18 and 16 sequences in Cervical carcinoma Cells. **Nature**, v. 314, p. 111-114, 1985.

SEEDORF, K.; KRAMMER, G.; DURST, M.; SUHAI, S.; ROWEKAMP, W.G. **HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 DNA SEQUENCE.** **VIROLOGY**, V. 145, P. 181-185, 1985.

SHERWOOD, J.B.; SHIVAPURKAR, N.; LIN, W.M.; ASHFAQ, R. MILLER, D.S.; GAZDAR, A.F. MULLER, M.D. Chromosome 4 Deletions Are frequent in Invasive Cervical Cancer and Differ Between Histologic Variants. **Gynecologic Oncology**, v. 79, p. 90-96, 2000.

SMITH, E.M.; LEVY, B.T.; RITCHIE, J.M.; JIA, J.; WANG, D.; HAUGEN, T.H.; TUREK, L.P. Is Use of Hormone Replacement Therapy Associated with Increased Detection of Human Papillomavirus and Potential Risk of HPV-Related Genital Cancers. **European Journal of Cancer Prevention**, v.11, p. 295-305, 2002.

SOUTHERN, S.A, EVANS, M.F.; HERRINGTON C.S. Basal Cell Tetrasomy in Low-Grade Cervical Squamous Intraepithelial Lesions Infected With High-Risk Human Papillomaviruses. **Cancer Research**, v. 57, p. 4210-4213, 1997.

SOUZA, P.S.A.; VILLA, L.L. Genetic Susceptibility to Infection With Human Papillomavirus and Development of Cervical Cancer in Women in Brazil. **Mutation Research**, v. 544, p. 375-383, 2003.

STECKLEY, S.L.; PICKWORTH, W.B.; HAVERKOS, H.W. Cigarette Smoking and Cervical Cancer: Part II: A Geographic Variability Study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 78-83, 2003.

STERLINKO, H.; WEBER, M.; ELSTON, R.; MCINTOSH, P. GRIFFIN, H.; BANKS, L.; DOORBAR, J. Inhibition of E6-Induced Degradation of its Cellular Substrates By Novel Bloking Peptides. **Journal of the Molecular Biology**, v. 335, p. 971-985, 2004.

STEWART C.M.; ERIKSSON AM.; MANOS M.M., MUNOZ N.; BOSCH F; XAVIER, J.P.; WHEELER, C. M. Intratype Variation in 12 Human Papillomavirus Types: a Worldwide Perspective. **Journal of Virology**, p. 3127-3136, 1996.

VERESS, G.; CSIKY-MÉSZÁROS, T.; KÓNYA, J. CZEGLÉDY.; GERGELY, L. Follow-up of Human Papillomavirus (HPV) DNA and local anti-HPV Antibodies in Citologically Normal Pregnant Women. **Medical Microbiology Immunology**, v.185, p. 139-144,1996.

VILLA, L.L.; SIPHERO. L.; RAHAL, P. et al Molecular Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Preferentially Associated with Cervical Neoplasia. **Journal Genetic of the Virology**, v 81, p. 2959-2959, 2000.

WADLER, S.; LEVY, D.; FREDERICKSON, H.B.; FALKSON, C.I., WANG, Y.; WELLER, E, BURK, R, HO, G.; HADISH, A.S. A Phase II trial of interleucina-12 in Patients with Advance Cervical Cancer: Clinical and immunologic correlates Eastern Cooperative Oncology Group Study E1E96. **Gynecologic Oncology**, v.92, p. 957-964, 2004.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F. X., KUMMER, J.A.; SHAH, K.V., ET AL. Human Papilomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer in Worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WOODMAN, C.B.; ROLLASON, T.; ELLIS, J. et al. Human Papillomavirus Infection and Risk of Progression of Epithelial Abnormalities of the Cervix. **British Journal of Cancer**, v. 73, p. 553-556, 1996.

WOODMAN, C.B; COLLINS, S.; WINTER, H. et al. Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection in Young Women: a Longitudinal Cohort Study. **Lancet**, v. 357, p. 1816, 2001.

XI, L.F.; KOUTSKY, L.A; GALLOWAY, D.A. Genomic Variation of Human Papillomavirus Type 16 and Risk for High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute, v. 89, p. 796-801, 1997.**

ZEHBE, I.; WILANDER, E.; DELIUS, H., e TOMMASINO, M. Human Papillomavirus 16 E6 Variants are More Prevalent in Invasive Cervical Carcinoma than the Prototype. **Cancer Research, v. 58, p.829-833, 1998.**

ZHAO, K-N.; LIU, W.J.; FRAZER, I.H.. Codon Usage Bias and A + T Content Variation in Human Papillomavirus Genomes. **Virus Research, v.98, p. 95-104, 2003.**

ZUR HAUSEN, H. Immortalization of Human Cells and their Malignant Conversion by High Risk Human Papillomavirus Genotypes. **Cancer Biology, v. 9, p. 405-411, 1999.**

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell control in Early Events in Carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute, v. 92, p. 690-698, 2000.**

ZUR HAUSEN, H. Cervical Carcinoma and Human Papillomavirus: On the Road to Preventing a Major Human Cancer **Journal of the National Cancer Institute, v. 93, p. 252-253, 2001.**

APÊNDICE 1

QUESTIONÁRIO

Nome: _____ Registro: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data do nascimento: _____

Estado civil: ___ solteira ___ casada ___ viúva Idade: _____

Data da 1ª relação sexual: _____ Nº de parceiros: _____

Data da última menstruação: _____ Gestação ___ Parto ___ Aborto

Data do último parto: _____ Data do último preventivo: _____

Uso de métodos anticoncepcionais: ___ DIU ___ ACO ___ Condon

Uso de terapia de reposição hormonal? ___ sim ___ não Qual? _____

Teste estrogênico? ___ sim ___ não Quando? _____

Eletrocauterização? ___ sim ___ não Quando? _____

Cirurgia ginecológica? ___ sim Qual? _____ Quando? _____

Radiação? ___ sim ___ não Quando? _____ Porque? _____

Quimioterapia? ___ sim ___ não Quando? _____ Porque? _____

Tabagismo? ___ sim ___ não Há quanto tempo? _____ Nº Cigarros/dia _____

Sintomas:

Secreção: ___ amarela ___ branca outras características _____

Odor: ___ sim ___ não Prurido: ___ sim ___ não

Sinusiorragia: ___ sim ___ não Dispareunia: ___ sim. ___ não

Presença de lesão verrucosa: ___ sim ___ não localização: _____

Antecedente de Neoplasia Intraepitelial Cervical (displasia ou lesão intraepitelial):
___ sim ___ não tratamento utilizado: _____
quando: _____

APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Santa Cruz pelo Telefone 073 680 5200.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: **Identificação dos Tipos de Papilomavirus Humano Oncogênicos e das Variantes do HPV 16 em Lesões Intraepiteliais do Colo Uterino.**

Pesquisador Responsável: Adriana Matos Benjamin Leal

Telefone para contato: 73 – 680 5283

Pesquisadores participantes: Acássia Benjamin Leal Pires, Ana Neuza Vieira

Matos, Júlio César de Mattos Cascardo, Virgínia Minghelli Schimitt, Conceição

Maria Passos Queiroz, Mittermayer Galvão dos Reis.

Telefones para contato: 73- 680 5283/ 5293/ 5105

Esclarecimento sobre a pesquisa:

O câncer de colo do útero é um problema de saúde importante aqui no Brasil. O papilomavírus humano (HPV) é o vírus que pode levar ao câncer do colo do útero se a mulher não for tratada no momento certo. Esta pesquisa visa identificar alguns tipos de HPV que estão levando ao aparecimento das lesões anteriores ao câncer do colo. Para isto, uma amostra da secreção do colo será colhida antes do início do tratamento das lesões do colo. A secreção será levada ao laboratório da UESC para realização do exame chamado PCR, no período de um ano. Este exame é gratuito e não trará custos, nem riscos adicionais para sua saúde. Seu tratamento será realizado independente da pesquisa e o resultado será encaminhado para seu(sua) médico(a). Os pesquisadores se comprometem a guardar segredo sobre suas informações pessoais e você pode retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem prejuízos para seu tratamento ou acompanhamento normalmente fornecido pelo serviço de referência. Sua participação é importante, pois ajudará a obter mais informações sobre estes vírus e ajudará a montar estratégias para o acompanhamento de outras pessoas que possuam um problema igual ao seu.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG: _____ CPF: _____ n.º de prontuário: _____
n.º de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em
participar do estudo **Identificação dos Tipos de Papilomavirus Humano
Oncogênicos e das Variantes do HPV 16 em Lesões Intraepiteliais do Colo
Uterino**, permitindo coletar material durante meu exame ginecológico. Fui
devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora Adriana Matos
Benjamin Leal sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim
como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-
me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem
que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento,
assistência e tratamento.

Local e data:

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:
