



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM MULHERES COM CITOLOGIA
INDETERMINADA (ASC-US) E LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE BAIXO GRAU (LSIL)**

FRANCISCA ANDRADE DE QUEIROZ

**MANAUS
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCA ANDRADE DE QUEIROZ

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM MULHERES COM CITOLOGIA
INDETERMINADA (ASC-US) E LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE BAIXO GRAU (LSIL)

Dissertação de Mestrado apresentado ao colegiado do Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em biotecnologia para saúde.

Mestranda: Francisca Andrade de Queiroz
Orientadora: Cristina Maria Borborema dos Santos
Co-orientadora: Adele Schwartz Benzaken

MANAUS/AM
2012

FRANCISCA ANDRADE DE QUEIROZ

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM MULHERES COM CITOLOGIA
INDETERMINADA (ASC-US) E LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE BAIXO GRAU (LSIL)

Dissertação de Mestrado apresentado ao
colegiado do Programa Multi-institucional
de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia, área de concentração em
biotecnologia para saúde.

Aprovado em de de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Cristina Maria Borborema Santos
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profª. Dra. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Aos meus familiares e amigos pelo
incentivo para realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por essa conquista, por cada dia vivido, por cada lágrima chorada, por cada alegria sentida, e por cada objetivo alcançado.

A minha orientadora e co-orientadora pelo acompanhamento constante;

Aos meus familiares pelo apoio;

Aos colegas da instituição que auxiliaram na discussão da temática e contribuíram no decorrer do caminho;

Aos Bibliotecários da FUAM pelo carinho e atenção dispensada a mim todas as vezes que precisei;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da UFAM pelo apoio e colaboração no desenvolvimento das técnicas necessárias para a realização deste trabalho;

Aos colegas da DST da FUAM pelo apoio e colaboração;

A Fundação “Alfredo da Matta” pelo apoio incondicional.

Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.

Thomas Jefferson

RESUMO

O *Papillomavirus humano* (HPV) é reconhecido como o principal fator de risco relacionado do câncer cervical. A identificação de tipos de HPV de alto risco pode auxiliar na prevenção de lesões malignas do colo do útero. Este estudo tem como objetivo determinar e genotipar o HPV em mulheres com resultado citológico de Lesão Intraepitelial de Baixo grau (LSIL) e Células Escamosas Atípicas Significado Indeterminado (ASC-US). Trata-se de um estudo de corte transversal com componente analítico em mulheres atendidas na Fundação Alfredo da Matta - FUAM. As pacientes foram selecionadas a partir do arquivo de exames do Laboratório de Citologia da FUAM no período de janeiro de 2009 a julho de 2011 e solicitadas a comparecer ao ambulatório de DST por meio de busca ativa, a fim de fazer uma nova coleta de material para reavaliação citológica, detecção molecular e genotipagem do HPV. A detecção molecular foi realizada pela técnica de *Nested-PCR* tendo como alvo a região L1 do capsídeo viral. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose. Do total de 100 pacientes selecionadas, 70% (70/100) participaram do estudo, sendo que 34 delas tinham resultado citológico de ASC-US e 36 de LSIL. Após reavaliação citológica 8(11,4%) pacientes apresentaram citologia dentro dos limites da normalidade, 33(47,2%) citologia inflamatória, 22(31,4) ASC-US, 6(8,6%) LSIL, 1(1,4%) HSIL. O HPV foi identificado em 28,6% (20/70) das amostras examinadas. Das 20 pacientes HPV-DNA positivas 1 caso apresentou citologia dentro do limite da normalidade, 6 citologia inflamatória, 10 ASC-US, 2 LSIL e 1 caso apresentou HSIL. Após a genotipagem foram identificados os seguintes tipos de HPV: 6, 16, 58, 61, 70, 83, 84 e 85. O HPV mais prevalente com 5 casos em 20 positivos foi o HPV 58. A presença do HPV de alto risco oncogênico destaca a importância de ações voltadas para a prevenção na transmissão desse vírus e no rastreamento das doenças relacionadas, na cidade de Manaus.

Palavras-chaves: Citologia, *Papillomavirus humano*, Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

ABSTRACTS

The human papillomavirus (HPV) is recognized as a major risk factor related to cervical cancer. The identification of HPV types of high risk can aid in the prevention of malignant lesions of the cervix. This study aims to determine and genotype HPV in women with a cytological result of ASC-US and LSIL. This is a cross-sectional study with an analytical component in women attended the Fundação Alfredo da Matta - FUAM. The patients were selected from the file examination of the Laboratory of Cytology of FUAM from January 2009 to July 2011 and requested to attend the DST clinic through active search in order to make a new collection of material for reevaluation cytological, molecular detection and genotyping of HPV. Molecular detection was performed by Nested-PCR targeting the L1 region of the viral capsid. PCR products were analyzed on an agarose gel. Out of 100 patients selected, 70% (70/100) participated in the study, 34 of them had the cytological result of ASC-US and LSIL of 36. After reevaluation cytological 8 (11.4%) patients had cytology within normal limits, 33 (47.2%) inflammatory cytology, 22 (31.4%) ASC-US, 6 (8.6%) LSIL, 1 (1.4%) HSIL. HPV was identified in 28.6% (20/70) of the samples. Of the 20 patients HPV DNA-positive 1 had cytology within normal limits, 6 inflammatory cytology, 10 ASC-US and 2 LSIL and 1 HSIL. After the genotyping were identified the following HPV types 6, 16, 58, 61, 70, 83, 84 and 85. The most prevalent HPV 25% was HPV 58. The presence of HPV high-risk oncogenic stresses the importance of actions aimed at preventing the transmission of this virus and tracking of diseases in the city of Manaus.

Key Words: Cytology, Human Papillomavirus, Polymerase Chain Reaction (PCR).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Apresentação esquemática do genoma do HPV mostrando a disposição dos genes precoce e/ou não estruturais, os genes do capsídeo (L1 e L2) e a Região reguladora (URR)..	29
Figura 2 - Ciclo da infecção pelo HPV 1	33
Figura 3 - Coleta de Papanicolaou.....	37
Figura 4 - Esquema demonstrativo das etapas experimentais.....	43
Figura 5 - Material para o exame citopatológico.....	46
Figura 6 - Esquema demonstrativo das etapas do estudo molecular	47
Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo 1 µg/µL, evidenciando um fragmento em torno de 260 pb correspondente a amplificação de uma região microssatélite (GATA)13 do cromossomo 15 humano, utilizando-se dos iniciadores IS02G (PONTES et al.,2003).M: Marcador de peso molecular 100 pb <i>Invitrogen Life Technologie</i> . Amostras de 25 a 37, C+ = controle positivo, Br = Branco, M = Marcador.....	56
Figura 8 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado em brometo de etídeo 1 µg/µL, evidenciando um fragmento de 450 pb, utilizando-se dos iniciadores MY09/MY11. Amostras de 6, 9, 11, 13, 14, 19, 20, 23, 29, 31, 34, e, 35, C+ = controle positivo Br = branco e M = marcador.....	57
Figura 9 – Gráfico da distribuição dos tipos de HPV encontrados nas mulheres estudadas ...	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de reação para iniciadores ISO2G.....	47
Quadro 2- Condições da PCR para DNA genômico humano (iniciadores ISO2G).....	47
Quadro 3 - Sequências dos primers utilizados para o diagnóstico do HPV e tamanho dos produtos obtidos.	49
Quadro 4 - Sistema de reação para iniciadores PCR com iniciadores MY09/MY11.....	49
Quadro 5 - Sistema de reação para iniciadores PCR com iniciadores GP5+/GP6+.....	49
Quadro 6 - Condições da PCR para detecção do HPV através dos iniciadores MY e GP.....	50
Quadro 7 - Sistema de reação de purificação.....	50
Quadro 8 - Sistema de reação de sequenciamento	51
Quadro 9 - Condições para a reação de sequenciamento.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição em relação aos dados socioeconômicos das pacientes atendidas no ambulatório de DST da FUAM-Manaus-AM.	53
Tabela 2 - Distribuição em relação aos dados de início das atividades sexuaia, tipo de parceria sexual e uso de preservativo. Manaus-AM	54
Tabela 3 - Distribuição do número e percentagem de acordo com as características do comportamento sexual e antecedentes de DST. Manaus-AM.....	54
Tabela 4 - Distribuição do número e percentagem de acordo com os antecedentes de DST. Manaus-AM.....	55
Tabela 5 - Distribuição do número e percentagem de acordo com o número de gestações, aborto e antecedentes de DST. Manaus-AM.....	55
Tabela 6 - Distribuição do número e percentagem de acordo com o resultado da primeira e da última citologia. Manaus-AM	56
Tabela 7 - Distribuição do número e percentagem de acordo com o resultado da PCR e iniciadores utilizados. Manaus-AM.....	57
Tabela 8 - Distribuição do resultado do sequenciamento em relação resultado da citologia atual. Manaus-AM	59
Tabela 9 - Distribuição dos resultados de Papanicolaou atual em comparação ao resultado deste exame realizado previamente. Manaus-AM.....	59
Tabela 10 - Distribuição em relação a citologia atual e o resultado da PCR. Manaus-AM	60
Tabela 11 - Distribuição segundo aos dados socioeconômicos em relação ao resultado da PCR para HPV das pacientes atendidas no ambulatório de DST da FUAM.....	60
Tabela 12 - Comparação entre variáveis e resultado da PCR das mulheres atendidas no ambulatório de DST da FUAM, na cidade de Manaus – AM.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatados
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês “ <i>Desoxiribonucleic Acid</i> ”
DST	Doença Sexualmente Transmissível
E	Região precoce do inglês <i>early</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FUAM	Fundação Alfredo da Matta
HPV	Papiloma Vírus Humano, do inglês “ <i>Human Papillomavirus</i> ”
HCl	Ácido Clorídrico
HSIL	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau, do inglês “ <i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> ”
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Região Tardia, do inglês “ <i>Late</i> ”
LCR	Região controladora de locus, do inglês “ <i>Long Control Reaction</i> ”
LIE-AG	Lesão Intra-Epitelial de baixo grau
LSIL	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau, do inglês “ <i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> ”
min.	Abreviação de “minuto”
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NIC I	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau I
NIC II	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau II
NIC III	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau III

OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Quadro de Leitura Aberto, do inglês “ <i>Open Reading Frames</i> ”
PAISM	Programa de Assistência Integral a Saúde da Mulher
PB	Pares de Base (nitrogenadas)
PCR	Reação de polimerase em cadeia, do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PNCCU	Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama
pRB	Proteína do retinoblastoma
p21	Proteína p21
p53	Refere-se ao gene ou à proteína p53
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês “ <i>Ribonucleic Acid</i> ”
RPM	Rotações por minuto
SISCOLO	Sistema de Informação do Câncer do Colo Uterino
Taq DNA pol	Enzima DNA polimerase extraída do <i>Termophilus aquaticus</i>
TE	Solução de Tris HCl 10mM + EDTA 1mM pH 8,0
TPK	Solução composta por TE , Tween 20 20% e proteinase K
TEB	Tampão de Tris HCl, EDTA e ácido bórico

LISTA DE SÍMBOLOS

K – Potássio

μL – Microlitro

μg - Micrograma

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

% - Percentagem

mM – Milimolar

nm - Nanômetro (unidade de medida)

pmol – Picomol

U/ μL – Unidade por microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO COLO DO ÚTERO.....	19
2.2 ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DO COLO UTERINO	20
2.2.1 LESÕES INTRA-EPITELIAL DE BAIXO GRAU (LSIL OU LIE-BG)	20
2.2.2 LESÃO INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU (HSIL OU LIE-AG)	21
2.2.3 CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (ASC-US).....	21
2.3 COLPOCITOLOGIA: TERMINOLOGIA (PAPANICOLAOU).....	21
2.3.1 CÉLULAS ATÍPICAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO	23
2.3.2 ATIPIAS CELULARES EM CÉLULAS ESCAMOSAS.....	23
2.3.2.1 ATIPIAS CELULARES EM CÉLULAS GLANDULARES:	23
2.4 RASTREAMENTO PARA O CÂNCER DO COLO UTERINO	24
2.5 PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV).....	26
2.5.1 GENOMA VIRAL	27
2.5.2 CLASSIFICAÇÃO	29
2.5.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO DO HPV	30
2.5.4 PATOGENICIDADE.....	31
2.5.5 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DO COLO UTERINO	35
2.5.5.1 DIAGNÓSTICO (HPV)	35
2.5.5.2 PAPANICOLAOU.....	36
2.5.5.3 COLPOSCOPIA	37
2.5.5.4 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO.....	37
2.5.5.5 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	38
2.6 EPIDEMIOLOGIA (HPV- CÂNCER CERVICAL).....	39
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 TIPOS DE ESTUDO	43
4.2 POPULAÇÕES DE ESTUDO	43
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	44
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	44

4.4.1 COLETA DE DADOS	44
4.4.2 AMOSTRA CLÍNICA	44
4.4.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	46
4.4.3.1 DETECÇÃO DO HPV	48
4.4.3.2 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR	50
4.4.3.3 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	51
4.4.3.3.2 PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	51
4.4.3.3.3 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS.....	52
4.4.3.4 ANÁLISE DOS DADOS	52
5. RESULTADOS	53
5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	53
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO.....	71
APÊNDICES	86
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	86
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE DETECÇÃO MOLECULAR E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES COM CITOLOGIA POSITIVA PARA LSIL E ASC-US.....	87
APÊNDICE C – EQUIPE CIENTÍFICA.....	90
ANEXOS.....	91
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	91
ANEXO 2 – REQUISIÇÃO DE EXAME CITOPATOLÓGICO – COLO DO ÚTERO (FRENTE).....	92
ANEXO 2 -REQUISIÇÃO DE EXAME CITOPATOLÓGICO – COLO DO ÚTERO (VERSO).....	93
ANEXO 3 - POP DA CITOLOGIA 131	94
ANEXO 3 -POP DA CITOLOGIA 131	95
ANEXO 4 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA - MÉTODO FENOL;CLOROFORMIO (SAMBROOK ET AL., 1989).....	96
ANEXO 5 - PROTOCOLO PARA A PRECIPITAÇÃO DO DNA COM ISOPROPANOL/ETANOL – (APPLIED BIOSYSTEMS).....	97
ANEXO 6 - PROTOCOLO PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O SEQUENCIADOR	98

1 INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus Humanos (HPV) pertencem a família *Papillomaviridae* e são vírus não envelopados, DNA dupla fita circular com cerca de 8000 pares de base. Têm um papel importante na gênese do câncer de colo uterino (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2005; LEE; LAIMINS, 2007). Este vírus é considerado um fator de risco essencial, mas não o suficiente para transformação maligna, pois o câncer é uma doença multifatorial (MUÑOZ et al., 2006).

A infecção genital pelo HPV é a mais prevalente infecção sexualmente transmissível nos Estados Unidos com uma estimativa de 6,2 milhões de pessoas infectadas por ano. No Brasil Ayres e Silva (2010), num estudo de revisão sistemática apontaram uma prevalência geral de 13,7% a 54,4% da infecção do colo do útero pelo HPV. Atualmente, existem mais de 100 tipos de HPV descritos, dos quais 40 tipos podem causar infecções genitais (HARIRI et al., 2011).

Os HPV são classificados de acordo com sua associação com o câncer. Os tipos ditos não-oncogênicos ou de baixo risco, dos quais os mais prevalentes são os HPV-6 e HPV-11, que causam lesões exofíticas (verrugas) denominadas benignas e lesões intra-epiteliais cervicais de baixo grau da cérvix uterina. Os tipos chamados oncogênicos ou de alto risco, incluindo como mais prevalentes os tipos HPV-16 e HPV-18 podem causar lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau e câncer da região anogenital (VAUCEL et al., 2011; LOUVANTO et al., 2011).

Ciapponi (2011) relata que são descritos 500.000 novos casos de câncer cervical por ano e 275 mil mortes no mundo. A América Latina é responsável por 15% dessa carga e a incidência deste câncer na América do Sul é de 28,6 casos por cada 100.000 habitantes.

É importante salientar que muitas infecções por HPV são assintomáticas, ou seja, sem manifestações clínicas. Estudos revelam que 90% das infecções por HPV incluindo os

tipos de alto risco, tornam-se indetectáveis em dois anos e o *clearance* ocorre nos primeiros seis meses de infecção. A infecção persistente com HPV de alto risco é o mais importante fator de risco para lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau e câncer cervical (HARIRI et al., 2011).

Muitas infecções assintomáticas podem resultar em alterações morfológicas do epitélio cervical e endocervical que podem ser detectadas através do *screening* citológico ou exame de Papanicolaou. Todos os anos cerca de 50 milhões de mulheres nos Estados Unidos são submetidas a *screening* para câncer cervical. Destas, 2 a 3 milhões apresentam resultado citológico de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 1,25 milhões apresentam lesão intra-epitelial cervical de baixo grau (LSIL) e 300.000 lesão intra-epitelial cervical de alto grau (HSIL) (HARIRI et al., 2011).

Quando se tem um resultado citológico de ASC-US ou outra anormalidade citológica conjuntamente com teste de HPV positivo, a paciente deverá ser encaminhada para avaliação colposcópica e posterior biópsia para certificação da lesão (BRASIL, 2011; HARIRI et al., 2011).

Muñoz et al. (2006) analisando estudos de coorte relatam que mulheres infectadas com HPV 16 e 18 apresentam risco aumentado para desenvolverem lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (Neoplasia intra-epitelial cervical I e II) em dois anos após a detecção do DNA do HPV, contrário a teoria que a infecção prolongada é necessária para progressão maligna.

Os testes moleculares para detecção do HPV são muito importantes, principalmente nos casos de lesões que são indeterminadas pela citologia (casos de ASC-US), pois a citologia oncótica cervical tem baixa reprodutibilidade, com sensibilidade variando de 50 a 99%, apresentando até 29,7% de resultados falso-negativos (SCHERMAN et al., 1994; FRANCO; FERENCZY, 1999; NUOVO; MELNINKOW; HOWELL, 2001).

A utilização de métodos moleculares para detecção do DNA e genotipagem do HPV em amostras cervicais juntamente com a citologia oncológica poderá ser uma estratégia importante na identificação de pacientes com predisposição a processos malignos contribuindo para redução da morbimortalidade por câncer cervical (SILVEIRA et al., 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e histologia do colo do útero

O útero é um órgão do aparelho reprodutor feminino que está situado no abdome inferior, por trás da bexiga e na frente do reto, dividido em corpo e colo (IARC, 2012).

O colo do útero apresenta uma parte interna, que constitui o chamado canal cervical ou endocervice, que mede cerca de 2 a 3 mm de espessura, podendo, nas porções mais profundas medir aproximadamente 1 cm de profundidade. Está revestido por uma camada única de células cilíndricas produtoras de muco e raramente ciliada. As saliências e reentrâncias da mucosa endocervical dá a impressão de formação glandular. Este epitélio cilíndrico é o responsável pela produção de muco cervical (NETO, 2000; IARC, 2012).

A parte externa do útero, que mantém contato com a vagina é chamada de ectocervice, é revestida por epitélio escamoso estratificado não-queratinizado. Seu estroma não apresenta glândula. Esse epitélio também reveste o fundo de saco e vagina em toda a sua extensão (IARC, 2012). A ectocervice da mulher adulta durante o período sexualmente ativo é coberta por um epitélio escamoso estratificado não ceratinizado, o qual é composto de camadas de células basais, parabasais, intermediárias e superficiais (SCHNEIDER, SHNEIDER, 1998).

Entre os dois epitélios já mencionados encontra-se a junção escamocolunar (JEC), que é uma linha que pode estar tanto na ecto como na endocervice, dependendo da situação hormonal da mulher. Os representantes citológicos da JEC precisam estar presentes nas amostras utilizadas para o rastreamento do câncer cervical. A importância do encontro das células endocervicais na amostra está na afirmação de que a JEC foi alcançada durante a coleta do material. Fato este muito importante, pois é nessa localização que se encontra com maior frequência os carcinomas cervicais e seus precursores (NETO, 2002; IARC, 2012).

2.2 Alterações citológicas do colo uterino

As lesões intraepiteliais escamosas (SIL) são lesões precursoras do câncer cervical. São classificadas de acordo com o grau de perda da diferenciação celular, geralmente, provocam alterações morfológicas características, detectadas pela citologia do raspado cervico-vaginal. E estão classificadas em LSIL, HSIL, atipias celulares de significado indeterminado (ASC-US) e carcinoma invasor (SOLOMO; NAYAR, 2005; BRASIL, 2011).

Histologicamente apresentam desorganização do epitélio escamoso, núcleos atípicos e mitoses anômalas. As lesões presentes em células bem diferenciadas são lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), e às presentes nas células com menor diferenciação são lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL). As LSIL abrange o espectro de anormalidades não invasivas, cervicais, escamosas, epiteliais associadas ao HPV; já as HSIL são alterações de moderada (grau II) a grave (o carcinoma *in situ*). Estas lesões, em sua grande maioria (90%), estão associadas ao HPV (BRASIL, 2011).

2.2.1 Lesões Intra-Epitelial de baixo grau (LSIL ou LIE-BG)

Origina-se no epitélio escamoso maduro da cérvix. Na amostra predominam alterações com discariose em células escamosas da superfície e células intermediárias, os núcleos estão aumentados e hipercromáticos podem aparecer isolados ou agrupados (IARC, 2012).

As lesões de baixo grau podem ser controladas clinicamente ou podem ser submetidas à avaliação colposcópica seguida de biópsia e posterior destruição da lesão por excisão, vaporização a laser, eletrocauterização, crioterapia, podofilina, ácido tricloacético e podofilotoxina. Apesar de existirem várias opções terapêuticas para o tratamento das verrugas genitais, quase todos os tipos de tratamento possuem taxas de resposta em torno de 50 a 75%, sendo que as taxas de recorrências ficam em torno de 30% (FERENCZY, 1999; SOLOMON; NAYAE, 2005; MULLER; MAZIERO, 2010).

2.2.2 Lesão Intra-Epitelial de alto grau (HSIL ou LIE-AG)

É caracterizada pela alta reestruturação do epitélio e tem variação citoplasmática de acordo com o tamanho da célula, alterações nucleares, e figuras de mitose. As células afetadas neste processo são menores e mais imaturas que nas LSIL. Estas células podem ser encontradas isoladas, em grupos ou em agregados (SOLOMON; NAYAE, 2005).

2.2.3 Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US)

Refere-se às alterações citológicas sugestiva de lesão intraepitelial, porém não são quantitativa e qualitativamente suficientes para um resultado definitivo. Para esta interpretação as células encontradas precisam apresentar diferenciação, escamosa, aumento da relação núcleo/citoplasma, cromatina e núcleo irregulares (MULLER; MZIERO, 2010).

Caracterizadas por anormalidades celulares mais marcantes do que as alterações reativas, porém impossibilita a interpretação segura de lesão intraepitelial escamosa. Têm referencia com alterações sugestivas de LSIL e de grau indeterminado (MULLER; MAZIERO, 2010). As células encontradas apresentam núcleo maior que duas e meia a três vezes o tamanho do núcleo de uma célula intermediária normal, proporção núcleo/citoplasma levemente acentuada, hipercromasia nuclear discreta, distribuição irregular da cromatina nuclear, forma do núcleo ligeiramente irregular (SOLOMON; NAYAR, 2005).

2.3 Colpocitologia: terminologia (Papanicolaou)

Em 1988, o *National Cancer Institute de Bethesda* reuniu, na cidade de Bethesda (EUA), especialistas em colpocitologia e patologia cervical com o objetivo de elaborar um sistema de descrição dos esfregaços de Papanicolaou que representasse a interpretação citológica de um modo claro e relevante para o clínico e que se constituísse, no principal meio de comunicação entre o clínico e o citopatologista (CARVALHO, 2000; SOLOMON; NAYAR, 2005).

Em 1999, a Sociedade Brasileira de Patologia, publicou o Manual de padronização de laudos histopatológicos, baseado no Sistema Bethesda. Foi incluída a terminologia “lesão escamosa intra-epitelial cervical”, em associação com o termo “neoplasia intra-epitelial cervical” (HORTA; FONSECA, 1999).

A nomenclatura para emissão de laudos citopatológico aceita, atualmente, no âmbito nacional é o Sistema Bethesda, que classifica as anormalidades de células escamosas epiteliais em quatro categorias (JANICEK; AVERETTE, 2001; BURD, 2003):

- a) Células atípicas (ASC), subdivididas em duas categorias:
 - i. Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) referem-se a alterações sugestivas de SIL de grau indeterminado, possivelmente, não neoplásico.
 - ii. Células escamosas atípicas em que não é possível excluir uma lesão de alto grau (*high squamous intra-epithelial lesions* - HSIL ou ASC-H).
- b) LSIL, que se referem a alterações celulares causadas pelo HPV tais como colicitose acompanhada de discariose leve;
- c) HSIL, que se refere a displasias moderadas severas e carcinoma *in situ*.
- d) Carcinomas de células escamosas.

O Ministério da Saúde, através do Instituto Nacional do Câncer (INCA), implantou em 2003 a Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais. Foi adotada a terminologia de *lesão intra-epitelial* em substituição ao termo *neoplasia*, além de estabelecer dois níveis, baixo e alto grau, separando as lesões com potencial morfológico de progressão para neoplasia daquelas mais relacionadas com o efeito citopático viral, com potencial regressivo ou de persistência. Foi incluída a possibilidade diagnóstica de suspeita de micro-invasão (BRASIL, 2003).

A Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológico sofreu alterações a partir da atualização do sistema Bethesda, quando existiu a necessidade de incorporar as novas tecnologias e conhecimentos clínicos, morfológicos e moleculares, facilitando a equiparação dos resultados nacionais com aqueles encontrados nas publicações científicas internacionais. Assim, a classificação ficou conforme descrito abaixo:

2.3.1 Células Atípicas de significado indeterminado

- a) Em células escamosas:
 - i. Possivelmente não-neoplásico;
 - ii. Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.
- b) Em células glandulares:
 - i. Possivelmente não-neoplásico;
 - ii. Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.
- c) De origem indefinida:
 - i. Possivelmente não-neoplásica;
 - ii. Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.

2.3.2 Atipias Celulares em Células Escamosas

- a) Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (compreendendo efeito citopático induzido pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I ou NIC I);
- b) Lesão intra-epitelial de alto grau (compreendendo neoplasia intra-epiteliais cervicais grau II e III ou NIC II e NIC III respectivamente);
- c) Lesão intra-epiteliais de alto grau, não podendo excluir microinvasão;
- d) Carcinoma epidermoide invasor.

2.3.2.1 Atipias Celulares em Células Glandulares:

- a) Adenocarcinoma *in situ*
- b) Adenocarcinoma invasor: Cervical, Endometrial e sem outras especificações.

2.4 Rastreamento para o câncer do colo uterino

O método de rastreamento do câncer do colo do útero e suas lesões precursoras é o exame de Papanicolaou, realizado a mais de 50 anos, exame este conhecido como preventivo (BRASIL, 2010b; WHO, 2010; TAKEHARA et al., 2011). Este procedimento identifica lesões que antecedem o câncer cervical e dessa maneira permite o tratamento antes que a doença se desenvolva para formas mais graves (KERKAR; KULKARNI, 2006; RAMA et al., 2008b).

A colpocitologia oncótica foi introduzida pelo Dr. George Papanicolaou em 1940. Desde a década de 1990 até os dias de hoje, o teste Papanicolaou convencional é a principal estratégia utilizada nos programas de rastreamento para o controle do câncer de colo do útero. Novos métodos de rastreamento, como testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo do útero, utilizando ácido acético ou lugol (colposcopia), são apontados, em vários estudos, como eficientes na redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero. No Brasil, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente em mulheres de 25 a 59 anos (MOTTA et al., 2001; BRASIL, 2009; SOARES; SILVA, 2010).

O sucesso do teste de Papanicolaou deve-se ao fato de poder detectar doenças que ocorrem no colo do útero antes do desenvolvimento para o câncer, e constitui-se em um grande avanço no controle do carcinoma uterino. Este método gradativamente adquiriu adeptos e, atualmente, representa uma importante forma de rastreamento deste tipo de neoplasia. Sua grande aceitabilidade, pela população e pelos profissionais de saúde, aliada a facilidade de execução, tem permitido a redução da mortalidade por câncer do colo do útero nos países que a implantaram de forma intensificada (MOTTA et al., 2001; GAËLLE et al., 2008; SOARES; SILVA, 2010).

A colpocitologia oncótica é baseada na avaliação citológica de esfregaços com amostras cervical coletada da zona de transformação e transferida para lâminas de vidro com extremidade fosca e corada pelo método de Papanicolaou, (TÚLIO et al., 2007; GAËLLE et al., 2008). A introdução da citologia tem contribuído, mas a validade diagnóstica em termos de especificidade e sensibilidade ainda mostra deficiência significativa, porém não podemos negar a importância deste exame nos programas de prevenção de câncer, identificando lesões pré-clínicas, lesões neoplásicas ou potencialmente pré-cancerosas do colo do útero e são inquestionáveis os benefícios de sua aplicação no estudo destas lesões em grandes populações (ALVES, 2003; GAËLLE et al., 2008).

Nos países onde os programas de rastreamentos são eficientes é possível a redução do câncer cervical e a evolução das lesões pré-malignas para estágios mais agressivos (RAMA et al., 2008b; PIRAS et al., 2011). Portanto, a estratégia mais eficiente para prevenir essa doença é a realização periódica do exame colpocitológico, estratégia esta reconhecida mundialmente, como segura e eficiente (WHO, 2011).

No Brasil até a década de 1980, as ações de controle do câncer do colo do útero eram pontuais e voltadas para o período gravídico da mulher. Depois da instituição (1984) do Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher (PAISM), foram incorporadas as ações de atividades preventivas e de diagnóstico do câncer do colo uterino (CORREA; VILLELA, 2008; BRASIL, 2010b; BRASIL, 2011).

As ações de controle do câncer do colo do útero foram consolidadas na década de 1990 sob a coordenação do Programa Nacional de Controle do Câncer Cervico-Uterino (PNCCU), criado em 1998 com a meta de reduzir a mortalidade e as repercussões causadas por este câncer, dando prioridade para mulheres com idade entre 35 a 49 anos (BRASIL, 2010b). Em 1996 foi criado o programa Viva Mulher pelo Ministério da Saúde (MS) visando

o controle de câncer do colo uterino, que culminou em 1998 com a 1ª Campanha Nacional para o Rastreamento do câncer do colo do útero através do Papanicolaou (BRASIL, 2010a).

A partir de 1999 foi iniciada a fase de consolidação das ações do Programa Viva Mulher nas rotinas dos serviços. Em 2002 foi consolidado a Sistema Nacional de Informação de Controle do Câncer do Colo do Útero (SISCOLO), através da 2ª Mobilização Nacional para detecção precoce da doença visando, prioritariamente, captar, acompanhar e tratar as mulheres que nunca haviam realizado o exame citopatológico (CORREA; VILLELA, 2008).

O rastreamento do câncer do colo do útero representa um processo complexo com múltiplas etapas, que resulta na diminuição das taxas de incidência do câncer invasor quando apresenta uma boa cobertura e se associa ao tratamento nos estágios iniciais da doença (BRASIL, 2011). No Brasil é difícil saber o número de mulheres examinadas, mas sabe-se a quantidade de exames realizados, dificultando assim, o cálculo da cobertura da população feminina pelos programas de rastreamento (CORREA; VILLELA, 2008; VALE et al., 2010). Mas também é sabido que o rastreamento organizado é um desafio a ser vencido para que seja possível uma alta cobertura da população (BRASIL, 2011).

2.5 Papiloma Vírus Humano (HPV)

O HPV é um DNA vírus com tropismo pelo epitélio escamoso acometendo também o epitélio cilíndrico. Apresenta uma infectividade que varia entre 25 a 65%. O período de incubação é extremamente variável ocorrendo entre semanas até 8 meses, com média de 3 meses. Em alguns casos o período de latência pode chegar a anos ou indefinidamente (NAUD et al., 2000; DUARTE et al., 2010). Silveira et al. (2007), afirma que o HPV é um agente intracelular obrigatório infectando células em mitose ativa, alterando a maturação e a diferenciação celular.

O HPV é o agente infeccioso viral com maior frequência de transmissão sexual em todo o mundo (NORONHA et al., 2005; VAUCEL et al., 2010 WAWER et al., 2011);

TACHEZY et al.,2011). Estima-se que aproximadamente 75% da população sexualmente ativa entrem em contato com algum tipo de HPV durante sua vida. Porém, na maior parte das vezes esta infecção não produz sintomas e é eliminada pelo sistema imune sem o desenvolvimento de alterações no hospedeiro, sendo que 70% delas desaparecem no período de um ano (QUEIROZ et al., 2007).

Ghosh et al. (2011) demonstrou que 99,7% das mulheres que têm câncer do colo uterino foram infectadas pelo HPV. Os HPV de alto risco tem sido encontrados em aproximadamente 100% das mucosas cervicais das mulheres com câncer do colo uterino (LACE et al., 2011).

2.5.1 Genoma viral

Os Papilomavírus Humanos (HPV) são caracterizados por apresentarem genoma circular constituído de dupla fita de DNA com aproximadamente 8.000 pares de base (pb) dentro de um capsídeo icosaédrico que contém 360 cópias da proteína L1 e 12 cópias de L2, organizados em 72 capsômeros e não possuem envelope (Figura 1). Pertencem à família Papillomaviridae e ao gênero Papillomavírus (de VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005; MUÑOZ et al., 2006).

O HPV é um vírus pequeno não envelopado medindo aproximadamente 55nm de diâmetro. No seu genoma destacam-se 3 regiões: a primeira é a região não codificadora (*Upstream regulatory region* – URR ou LCR). A região longa de controle (LCR) é uma região que não contém Open Reading Frame (ORF), portanto não codifica proteína. Porém é essencial na regulação da replicação e transcrição dos genes celulares e virais e encontra-se entre L1 e E6, possuindo entre 500 e 1.000 pares de bases. Existe ainda uma região curta não codificadora (SNR) entre E5 e L2 cuja função biológica é desconhecida (JEON; LAMBERT, 1995; GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL et al., 2009; LETO et al., 2011).

A segunda região, a chamada precoce (*early region - E*), consiste das ORF E1, E2, E4, E6 e E7, que estão envolvidas na replicação viral e interferem em proteínas que controlam no ciclo celular, conferindo ao vírus potencial para transformar e imortalizar as células hospedeiras. A terceira região, chamada de tardia (*late region - L*), codifica as proteínas L1 e L2, que são proteínas estruturais responsáveis pela imunogenicidade do vírus (SUGERMAN; SHILLITOE, 1997; BURD, 2003; BERNARD, 2005; SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL et al., 2009; BODILY et al., 2011).

A região E é expressa nas células infectadas não produtivas e em células transformadas; é importante no controle da replicação viral e transformação celular (SOUTO, 2005). As proteínas E1 e E2 estão relacionadas com a replicação viral enquanto E6 e E7 com a oncogenicidade, atuando na modulação de proteínas que regulam o ciclo celular, resultando em uma proliferação celular descontrolada (RAPAPORT, 2005; LEE; LAIMINIS, 2007; LETO et al., 2011). A oncoproteína E6 acelera os mecanismos de degradação da proteína p53, importante supressora do crescimento tumoral, interferindo desta forma nos mecanismos de apoptose e reparo do DNA celular, já a oncoproteína E7 age na proteína supressora tumoral pRb (*Retinoblastoma protein*) também resultando em distúrbio do controle do ciclo celular (RAPAPORT, 2005; BODILY et al., 2011).

A região L está dividida em duas (L1 e L2), sendo uma região altamente conservada (principalmente a L1) em todos os HPV e representa aproximadamente 40% do genoma viral, codificando proteínas relacionadas com o capsídeo viral (SOUTO, 2005; LETO et al., 2011). Os genes L1 e L2 são expressos somente em células com infecção produtiva (CHANG et al., 1991; VILLA, 1997; BURK; CHEN; DOORSLAER, 2009).

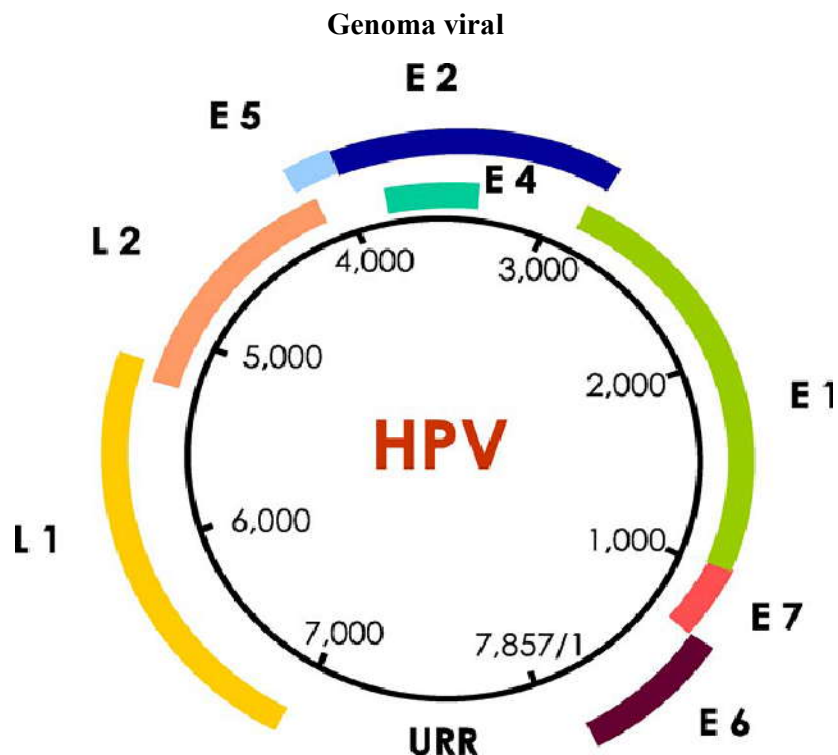


Figura 1 - Apresentação esquemática do genoma do HPV mostrando a disposição dos genes precoce e/ou não estruturais, os genes do capsídeo (L1 e L2) e a Região reguladora (URR).
FONTE: Muñoz et al., 2006.

2.5.2 Classificação

Primeiramente o Papilomavírus é classificado pela espécie de hospedeiro natural (humano, bovino, vírus de Shope) e subclassificado, em tipos, de acordo com a organização das sequências de nucleotídeos do DNA. O gênero *Papillomavírus* está dividido em: *Alpha-papillomavírus*, *Beta-papillomavírus*, *Delta-papillomavírus*, *Gama-papillomavírus*, *Episilon-papillomavírus*, *Zeta-papillomavírus*, *Eta-papillomavírus*, *Theta-papillomavírus*, *Iota-papillomavírus*, *Kappa-papillomavíruse*, *Lambda-papillomavírus*, *Mu-papillomavírus*, *Nu-papillomavírus*, *Xi-papillomavírus*, *Omikron-papillomavírus* e *Pi-papillomavírus* (DE VILLIERS et al., 2004; QUEIROZ, 2007;).

De acordo com a classificação de De Villiers et al. (2004) os papillomavírus que causam lesões mucosas e cutâneas em seres humanos e primatas pertencem ao gênero *Alpha-papillomavírus*.

Dos mais de 100 tipos de HPV identificados que são antígenicamente semelhantes têm sua classificação baseada na homologia do seu genoma dentro de uma mesma espécie. Para que sejam considerados de um mesmo tipo não podem variar mais de 2% na sua região codificante (ORF) e 5% na região reguladora (LCR). Desta forma, pequenas variações no seu genoma originam diferentes tipos de HPV (ROSA et al., 2009; CANCHE et al., 2010).

Os HPV podem ser classificados de acordo com o tropismo em cutaneotrópicos que infectam a epiderme e mucosotrópico, que infectam mucosas (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; TERAJ; TAKAGI, 2001; SILVA, 2002). As diferenças relacionadas ao tropismo ainda precisam ser estudadas, porém a diferença entre os tipos de HPV encontrados em tumores benignos e malignos permite classificá-los de acordo com o seu potencial oncogênico, em vírus de baixo risco (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e 89) e alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, 73 e 82) e provável alto risco (HPV-26, 53 e 66) (MUÑOZ et al., 2006; ROSA et al., 2009; LIPPMAN et al., 2010; LETO et al., 2011).

Os tipos de baixo risco estão associados às infecções benignas do trato genital como condiloma acuminado e neoplasias intra-epiteliais de baixo grau. Os de alto risco quando associados a outros co-fatores, têm relação com o desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais cervicais e do câncer invasor do colo uterino, da vagina e da região anal (BRASIL, 2006a). Nos carcinomas escamosos invasivos e carcinoma *in situ* do trato genital, os HPV mais prevalentes são HPV 16 e 18 (SUNDSTRÖM et al., 2010).

2.5.3 Formas de transmissão do HPV

Inúmeros fatores contribuem para a transmissão e infecção do HPV, dentre eles estão início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, baixo grau de instrução e estado civil (solteiros) (FEBRASGO, 2002; ROSA et al., 2009). A infecção pelo HPV é mais comum em mulheres jovens e adolescentes do que mulheres com mais idade (NUÑEZ-NÚÑEZ-TROCONIS et al., 2009). Trabalhos já demonstraram a presença do HPV 16 em

mulheres virgens o que vem apoiar a existência de uma rota de transmissão não sexual (KJAER, et al., 2001). A transmissão através da saliva é rara, mas pode ocorrer assim como a infecção fetal durante a gravidez/parto. (NOBILE; TACLA, 2005). Estudos têm explorado a possibilidade de transmissão vertical do HPV por contato direto durante o parto ou horizontalmente através da manipulação da criança com as mãos contaminadas durante o banho ou uso de toalhas contaminadas (KJAER et al., 2001).

A transmissão pode acontecer com uma única relação sexual com um parceiro infectado. (FEBRASGO, 2002). Mulheres virgens com prática sexual sem penetração, também podem se infectar pelo HPV, indicando que o contato genital externo é suficiente para transmissão viral (NOBILE; TACLA, 2005).

As taxas de infecção para o HPV variam e é dependente da quantidade de partículas virais, da duração do contato e do estado imunológico do indivíduo (TCHERNEV, 2009).

2.5.4 Patogenicidade

Durante a relação sexual pode ocorrer abrasões ou microlacerações no epitélio genital, em particular na zona de transformação do epitélio celular, permitindo a exposição das células basais que estão em ativa proliferação (figura 2) (GIROGLOU et al., 2001; PIVA et al., 2008; SAQUETE et al., 2009). Depois da entrada do vírus nas células basais do epitélio escamoso podem acontecer três eventos distintos; primeiramente o DNA do vírus pode se manter na forma episomal (circular e não integrado a célula hospedeira), fazendo uma infecção latente. No próximo evento a infecção latente é convertida em infecção produtiva e no terceiro evento, o DNA viral uni-se a superfície da célula hospedeira ocorrendo a integração do genoma do vírus com o genoma do hospedeiro (BOUSARGHIN et al., 2003; MOODLY; LAIMINS, 2010).

A integração do DNA do HPV ao genoma da célula hospedeira e expressão das oncoproteínas E6 e E7 representam atualmente, dois mecanismos de ativação para a progressão das lesões pré-malignas para o câncer (WOLSCHICK et al., 2007).

Mesmo que as proteínas E6 e E7 sejam necessárias para uma transformação genotípica, elas não são suficientes para guiar uma transformação das células. É necessário que ocorram eventos oncogênicos adicionais para que a progressão maligna possa acontecer (MUÑOZ, 2006; MOODLY; LAIMINS, 2010).

A infecção pelo HPV leva a ativação da expressão de uma cascata de genes virais resultando na produção de aproximadamente 20 a 100 cópias do DNA viral por célula. Essa média do número de cópias é mantida durante todo o curso da infecção. Após a entrada do HPV na célula, o genoma viral se estabiliza na forma de elementos extra cromossômicos e o número de cópias virais aumenta. Ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Uma das células filhas migra da camada basal e inicia o programa de maturação celular. A outra continua na camada basal sofrendo divisões para fornecer células para a maturação e manutenção da camada basal. Corresponde a um reservatório de DNA viral (SILVA; AMARAL; CRUZ, 2002).

A produção viral está restrita às células das camadas suprabasais, enquanto a montagem dos vírions e o empacotamento do DNA celular ocorrem nas células da camada superficial, pois, as células basais não são lisadas pela produção dos vírus, continuando a proliferação. Essa diferenciação dependente promove a infecção e manutenção persistente do HPV nas camadas basais por longos períodos (Figura 2) (FEHRMANN; LAIMINS, 2003; LACE et al., 2011). Como as células infectadas sofrem progressiva diferenciação, o número de cópias e expressão gênica viral aumenta até a expressão do gene e montagem final do virion nas células terminais diferenciadas da superfície (HUGHES; ROMANOS, 1993).

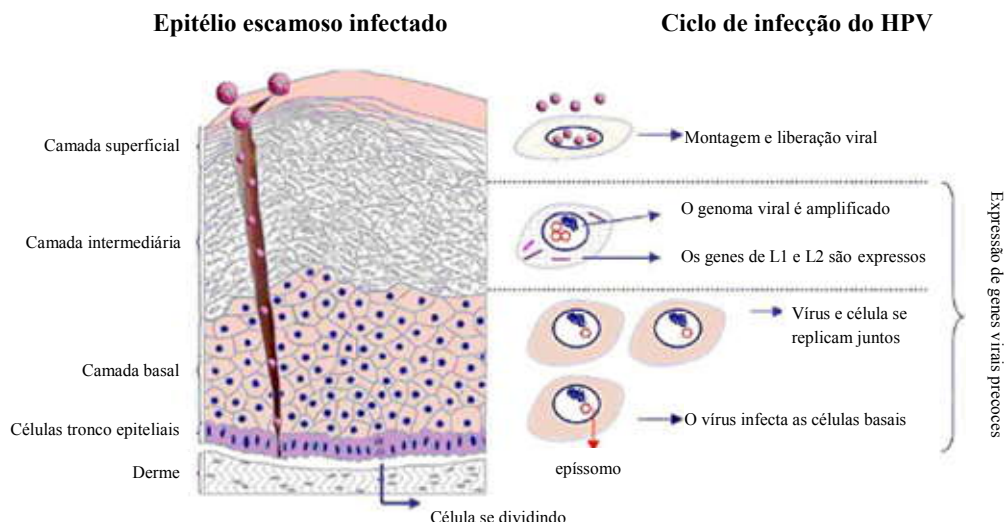


Figura 2 - Ciclo da infecção pelo HPV
 FONTE: Wyant (2007) adaptado de Doorbar (2005)

Um evento central para a transformação neoplásica das células infectadas pelo HPV de alto risco é a integração do genoma viral ao cromossomo da célula hospedeira, ao contrário das lesões benignas, onde não ocorre essa integração, pois os vírus encontram-se na forma epissomal (CARMO; FIORINI, 2007). Para o HPV integrar-se ao genoma da célula hospedeira, é necessário que ocorra uma quebra no genoma do vírus. Essa quebra não ocorre de forma aleatória, à maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado desta quebra é a perda da função destes genes, acompanhada de desregulação dos genes E6 e E7 resultando na transformação da célula (RIVOIRE et al., 2001).

O processo de carcinogênese apresenta múltiplas etapas envolvendo mudanças genéticas e epigenéticas, levando a ativação de proto-oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (SOUTO, FALHRI, CRUZ, 2005). Os genes E6 e E7 são considerados os genes de maior poder de transformação do HPV, os quais podem exercer seus efeitos interferindo nas proteínas que regulam o crescimento celular (FIORINI, 2007; GALLOWAY, 2009; TAMAYO, 2010; LACE et al., 2011).

A integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro leva a sua linearização entre os genes E1 e E2, resultando na inativação ou alteração de E2 por corte ou deleção. O

resultado dessa quebra é a perda da função desses genes que leva à desregulação da expressão dos genes E6 e E7 (RIVERA, 2006; CARMO; FIORINI, 2007). A proteína E6 tem uma grande afinidade pelo DNA e é encontrada tanto no núcleo como na membrana plasmática e forma complexo com a p53 e a enzima ubiquitina ligase, produzindo a degradação de p53, impedindo seu efeito supressor no ciclo celular frente a uma carga viral elevada ou diante de mutante do DNA celular (Zur HAUSEN, 2002; BRENNAN; SYRJANEN, 2003; SOUTO, 2005; RIVERA et al., 2006; FIORINI, 2007).

Os genes E6 e E7 codificam proteínas diretamente relacionadas com a carcinogênese induzida pelo HPV. É possível que essas proteínas sejam mediadas pela integração de E6 com a proteína p53 (supressora tumoral) e E7 com a pRb (proteína do retinoblastoma), causando a desregulação do ciclo celular e início da transformação e imortalização das células infectadas por este vírus (DOORBAR, 2005; WOLSCHICK et al., 2007). Assim, quando o DNA celular é afetado, as proteínas p53 e pRb travam o ciclo celular permitindo à célula ativar os mecanismos de reparação (MÜNGER et al., 2001; CHUNG et al., 2008). A inativação destas proteínas pelas proteínas virais impede os processos de reparação do DNA, dando origem a instabilidade genética, acúmulo de mutações e finalmente o desenvolvimento de neoplasias (AKUTSU et al., 1996; MÜNGER et al., 2001).

As proteínas E6 e E7 são necessárias para a transformação genotípicas, mas não são suficientes para direcionar a uma transformação celular. É preciso que ocorram eventos adicionais como fatores de risco tipo: paridade, tabagismo, uso prolongado de contraceptivos orais, imunossupressão, particularmente relatado em pacientes com HIV, infecção com outras DST e deficiências nutricionais para que a progressão maligna possa acontecer (WHITE et al., 1994; MUÑOZ et al., 2006; SCHIFFMAN et al., 2007; BRASIL, 2009; ROSA et al., 2009).

2.5.5 Diagnóstico do câncer do colo Uterino

2.5.5.1 Diagnóstico (HPV)

A maioria das infecções causadas pelo HPV é assintomática ou inaparente ou de caráter transitório. Suas formas de apresentação podem ser clínicas, apresentando lesões exofíticas ou verrugas, e subclínicas, onde não apresentam lesões aparentes (BRASIL, 2009).

O HPV é um vírus que não cresce em meios de cultura convencionais e os métodos diagnósticos por da sorologia apresentam precisão limitada. O diagnóstico é feito por meio da histopatologia e citopatologia das lesões ou da detecção do DNA do vírus nas células infectadas (LETO et al., 2011).

No Brasil um dos grandes problemas enfrentados pelos profissionais de saúde é o diagnóstico laboratorial das DST, entre elas o HPV, pois a grande maioria dos testes não está disponível na rede pública de saúde. Raras são as unidades de saúde habilitadas para oferecer resultados conclusivos e confiáveis, e quando estão disponíveis, quase sempre, está atrelado a projeto de pesquisa (BRASIL, 2008)

O diagnóstico de infecção por HPV pode ser baseado na combinação das características clínicas e histopatológicas e citopatológicas, levando em consideração a história clínica do paciente (FEBRASGO, 2002; GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL et al., 2009; PIVA et al., 2008). Alguns dos aspectos citomorfológicos, como a coilocitose, sugerem infecção por HPV, mas não confirmam sua presença ou o tipo de HPV presente. Existem várias técnicas moleculares utilizadas para detecção do HPV-DNA, a maioria das quais são utilizadas para fins de investigação (PIVA et al., 2008; GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL et al., 2008).

Com os avanços das técnicas de detecção molecular o genoma do HPV tem sido identificado em células neoplásicas malignas, sendo assim associado ao câncer, principalmente o câncer cervical (SILVA; AMARAL; CRUZ, 2002; LINDEMANN et al.,

2011). O uso de um teste de biologia molecular para o diagnóstico do HPV pode aumentar a sensibilidade do rastreamento cervical, já que a sensibilidade de um resultado positivo é, significativamente, mais elevada do que aquela de um único teste citológico em que a sensibilidade está em torno de 40-65% e varia dependendo da coleta e da perícia do observador (CUZICK et al., 2003).

A detecção do DNA do HPV pela técnica de PCR é importante, mas se torna necessário discriminar o tipo nas amostras clínicas provenientes das mucosas genitais, a fim de verificar se os tipos presentes são de alto ou de baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias cervicais (KANESHIMA et al., 2001).

2.5.5.2 Papanicolaou

O Papanicolaou é o exame preventivo mais comum no rastreamento do câncer cervical (Figura 3). Ele não detecta o vírus, mas as alterações que ele pode causar nas células. Este exame é indicado na rotina de *screening* do câncer cervical ou na presença de lesão HPV induzidas com o objetivo de diagnosticar neoplasias intra-epiteliais ou câncer invasor (FEBRASGO, 2002; PIVA et al., 2008).

Doenças neoplásicas invasivas do colo útero são em geral precedidas por uma longa fase pré-invasiva e são detectadas por uma combinação de citologia, colposcopia e histologia (MACEDO et al., 2010). Porém é ainda o Papanicolaou o exame de melhor custo benefício para identificação de casos do câncer do colo uterino (ELEUTÉRIO JÚNIOR et al., 2004; DINC et al., 2010).

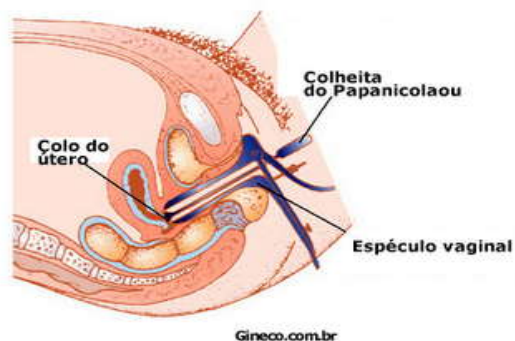


Figura 3 - Coleta de Papanicolaou
 FONTE: Sobre, 2012

2.5.5.3 Colposcopia

Exame feito com colposcópio, aparelho que aumenta o poder de visualização, permitindo identificar as lesões não visualizadas a olho nu, da vulva, vagina e colo do útero. É indicado quando há suspeita de lesões cervical no momento da avaliação clínica ou quando houver alterações citológicas positivas para neoplasia intra-epitelial, câncer ou ASC-US (IARC, 2012).

A avaliação do colo uterino com ácido acético a 5% mostrou-se eficaz nas pacientes assintomáticas no sentido de identificar as lesões precursoras do câncer cervical, aumentando a sensibilidade da citologia cérvico-vaginal. Após a aplicação do ácido, examina-se a paciente com lupa ou colposcópio. Ao exame, lesões esbranquiçadas podem ser evidenciadas (FEBRASGO, 2002).

2.5.5.4 Exame anatomopatológico

É a retirada de uma pequena amostra da lesão para análise. Sua indicação baseia-se na necessidade de confirmação diagnóstica e suspeita de neoplasia. Deve ser evitada em lesões tratadas previamente com podofilina, pois pode produzir alterações citológicas que simulam malignidade (IARC, 2012).

2.5.5.5 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Teste de alta sensibilidade na detecção viral, a PCR não é utilizada na rotina, e não deve ser recomendada para diagnóstico de lesões subclínicas. Este teste consiste na amplificação do DNA viral e tem sido utilizada principalmente, em pesquisa como padrão ouro para confirmar ou não a presença do DNA do HPV (FEBRASGO, 2002)

De acordo com Gross e Barrasso (1999), somente 10 a 20% das mulheres com HPV apresentam anormalidades citológicas, portanto essencial a confirmação do diagnóstico pelo uso de técnica de biologia molecular. Somente estas técnicas permitem a detecção do DNA do HPV e são capazes de informar ao clínico, a existência da infecção, mesmo na ausência de alterações morfológicas (TABORA et al., 2009).

A PCR consiste em um método que permite a escolha de iniciadores (*primers*) específicos para cada tipo de HPV (com base nas variações das sequências presentes nos genes E6 e E7) possibilitando a identificação do genótipo do HPV. Ainda podem ser escolhidos, *primers* para a região mais conservada do genoma do HPV como a L1, que permite a detecção dos diferentes tipos de HPV em uma única reação (TANG, 2002; BURD, 2003).

Os *primers* universais utilizados para a detecção do HPV são MY09 e MY11 (BAUER; MANOS, 1998) que amplificam 450pb da região gênica L1 do cápsideo viral. Para aumentar a sensibilidade utiliza-se o *Nested-PCR*, fazendo uso dos *primers* GP5+ e GP6+ localizados internamente à sequencias de nucleotídeos da primeira amplificação com MY09 e MY11. Esses *primers* amplificam um fragmento de 150pb (BAUER; MANOS, 1998).

A introdução do método de PCR para detecção do HPV tem disponibilizado um teste muito sensível para a detecção do DNA do HPV (KJAER et al., 2001). É o método de escolha e considerado o mais sensível disponível na detecção do DNA do HPV, atualmente

utilizado em todos os estudos, com taxas de detecção altas, geralmente maiores que outros métodos (SOUZA; GONÇALVES, 2009).

2.6 Epidemiologia (HPV- Câncer cervical)

A maior série de casos de câncer cervical invasivo investigado com um protocolo padrão foi montada por uma Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC). Cerca de 1000 mulheres histologicamente diagnosticadas com câncer cervical invasivo foram recrutadas em 22 países ao redor do mundo. As biópsias congeladas dos tumores dessas mulheres foram analisadas em um laboratório central para a detecção do DNA do HPV, utilizando rigorosos controles. Após reanálises dos casos inicialmente negativos para o HPV, o DNA deste vírus foi encontrado em 99,7% das amostras, levando a conclusão que o HPV é uma causa necessária para o câncer cervical (MUÑOZ et al., 2006; ROSA et al., 2009).

Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos da América têm demonstrado que 75% da população com idade entre 15-50 anos são infectadas com o HPV genital durante toda a sua vida, sendo que 60% apresentam infecção transitória, 10% apresentam infecção persistente confirmada pela detecção do DNA do HPV por PCR em amostras genitais, 4% com leves sinais citológicos, e 1% com lesões clínicas (WHO, 2011).

Na América Latina, Lopez et al. (2010) encontraram uma prevalência de 61,2% do DNA do HPV em mulheres com lesão de baixo grau e 78,2% em mulheres com lesão alto grau, indicando assim uma alta prevalência deste vírus na população feminina do Chile. Em um estudo sistemático de meta-análise realizado por Ciapponi et al. (2011) foi encontrada uma prevalência de 48,5% do DNA do HPV em mulheres argentinas com HSIL e 48,5% em mulheres mexicanas nas mesmas condições citológicas, 41,9% nas mulheres do Paraguai e 34,7% nas mulheres boliviana com LSIL e ASC-US. Assim, as taxas de incidência do HPV estão entre as mais altas influenciando na mortalidade por câncer do colo uterino na América Latina (PINOTTI et al., 2004).

No Brasil, estudos têm demonstrado que a infecção pelo HPV é mais frequente em mulheres jovens por estarem em pleno período reprodutivo e na fase de maior atividade sexual. Com o aumento da incidência desta infecção em adolescentes sexualmente ativas o aparecimento de lesões intra-epiteliais podem progredir para malignidade mais rapidamente devido à imaturidade da cérvix (NONMENMACHER et al., 2002; DUARTE et al., 2010).

Rama et al. (2008a) demonstraram uma prevalência de 17,8% (por PCR) da infecção genital pelas espécies de HPV de alto risco como o 16 e 18 em amostras cervicais de mulheres rastreadas para o câncer cervical na cidade de São Paulo. Na cidade do Rio de Janeiro, Pereira et al. (2007) demonstraram prevalência de 75,6% em mulheres submetidas a biopsia nas mulheres atendidas pelo Serviço de Patologia Cervical do Hospital Universitário Antonio Pedro. No nordeste brasileiro, Soares et al. (2003) demonstraram uma prevalência de 26% de HPV entre as mulheres com idade reprodutiva sem lesão citológica.

Corrêa (2007) trabalhando com amostra cervical de mulheres portadoras de lesão intra-epitelial de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino atendidas na FCECON-AM, usando técnica de PCR encontrou o DNA do HPV em 100% das amostras testadas. Dentre estas 60,5%, foram positivas na primeira reação usando como iniciadores MY09 e MY11. As demais foram positivas na reação de *Nested* PCR, utilizando os iniciadores GP5+GP6+.

Ainda no Amazonas, Ferreira (2007), utilizando a técnica de PCR detectou a presença do DNA do HPV em 94,7% de 153 mulheres com diagnóstico de lesão pré-maligna e maligna do colo do útero atendida no serviço de Ginecologia da FCECON-AM.

No estado do Amazonas, Castro et al. (2011), demonstraram prevalência de 39,28% de infecção pelo HPV em 83 mulheres atendidas na FCECON, que apresentavam diagnóstico sugestivo para infecção por HPV, displasia leve, moderada, e acentuada, carcinoma *in situ*, carcinoma microinvasor, francamente invasor e adenocarcinoma de colo uterino contra um

percentual de 6,45% em 61 mulheres atendidas no Curso de Farmácia da UFAM, que apresentavam citologia normal ou inflamatória, através da PCR, utilizando os iniciadores MY09/MY11. Os tipos de HPV encontrados relacionados com as alterações citológicas (LSIL e HSIL), neste estudo foram os tipos 16, 66, 33, 58, 13 e 68. O mais prevalente foi o tipo 16.

Naud et al. (2000) relatam que as taxas de incidência da infecção pelo HPV podem alcançar cerca de 30% a 40% em pacientes com idade inferior a 20 anos. A partir dos 35 anos, a prevalência da infecção diminui para aproximadamente 10% e a infecção pelo HPV de alto risco para cerca de 5%. No entanto enquanto a infecção pelo HPV diminui com a idade, a incidência de câncer cervical aumenta.

A incidência de mortalidade por câncer cervical tem diminuído graças ao diagnóstico precoce pela citologia, e o sucesso deste serviço tem sido modelo para outros tipos de tumores. A não realização do exame citopatológico rotineiramente representa o maior risco para desenvolver câncer do colo uterino. Porém atualmente ainda não existe método de rastreamento e diagnóstico que represente 100% de sucesso e certeza nos resultados (RIVOIRE et al., 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar e genotipar o HPV em mulheres com resultado citológico de LSIL e ASC-US.

3.2 Objetivos específicos

a) Realizar reavaliação citológica e comparar os resultados da primeira citologia com os da segunda.

b) Comparar os resultados citológicos com os da detecção molecular e genotipagem.

c) Correlacionar os dados socioeconômicos e fatores associados ao câncer de colo uterino com os resultados moleculares.

d) Comparar o resultado da segunda citologia das mulheres HPV-DNA positivo com o tipo de HPV encontrado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FUAM e aprovado, conforme parecer 006/2010CEP/FUAM (Anexo-1). A figura 4 demonstra as etapas experimentais do estudo.

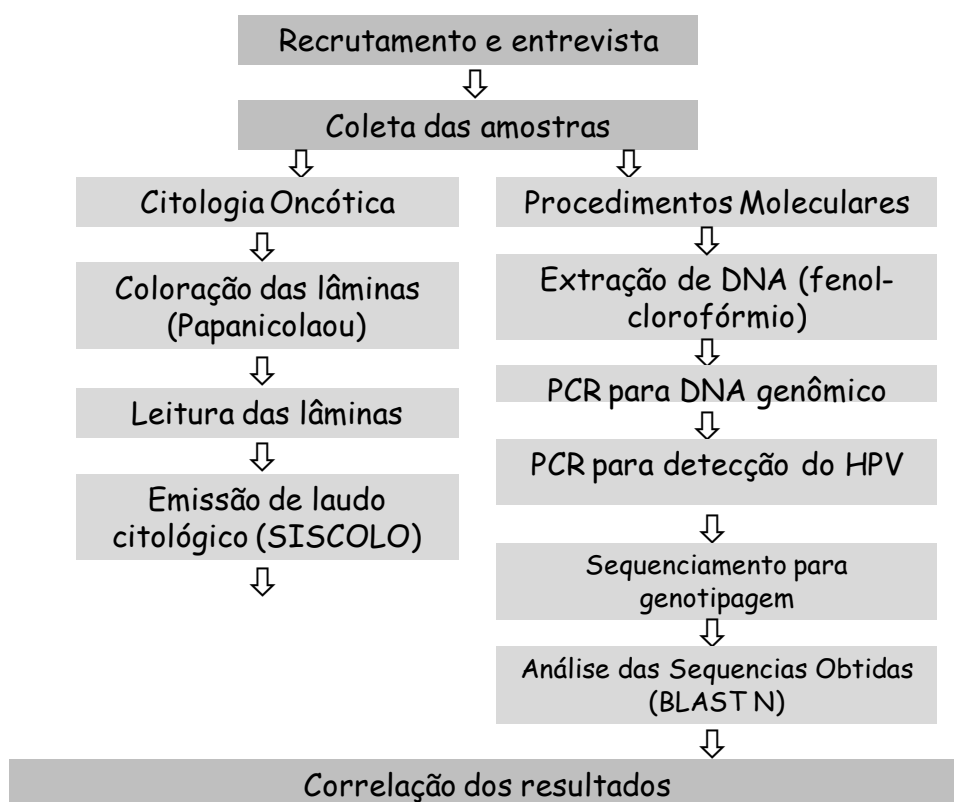


Figura 4 - Esquema demonstrativo das etapas experimentais

4.1 Tipos de estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal com componente analítico em mulheres atendidas na FUAM com resultado do exame preventivo positivo para LSIL e ASC-US.

4.2 Populações de estudo

Pacientes do sexo feminino com resultados de exame colpocitológico positivo, em exame anterior realizado na FUAM, para Lesão Intra-epitelial escamosa de Baixo Grau e Células Escamosas Atípicas de significado Indeterminado. Todas as pacientes foram

acompanhadas clínica e laboratorialmente, no ambulatório de DST da FUAM no período de janeiro de 2009 a julho de 2011.

4.3 Critérios de inclusão

- c) Pacientes que apresentaram exame colpocitológico realizado no laboratório de Citologia da FUAM cujo diagnóstico, resultou em LSIL e ASC-US, entre janeiro de 2009 a julho de 2011.
- d) Pacientes do sexo feminino, na faixa etária de 18 a 59 anos, atendidas no ambulatório de DST da FUAM.

4.4 Critérios de exclusão

- a) Pacientes que possuam resultados de exame citopatológicos compatível com os solicitados para a pesquisa, mas que não foram atendidas no ambulatório de DST da FUAM.
- b) Pacientes cujos resultados do exame citopatológico anterior apresentaram outros resultados.

4.4.1 Coleta de dados

Baseou-se nos laudos constituintes do Sistema de Informações do Câncer do colo do útero - SISCOLO (Ministério da Saúde – MS) utilizado pelo Laboratório de Citologia da FUAM, onde constam idade, endereço, contato e resultado do exame citológico, cujo modelo segue em anexo (Anexo 2).

4.4.2 Amostra clínica

Após a explanação do projeto as pacientes foram arguidas quanto a concordância em participar do estudo e que, segundo a resolução CNS 196/96 as mulheres que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 1) e responderam a um questionário padronizado (Apêndice B), através do qual foi possível traçar o perfil socioeconômico da população estudada. A partir deste questionário,

foram avaliadas informações como a idade, estado civil, escolaridade, renda familiar, idade da primeira relação sexual, idade da primeira gravidez, número de abortos, assim como também o número de parceiros sexuais.

As pacientes foram atendidas no Laboratório de Citologia Clínica da FUAM no período de Janeiro 2009 a julho de 2011 e foram identificadas no arquivo do SISCOLO aquelas que tiveram como resultado do exame citológico ASC-US e LSIL. Assim, através de busca ativa, foram convidadas a comparecer à FUAM para fazer nova coleta de material.

Paralelamente a coleta do exame citológico, também foi coletada amostra cervical para a realização do diagnóstico molecular e genotipagem viral. Para que não houvesse contaminação, a coleta da amostra destinada ao diagnóstico molecular antecedeu a coleta para o exame citológico.

Todas as coletas foram executadas pelo médico ou enfermeiro responsável, conforme rotina existente no setor, com auxílio de escova endocervical do tipo *cytobrush* e transferidas para microtubos contendo 400 µL de tampão TE (Tris HCL 10mM e EDTA 1mM pH 8,0). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da FUAM, onde foram congeladas a -20°C para em seguida serem encaminhadas para processamento e análise no Laboratório de Biologia molecular da UFAM.

Para coleta do material citológico utilizou-se espátula de Ayre e escova endocervical. O material coletado foi distribuído em lâminas de vidro com extremidade fosca e fixadas em álcool a 96% (Figura 5). Após a fixação do material, as lâminas foram coradas pelo método de Papanicolaou e o escrutínio das lâminas foi realizado no Laboratório de Citologia com ocular de 10X e objetiva de 10X e 40X com aumento final de 100X e 400X, respectivamente (MARTINS et al., 2007).

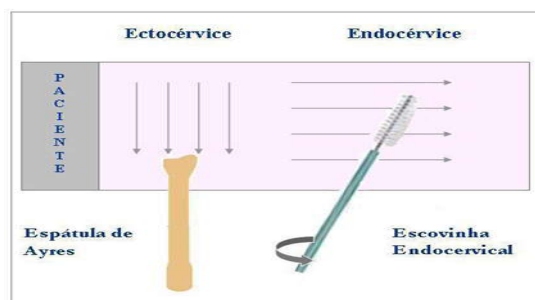


Figura 5. Material para o exame citopatológico
 FONTE: Monteiro, 2009

4.4.3 Extração do DNA

Depois de descongeladas e deixadas a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas ao processo de extração de DNA, conforme mostra a figura 6. Aos 400 μL da amostra foram acrescentados 400 μL de tampão proteolítico-TPK ([TRIS HCl 50 mM + EDTA 50mM pH 8,0], Tween 20% e Proteinase K 10 mg/mL), e incubados por 60 minutos a 56°C, seguido por 10 minutos a 95°C em banho seco. Após a etapa de lise das células o DNA foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio, precipitado com etanol e ressuspensão em 50 μL tampão TE (TRIS HCL 10mM e EDTA 1mM pH 8,0), segundo consta no anexo 4 (SAMBROOK et al., 1989).

Em seguida, foi realizada PCR para verificação da eficiência do processo de extração, e confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável com o objetivo de verificar a viabilidade do DNA extraído das amostras. Nesta etapa foi amplificado o DNA genômico humano, utilizando-se um par de iniciadores designados ISO2G que flanqueiam uma sequência de 260 pares de bases de uma região microssatélite (GATA)13 do cromossoma 15 humano (PONTES, 2003). Para todas as reações moleculares foi utilizado um controle negativo (água Mili-Q ultrapura) e um controle positivo disponibilizado pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM. O sistema da reação foi preparado com o volume final de 25 μL , conforme Quadro 1.

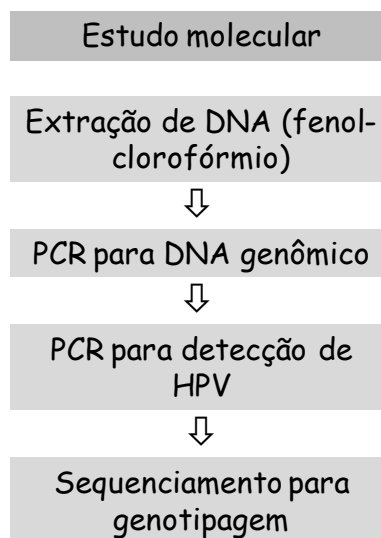


Figura 6 - Esquema demonstrativo das etapas do estudo molecular

Quadro 1 - Sistema de reação para iniciadores ISO2G

Reagente	Volume
H ₂ O	10,3 µL
Tp 5X	5,0 µL
MgCl ₂ 25Mm	2,0 µL
dNTP 10mM	0,5 µL
ISO2G5pmol	5,0 µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)*	0,2 µL
DNA	2,0 µL
Volume final	25,00 µL

*Enzima GO taq DNA polimerase PROMEGA

A reação foi realizada em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*), de acordo com as condições de termociclagem mostradas no Quadro 2.

Quadro 2- Condições da PCR para DNA genômico humano (iniciadores ISO2G)

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Etapas
1	95	2	Desnaturação inicial
40	95	1	Desnaturação
	50	1	Anelamento
	72	1	Extensão
1	72	5	Extensão final

A seguir, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo 1µg/µL, em tampão TEB1X (Tris 89mM borato 89mM e EDTA 2,5mM), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts, aproximadamente 40 minutos. Depois da corrida, os fragmentos (DNA amplificado) foram visualizadas por fluorescência

sob a luz Ultravioleta com o auxílio de um transiluminador e fotografadas em câmera digital *Olympus SP-500uz*.

4.4.3.1 Detecção do HPV

Após a confirmação do DNA genômico amplificável as amostras positivas foram submetidas a PCR para a detecção do HPV, na qual se utilizou a técnica de *Nested-PCR* que consiste em duas etapas de amplificação consecutivas. A primeira etapa da PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores MY09 e MY11 que amplificam um fragmento de 450pb da região L1 do capsídeo viral (MANOS, 1989) (Quadro 3). As condições de termociclagem estão mostradas no Quadro 6.

Para controle da reação foi usado um controle negativo de reagentes (água Milli-Q ultrapura) e um controle positivo com uma amostra conhecida positiva para o HPV previamente sequenciada pertencente ao banco de dados do Laboratório de Diagnóstico Molecular/Divisão Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar-CAM da UFAM.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídeo 1µg/µL, em tampão TEB 1X (Tris 89mM borato 89mM e EDTA 2,5mM), sob tensão elétrica de 80 Volts por aproximadamente, 40 minutos. Ao gel foram aplicadas alíquotas com um volume final de 10 µL contendo 8 µL do produto da PCR e 2 µL da solução de azul de bromofenol (TEB 5X). Foi utilizado um marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*.

Depois da corrida as bandas foram visualizadas por fluorescência sob luz Ultra Violeta com o auxílio de transluminador e fotografado em câmera digital *Olympus SP-500uz*. Os produtos das amostras amplificadas (MY09/MY11) foram armazenados a -20°C para posterior sequenciamento.

Quadro 3 - Sequências dos *primers* utilizados para o diagnóstico do HPV e tamanho dos produtos obtidos.

Patógeno	Iniciadores	Sequência*	Tamanho do amplicon
HPV	MY09	5' CgTCCMARRgCAWACTgATC 3'	450pb
	MY11	5' gCMCAgggWCATAAYAATGC 3'	
	GP5+	5' TTTgTTACTgTggTAgATACTAC 3'	150 pb
	GP6+	5'gAAAAATAAACTgTAAATCATATTC 3'	

Posições nucleotídeas variáveis M=A ou C; R=A ou G; W=A ou T; Y=C ou T.

Quadro 4 - Sistema de reação para iniciadores PCR com iniciadores MY09/MY11

Reagente	Volume
H ₂ O	14,6 µL
Tp 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50Mm	0,8 µL
dNTP 10mM	0,5 µL
<i>primer</i> MY09 5pmol	2,5 µL
<i>primer</i> MY11 5pmol	2,5 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/µL)*	0,1 µL
DNA	1,5 µL
Volume final	25,00 µL

*Enzima GO *taq* DNA polimerase Invitrogen

As amostras que se apresentaram negativas à reação com MY09/MY11 foram submetidas a uma segunda etapa de amplificação (*Nested* PCR), com o par de iniciadores (GP5+/GP6+) localizados mais internamente à sequência de nucleotídeos da primeira amplificação. Esta reação resulta em um produto de 150 pb (Quadro 2).

Os produtos da PCR obtidos com os iniciadores MY09 e MY11 foram utilizados como amostra para a segunda reação onde utilizou-se um par de iniciadores GP5+/GP6+ (RODA HUSMAN et al., 1995), conforme Quadro 5.

Quadro 5 - Sistema de reação para iniciadores PCR com iniciadores GP5+/GP6+

Reagente	Volume
H ₂ O	15,6 µL
Tp 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50Mm	0,8 µL
dNTP 10mM	0,5 µL
<i>primer</i> GP5+ 5pmol	2,5 µL
<i>primer</i> GP6+ 5pmol	2,5 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/µL)*	0,1 µL
DNA (produto da reação do MY)	0,5 µL
Volume final	25,00 µL

*Enzima GO *taq* DNA polimerase Invitrogen

Para a PCR com MY09/MY11 e *Nested*-PCR com GP5+/GP6+ utilizou-se as seguintes condições de termociclagem (Quadro 6).

Quadro 6 - Condições da PCR para detecção do HPV através dos iniciadores MY e GP

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Reação
1	95	1	Desnaturação inicial
40	95	1	Desnaturação
	55	1	Anelamento
	72	1	Extensão
1	72	5	Extensão final

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese a 2,0% e corados com brometo de etídeo 1µg/µL, em tampão TEB 1X, sob tensão de 80 Volts por aproximadamente, 40 minutos e fotografados.

4.4.3.2 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos da PCR positivos quando se utilizou os iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+ foram purificados com o sistema que utiliza as Enzimas, *Exo-Sap* (Exonuclease-*Exo* e Fosfatase alcalina de Camarão – *Sap*). Esta etapa tem como objetivo a eliminação de substâncias não incorporadas durante a reação de amplificação como os sais, *primers* e dNTPs, que possam interferir na reação de sequenciamento.

O sistema de purificação consiste em um volume final de 13 µL, composto de 10 µL do produto da PCR (MY09/MY11 ou GP5+/GP6+); 2,33 µL de água Milli-Q; 0,4 µL da Enzima *Sap*; 0,27 µL da Enzima *Exo*, seguindo incubação por 30 minutos a 37°C e 20 minutos a 65°C, temperaturas ideais para a ação dessas enzimas (Quadro 7).

Quadro 7 - Sistema de reação de purificação

Reagente	Volume
Produto da PCR (MY09/MY11 ou GP5+/GP6)	10,00 µL
Água Mili-Q	2,33 µL
<i>Exo</i>	0,27 µL
<i>Sap</i>	0,40 µL
Volume final	13,00 µL

4.4.3.3 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento constitui-se de três etapas: 1) reação de sequenciamento e precipitação dos componentes da reação; 2) leitura no sequenciador automático; 3) análise e edição inicial das sequências.

A reação de sequenciamento foi realizada em uma placa (ABI 3130 *Applied Biosistem*) específica para eletro injeção em sequenciador automático.

O sistema da reação de sequenciamento para o volume final de 10 µL foi composto dos reagentes Big Dye, tampão, *primer* (podendo ser MY09 ou MY11 5 pmol ou GP5+ ou GGP6+ 5 pmol), Água Mili-Q e produto da PCR purificado conforme mostrado no Quadro 8.

Quadro 8 - Sistema de reação de sequenciamento

Reagente	Volume
Água Mili-Q	5,7 µL
Tp 5X	2,0 µL
DBig Dye	0,3 µL
<i>Primer</i> (MY09 ou MY11 ou GP5+ ou GP6)	1,0 µL
DNA	1,0 µL
Volume final	10,00 µL

As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com as condições mostradas no Quadro 9 - em termociclador *Applied Biosistems*.

Quadro 9 - Condições para a reação de sequenciamento

Etapas	Temperaturas	Tempo
Desnaturação	96°C	1min
Desnaturação	96°C	15seg
Anelamento	50°C	15seg
Extensão	60°C	4min
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Indefinido

} 25 ciclos

4.4.3.3.2 Precipitação do produto da reação de Sequenciamento

Para a precipitação do DNA utilizou-se o protocolo com Isopropanol/Etanol (Anexo 5).

A ressuspensão das amostras foi feita utilizando Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems* P/N 4311320) (Anexo 6). Em seguida as amostras foram aplicadas para

sequenciamentos em seqüenciador automático ABI 3130 (*Applied Biosystems*) de acordo com a metodologia padrão recomendada pelo fabricante.

4.4.3.3 Análises das sequências

As sequências foram conferidas utilizando-se o programa BioEdit Version 70.0 (HALL, 1999).

A edição inicial das sequências foi realizada e em seguida prosseguiu-se a identificação e confirmação do tipo de HPV. Compararam-se as sequencias editada das amostras sequenciadas com as sequências nucleotídicas depositadas no Banco Mundial de Nucleotídeos – *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST/BLASTN (ALTSCHUL, 1997) pelo o site: www.ncbi.nlm.nih.gov. Foram consideradas válidas as homologia das sequências com *e-value* menor que e^{-10} .

4.4.3.4 Análise dos dados

Foi realizada a correlação entre os resultados obtidos na colpocitologia, dados clínicos e socioeconômicos com os da biologia molecular.

Os dados estão apresentados por meio de tabelas e gráficos de frequência, sendo que para variáveis quantitativas foram calculadas as médias e o desvio padrão. Na análise dos dados foi utilizado ainda o teste do Qui-quadrado de *Pearson*.

A análise das variáveis quantitativas foi realizada através da comparação das médias e teste exato de Fisher. Quando constatado normalidade dos dados utilizou-se o Teste T de Student. O nível de significância fixado na aplicação dos testes foi de 5% ($p < 0,05$) com um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Características da população estudada

Foram pesquisadas 70 amostras cervicais de pacientes atendidas na FUAM. O grau de instrução, a renda familiar, o estado civil estão demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição em relação aos dados socioeconômicos das pacientes atendidas no ambulatório de DST da FUAM-Manaus-AM.

Variáveis (n = 70)	f_i	%
Escolaridade		
Fundamental incompleto	12	17,1
Fundamental completo	7	10,0
Médio incompleto	3	4,3
Médio completo	28	40,0
Superior incompleto	17	24,3
Superior completo	3	4,3
Estado civil		
Solteiro	45	64,2
Casado/união estável	22	31,4
Divorciada/Separada	2	3,0
Viúva	1	1,4
Renda familiar		
Menos de um salário mínimo	4	5,8
Um salário Mínimo	14	20,0
Dois salários mínimos	18	25,7
Três Salários mínimos	14	20,0
Quatro Salários mínimos	12	17,1
Não informou	8	11,4
Trabalham		
Sim	39	55,7
Não	31	44,3
Idade		
Média ± DP	29,9 ± 11,1	

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio-padrão.

Fonte: Questionário realizado com as pacientes estudadas.

Observou-se o início da atividade sexual das mulheres estudadas bastante precoce com idade menor que 16 anos correspondendo a 45,7% (32/70). Quanto ao uso de preservativo, 25,7% (18/70) informaram usar sempre com o parceiro fixo, 31,4% (22/70) nem sempre usam e 15,7% (11/70) raramente, 12,9% (9/70) nunca e 14,3% (10/70) não responderam. Doze pacientes afirmaram ter parceiros eventuais e 83,3% delas (10/12) relataram sempre usar o preservativo, 16,7% (2/12) raramente usam e quando foi questionada quanta a razão, afirmaram sentir incomodo ou o parceiro prefere não usar (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição em relação aos dados de início das atividades sexuais, tipo de parceria sexual e uso de preservativo. Manaus-AM

Variáveis	f _i	%
Idade do início das atividades sexual		
< 16 anos	32	45,7
≥ 16 anos	38	54,3
Uso de preservativo com parceiro fixo		
Sempre	18	25,7
Nem sempre	22	31,4
Raramente	11	15,7
Nunca	9	12,9
Não respondeu	10	14,3
Uso do preservativo com o parceiro eventual (n = 12)		
Sempre	10	83,3
Raramente	2	16,7

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio-padrão.

Quando as pacientes foram interrogadas quanto ao número de parceiros sexuais ao longo da vida 71,4% (50/70) das mulheres estudadas tiveram de 1 a 5 parceiros, 15,7% (11/70) de 6 a 10 e acima de 10 parceiros 12,9% (9/70). Quanto ao número de parceiros nos últimos 12 meses 70% (49/70) tiveram apenas 1 parceiro fixo, 14,3% (10/70) nenhum, 11,4% (8/70) dois e 4,3% (3/70) 3 parceiros. Estas mesmas pacientes quando interrogadas quanto ao número de parceiros eventuais nos últimos 12 meses 82,8% (58/70) delas responderam que não tiveram parceiros eventuais, 17,2% (12/70) tiveram parceiros eventuais nos últimos doze meses. E quando interrogadas quanto a antecedentes de DST, 90% responderam sim e 10% não, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição do número e percentagem de acordo com as características do comportamento sexual e antecedentes de DST. Manaus-AM

Variáveis (n = 70)	f _i	%
Número de parceiros sexuais ao longo da vida		
De 1 a 5 parceiros	50	71,4
De 6 a 10 parceiros	11	15,7
Acima de 10 parceiros	9	12,9
Parceria sexual		
Parceiros eventuais	12	17,2
Parceiros fixos	58	82,8
Antecedentes de DST		
Sim	63	90,0
Não	7	10,0

f_i = frequência absoluta simples.

Conforme é apresentado na Tabela 4, 90% (63/70) das mulheres referiu histórico anterior de DST, sendo que 85,7% (54/63) relataram ter sido tratada para verrugas genitais, 6,3% (4/63) referiram ter herpes genital, 3,2% (2/63) HIV, 1,6% (1/63) já haviam recebido tratamento para gonorreia e 3,2% para sífilis.

Tabela 4 - Distribuição do número e percentagem de acordo com os antecedentes de DST. Manaus-AM

Doenças sexualmente transmissíveis anteriores (n = 62)	f_i	%
Verruga genital	54	85,7
Herpes	4	6,3
HIV	2	3,2
Gonorreia	1	1,6
Sífilis	2	3,2

f_i = frequência absoluta simples.

Na população estudada o número de gestações foi de aproximadamente duas sendo que o número máximo de gravidez foi de sete e o número máximo de filhos foi de seis. Dessas mulheres, 34,28% (26/70) já fizeram aborto e 100% já realizaram o Preventivo de Câncer de colo do Útero (PCCU) nos últimos dois anos e 8,6% (6/70) já se relacionou com um parceiro sexual tendo conhecimento do mesmo ser portador de DST (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição do número e percentagem de acordo com o número de gestações, aborto e antecedentes de DST. Manaus-AM.

Variáveis	f_i	%
Número de gestações (n=44)		
Uma	10	22,7
Duas	13	29,5
Três	8	18,2
Quatro	4	9,1
Cinco	5	11,4
Seis	3	6,8
Sete	1	2,3
Número de abortos (n=26)		
Espontâneo	15	57,7
Provocado	11	42,3
Parceiro sexual com DST (n=70)		
Sim	6	8,6
Não	64	91,4

f_i = frequência absoluta simples.

Um total de 70 mulheres recrutadas a partir do resultado citológico (34/70-ASC-US e 36/70-LSIL) no período janeiro a julho de 2011 foi submetido à repetição do PCCU. A média de idade dessas mulheres foi $29,9 \pm 11,1$.

Na repetição da citologia obtivemos os seguintes resultados: Dentro do Limite da Normalidade 11,4% (8/70), inflamação 47,2% (33/70), ASC-US 31,4% (22/70) e LSIL 8,6% (06/70) e HSIL 1,4 (1/70), melhor demonstrado na Tabela 6. Portanto, 40% (28/70) apresentaram as lesões de interesse do estudo.

Tabela 6 - Distribuição do número e percentagem de acordo com o resultado da primeira e da última citologia. Manaus-AM

Variáveis (n = 70)	f _i	%
Primeira citologia		
ASC-US	34	48,7
LSIL	36	51,3
Citologia Atual		
Dentro do limite da normalidade	8	11,4
Inflamação	33	47,2
ASC-US	22	31,4
LSIL	6	8,6
HSIL	1	1,4

f_i = frequência absoluta simples.

5.2 Procedimentos Moleculares

Após a extração do DNA foi feita uma PCR para verificação da eficiência do processo de extração e confirmar a presença do DNA cromossomal humano, assim como verificar a integridade e viabilidade do DNA extraído. Nesta etapa amplificou-se o DNA genômico humano, utilizando-se iniciadores ISO2G (PONTES et al., 2003). As amostras foram consideradas adequadas para o estudo molecular (Figura 7).

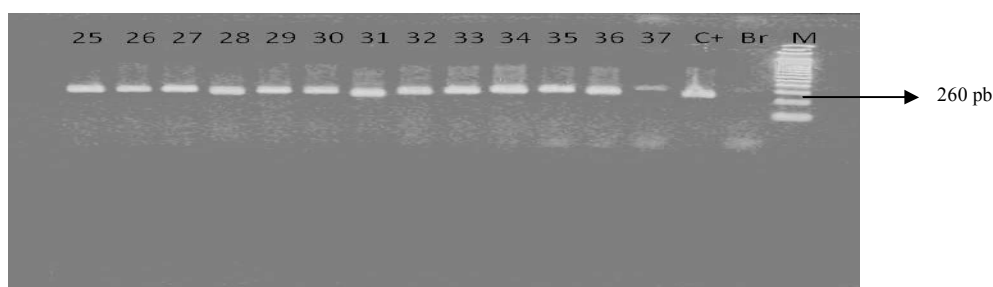


Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo 1µg/µL, evidenciando um fragmento em torno de 260 pb correspondente a amplificação de uma região microssatélite (GATA)13 do cromossomo 15 humano, utilizando-se dos iniciadores ISO2G (PONTES et al., 2003). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologie*. Amostras de 25 a 37, C+ = controle positivo, Br = Branco, M = Marcador.

A infecção pelo HPV foi encontrada em 28,6% (20/70) das amostras examinadas. Utilizando-se os iniciadores MY09/MY11 foi possível detectar a presença do HPV em 20,0% (14/70) das amostras (Figura 8). Quando utilizamos os iniciadores GP5+/GP6+ (*Nested-PCR*) foi possível detectar a presença do HPV em mais seis (6) amostras perfazendo um total de 28,6% (20/70) das amostras positivas para HPV.



Figura 8 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado em brometo de etídeo 1 μ g/ μ L, evidenciando um fragmento de 450 pb, utilizando-se dos iniciadores MY09/MY11. Amostras de 6, 9, 11, 13, 14, 19, 20, 23, 29, 31, 34, e, 35, C+ = controle positivo Br = branco e M = marcador.

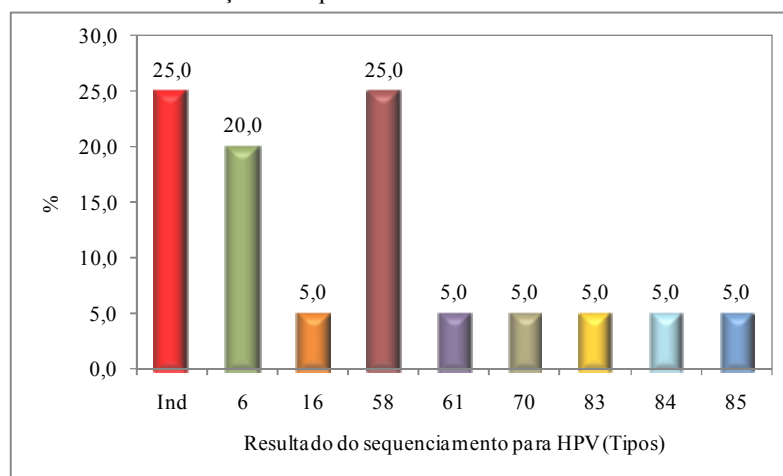
Tabela 7 - Distribuição do número e percentagem de acordo com o resultado da PCR e iniciadores utilizados. Manaus-AM

Variáveis (n=70)	f _i	%
PCR		
Positivo	20	28,6
Negativo	50	71,4
Iniciadores (MY09/MY11)		
Positivo	14	20
Negativo	56	80
Iniciadores (GP5+/GP6+)(n=56)		
Positivo	6	10,8
Negativo	50	89,2

f_i = frequência absoluta simples.

Todas as amostras positivas para HPV foram sequenciadas e, após comparação com as sequencias depositadas no *GenBank*, através do programa BLAST, foi possível identificar 08 tipos de HPV diferentes, conforme representado no Gráfico 1.

Figura 9 – Gráfico da distribuição dos tipos de HPV encontrados nas mulheres estudadas



O tipo de HPV mais prevalente dentre as amostras sequenciadas foi o HPV 58, encontrado em 25% (5/20) das amostras positivas, seguido do HPV 06 encontrado em 20% (4/20) das amostras. No restante das amostras foi encontrado o HPV 16, 70, 61, 83, 84 e 85 (Gráfico 1). Não foi possível identificar o tipo de HPV em cinco amostras (25%) com resultado positivo, uma vez que as sequências obtidas não apresentaram similaridade com as sequências depositadas no *GenBank*. Para a definição dos genótipos, seria necessária a clonagem molecular dos produtos de PCR e posterior sequenciamento.

Observou-se que de acordo com o resultado do novo exame citológico o DNA do HPV 58 foi encontrado em 40% (2/5) das amostras com resultado de citologia inflamatória. Nos resultados de LSIL e ASC-US foi encontrado em 20% (1/5) em cada um dos resultados citológicos, como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 8 - Distribuição do resultado do sequenciamento em relação resultado da citologia atual. Manaus-AM

Variáveis (n = 20)	Nova Citologia					TOTAL
	Normal	Inflamação	ASC-US	LSIL	HSIL	
Tipo de HPV						
6	-	1	3	-	-	4
16	-	-	-	-	1	1
58	1	2	1	1	-	5
61	-	-	1	-	-	1
70	-	-	-	1	-	1
83	-	-	1	-	-	1
84	-	1	-	-	-	1
85	-	1	-	-	-	1
Indeterminado	-	1	4	-	-	5

Quando comparamos o resultado da citologia atual com a citologia realizada anteriormente, observamos que 65,7% das mulheres que apresentaram lesão de baixo grau na primeira citologia, persistiram com este resultado mesmo 1 ano tempo depois como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 9 - Distribuição dos resultados de Papanicolaou atual em comparação ao resultado deste exame realizado previamente. Manaus-AM

Citologia Atual (n=70)	Primeira Citologia				Total
	ASC-US		LSIL		
	f _i	%	f _i	%	
Dentro do limite da normalidade	3	37,5	5	62,5	8
Inflamação	18	54,5	15	45,5	33
ASC-US	10	45,5	12	54,5	22
LSIL	2	33,3	4	66,7	6
HSIL	1	100,0	-	-	1

f_i = frequência absoluta simples

De acordo com o demonstrado na Tabela 11, verificou-se que o maior percentual de positividade para a presença do HPV-DNA foi naquelas mulheres que apresentaram no último exame citológico ASC-US.

Tabela 10 - Distribuição em relação a citologia atual e o resultado da PCR. Manaus-AM

Citologia Atual (n = 70)	PCR				Total
	Positivo		Negativo		
	f _i	%	f _i	%	
Normal	1	12,5	7	87,5	8
Inflamação	6	18,2	27	81,8	33
ASC-US	10	45,5	12	54,5	22
LSIL	2	33,3	4	66,7	6
HSIL	1	100,0	-	-	1

f_i = frequência absoluta simples

Quando analisamos os dados socioeconômicos em relação ao resultado da PCR para HPV-DNA nas mulheres que participaram do estudo não observamos significância estatística entre as pacientes positivas e negativas (p -valor > 0,05) conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 11 - Distribuição segundo aos dados socioeconômicos em relação ao resultado da PCR para HPV das pacientes atendidas no ambulatório de DST da FUAM.

Variáveis (n = 70)	PCR				Total	P
	Positivo		Negativo			
	f _i	%	f _i	%		
Escolaridade						
Fundamental incompleto	2	16,7	10	83,3	12	***
Fundamental completo	3	42,9	4	57,1	7	
Médio incompleto	1	33,3	2	66,7	3	
Médio completo	7	25,0	21	75,0	28	
Superior incompleto	6	35,3	11	64,7	17	
Superior completo	-	-	3	42,9	3	
Estado civil						
Solteiro	13	28,9	32	71,1	45	***
Casada/ união estável	6	27,3	16	72,7	22	
Divorciada/Separada	1	50,0	1	50,0	2	
Viúva	-	-	1	100,0	1	
Renda familiar						
Menos de um salário	2	40,0	3	60,0	5	***
Um salário mínimo	4	28,6	10	71,4	14	
Dois salários mínimos	5	27,8	13	72,2	18	
Três salários mínimos	5	35,7	9	64,3	14	
Quatro salários mínimos	2	16,7	10	83,3	12	
Acima de cinco salários	2	33,6	4	66,1	6	
Não sabe informar	-	-	1	100,0	1	
Trabalham						
Sim	10	25,6	29	74,7	39	0,542**
Não	10	32,2	21	67,7	31	
Idade						
Média ± DP	29,0 ± 9,6		30,3 ± 11,8			0,674*

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio-padrão; *Teste T de Student; **teste do Qui-quadrado de Pearson
 ***Não é possível aplicar o teste devido a restrição do Qui-quadrado (VIEIRA, 2010).

A análise das variáveis clínicas foi realizada por meio de testes que verificaram a independência das variáveis como teste do Qui-quadrado de Pearson, quando este teste não

pode ser aplicado foi utilizado o teste exato de Fisher. A grande maioria das variáveis não obteve significância estatística, apenas as variáveis uso de anticoncepcional e aborto apresentaram p -valor 0,034 e 0,032 respectivamente como demonstrado na Tabela 13.

Tabela 12 - Comparação entre variáveis e resultado da PCR das mulheres atendidas no ambulatório de DST da FUAM, na cidade de Manaus – AM.

Variáveis (n = 70)	PCR				Total	P
	Positivo		Negativo			
	f _i	%	f _i	%		
Abortos						
Sim	3	12,5	21	87,5	24	0,032*
Não	17	37,0	29	63,0	46	
Idade da primeira relação sexual						
< 16 anos	12	26,7	33	73,3	45	0,636*
≥ 16 anos	8	32,0	17	68,0	25	
Idade de primeira gravidez						
< 16 anos	6	40,0	9	60,0	15	0,066*
≥ 16 anos	4	14,3	24	85,7	28	
Uso de Preservativo com parceiro fixo (n=58)						
Sempre	8	50,0	8	50,0	16	***
Nem Sempre	1	4,5	21	95,5	22	
Raramente	3	27,3	8	72,7	11	
Nunca	6	30,0	3	6,0	9	
Uso do preservativo com parceiro eventual (n=12)						
Sempre	5	41,6	5	41,6	10	***
Nunca	-	-	2	100,0	2	
Numero de parceiros ao longo da vida						
De 1 a 5	14	28,6	36	71,4	50	***
De 6 a 10	3	27,3	8	72,4	11	
Acima de 10	3	15,0	6	12	09	
Uso de anticoncepcional						
Sim	9	47,4	10	52,6	19	0,034*
Não	11	21,6	40	78,4	51	
Presença de Queixa						
Sangramento	-	-	1	100,0	1	***
Verrugas genitais	11	42,3	15	57,7	26	
Presença de corrimento	-	-	4	100,0	4	
Consulta de rotina	9	23,1	30	76,9	39	
Antecedentes de DST						
Sim	16	25,8	46	74,2	62	0,156**
Não	4	50,0	4	50,0	8	

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio-padrão; *Teste do qui-quadrado de Pearson; ** Teste exato de Fisher; ***Não é possível aplicar o teste devido a restrição do Qui-quadrado (VIEIRA, 2010). Valor de **p** em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5% de significância.

FONTE: Questionário realizado com as mulheres que participaram do estudo.

6 DISCUSSÃO

No período alvo do estudo (janeiro de 2009 a julho de 2011), a amostra era composta de 100 mulheres que tiveram resultado citológico de ASC-US e LSIL. Como este estudo propôs a busca ativa destas pacientes não foi obtido êxito em 100% das amostras. Porém, 70% da amostra inicial foi recuperada. Os motivos pelos quais não foi conseguido 100% da amostra proposta variaram desde a troca de endereço, telefone até mesmo a recusa em participar de uma nova avaliação.

Neste estudo, foi observado que a maioria das mulheres infectadas pelo HPV são jovens, solteiras e tiveram o início de suas atividades sexuais precocemente. Possuem baixa escolaridade e renda familiar. Esses resultados mostram-se de acordo com os encontrados nos diversos estudos de detecção desses patógenos (FERNANDES et al., 2008; JAIME LOPEZ et al., 2010; TAKEHARA et al., 2011).

O presente estudo não encontrou associação entre os fatores socioeconômicos e clínicos e a infecção pelo HPV (Tabelas 12 e 13). Porém, foi encontrada associação com a presença do HPV e o número de abortos e uso prolongado de contraceptivos orais (Tabela 13) corroborando com os relatos de Muñoz et al. (2006).

Para a detecção do HPV-DNA nessas amostras, utilizou-se a técnica de *Nested-PCR*, a fim de aumentar a sensibilidade da reação, já que utilizando somente os iniciadores MY09/MY11, 8,6% das amostras (6/70), resultariam em um diagnóstico falso-negativo. A vantagem apresentada pelo sequenciamento direto é a identificação inequívoca do tipo viral e uma das desvantagens é a dificuldade de sequenciar pequenos fragmentos de DNA. Sendo assim, não foi possível identificar o HPV em cinco amostras das 6/56 (10,8%), as quais só obtivemos resultado positivo após a segunda reação (*Nested-PCR*), cujo produto final foi de 150 pb (GP5+/GP6+). Em virtude disso, um passo técnico adicional de alto custo e

complexidade deveria ser usado como alternativa: a clonagem desses fragmentos (SANTOS 2007). Esses detalhes técnicos resultariam no aumento da complexidade da fase experimental.

O HPV-DNA foi encontrado em 28,6% das 70 pacientes neste estudo. Os resultados, em relação à detecção do HPV-DNA em mulheres com citologia normal encontrados neste estudo (12,5%), estão de acordo com as prevalências encontradas por outros autores, que relatam uma faixa bastante variada, de 3 a 51% dependendo da população estudada (NONNEMACHER et al., 2002; DE PAULA et al., 2007; TÁBORA et al., 2009).

Um estudo realizado por Núñez-Troconis et al. (2009), revelaram uma prevalência de 8,7% para o HPV em mulheres com citologia normal na Venezuela. Vaucel et al. (2011), relataram uma prevalência de 13% em amostras de mulheres normais na França. Tábora et al. (2009), relataram prevalência de 51% do DNA do HPV em mulheres com essa mesma característica, em Benin, Oeste da África. Piras et al. (2011), encontraram o DNA do HPV em 26,7% das amostras que tiveram como resultado citologia normal em mulheres, em Madri na Espanha. Lindemann et al. (2011), demonstraram uma prevalência de 29,8% do DNA do HPV nas mulheres nessas mesmas condições citológicas.

No Brasil, Fernandes et al. (2008) relataram uma positividade de 24,5% do DNA do HPV para mulheres com citologia normal em Natal, Rio Grande do Norte. Outro estudo realizado por Oliveira et al. (2006), relataram um prevalência de 27,4% em mulheres nessas mesmas condições citológicas no Rio de Janeiro.

Em Manaus, Castro (2002), encontrou uma positividade do HPV-DNA em 6,45% das mulheres com citologia normal e Lira (2010) 48,78% em mulheres com estas mesmas particularidades citológicas. No estudo apresentado neste trabalho, 30,7% das 20 mulheres com PCR positiva para o HPV apresentaram citologia normal. Castro (2002) apesar de ter trabalhado com a população manauara encontrou uma positividade muito baixa e isto pode ter ocorrido em função da metodologia utilizada, pois utilizou somente a reação com MY09 e

MY11. Assim como diversos autores, enfatizamos a necessidade do *Nested-PCR* para o diagnóstico do HPV, pois como relatado anteriormente, quando se utiliza somente a reação com MY09 e MY11 muitos resultados culminam com falso negativo (CASTRO et al., 2011).

O HPV-DNA encontrado nas pacientes com citologia alterada neste estudo, corroboram com os resultados obtidos por Camara et al. (2003) que encontraram 26,4% do HPV-DNA quando analisaram uma população de 159 mulheres com diagnóstico que variaram desde citologia de ASC-US, LSIL e AGUS em mulheres de Brasília-DF. Assim como Camara et al. (2003), Oliveira et al. (2006) encontraram o HPV-DNA em 25,3% das mulheres com LSIL no Rio de Janeiro.

No nosso estudo, encontramos o DNA do HPV em 10 casos (45,5%) das mulheres com ASC-US, 2 casos (33,3%) com LSIL e 1 caso (100%) nas mulheres com HSIL. A frequência do HPV-DNA neste estudo ficou abaixo da relatada por outros autores como Lidemann et al. (2011) que relataram uma prevalência do HPV-DNA em 52% de n=498 mulheres com LSIL na Espanha e López et al. (2010) que encontraram uma prevalência de 61,2% (n=116) do HPV-DNA em mulheres com LSIL e 78,2% (n=119) em mulheres com HSIL no Chile. Porém os resultados de Núñez-Troconis et al.(2009) que encontraram uma prevalência de 40% do HPV-DNA em mulheres com LSIL na área urbana da Venezuela estão mais próximos dos resultado encontrado em nosso estudo.

No Brasil, Fernandes et al. (2008) relataram uma prevalência de 38,6% do HPV-DNA nas mulheres com LSIL em Natal-RN. E Lippman et al. (2010) relataram uma prevalência de 9,8% do DNA do HPV nas mulheres com ASC-US/AGUS e 6,1% nas mulheres com LSIL em São Paulo.

Em Manaus, Castro (2002) encontrou uma positividade de 39,2% para o HPV-DNA nas mulheres com LSIL e HSIL usando como iniciadores somente MY09/MY11. Usando

iniciadores GP5+/GP6+ aumentaria a sensibilidade e provavelmente encontraria positividade maior para o DNA deste vírus. Outro estudo, realizado por Ferreira (2007) relatou uma prevalência do HPV-DNA em 100% das mulheres com LSIL. Assim como Ferreira, Lira (2010) identificou prevalência de 100% do HPV-DNA nas mulheres estudadas com LSIL na capital Manaus.

Observou-se uma variação nos nossos resultados nos diversos estudos citados onde relacionam o resultado do exame citológico e a avaliação molecular. A avaliação molecular pode ser considerada mais exata, pois a avaliação citológica é subjetiva e depende da perícia do observador, pois além do conhecimento técnico o citologista interpreta as alterações citológicas no contexto de cada esfregaço (CUZICK et al., 2003; GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL et al., 2008).

No presente estudo, foi possível a genotipagem de 8 tipos diferentes do HPV (HPV-6, 16, 58, 61, 70, 83, 84 e 85) nas amostras analisadas. Quase todos os tipos encontrados foram de baixo risco e risco indeterminado, com exceção dos tipos 58 e 16, considerados de alto risco (MUÑOZ et al., 2006).

Nas mulheres estudadas, o HPV 58 que pertence ao gênero alfa-papilomavírus e espécie 9, classificado como de alto risco para o câncer (de VILLIERS et al., 2004; MUÑOZ et al., 2006), foi o tipo mais frequente e foi encontrado em 25% das amostras analisadas. Foi também o mais prevalente nos dois tipos de alterações estudadas (ASC-US-40%, LSIL-60%), seguido do HPV 6 (ASC-US-25%, LSIL-75%). No estudo de Ferreira (2007), realizado em Manaus, em pacientes da FCECON-AM, o HPV 16 foi o mais prevalente nas mulheres estudadas com LSIL, HSIL e Câncer.

A frequência do HPV 58 neste estudo foi maior do que a relatada por outros autores: 2,6% em mulheres com lesão de baixo grau no Chile (JAIME LÓPEZ et al., 2010), 4,4% em mulheres nessa mesma situação citológica na República Tcheca (TACHEZY et al., 2011),

8,2% em mulheres com LSIL em Madri na Espanha (LIDEMANN et al., 2011), 13,4% em Benin Oeste da África (PIRAS et al., 2011).

Na região central do México, Piña et al. (2006) encontrou uma prevalência de 18,6% deste genótipo. O HPV 58 foi também o mais comum no Japão em mulheres com ASC-US (22%) e LSIL (21,9%) (TAKEHARA et al., 2011), curiosamente Touze et al. (2001) mostraram na Espanha que 75% das mulheres testadas soropositivamente para o tipo 58 haviam nascido em um país latino-americano.

No Brasil, o HPV 58 foi encontrado em 12,5% das mulheres com lesões precursoras, sendo o segundo genótipo mais frequente em Brasília, Distrito Federal (CAMARA et al., 2003). Um estudo realizado por Fernandes et al. (2008) encontraram uma prevalência de 8,7% do genótipo do HPV 58 nas mulheres em Natal-RN. Assim, diferentes áreas do Brasil podem ter variações na prevalência deste genótipo do HPV.

Embora menor que o relatado no México e no Japão, as prevalências de HPV 58 na América Latina são superiores a média mundial. No Brasil, foi encontrado 12,5% nas mulheres com lesões precursoras do câncer do colo uterino (CAMARA et al., 2003), na Costa Rica 10% em mulheres com lesão de alto grau (HERRERO et al., 2000), na Colômbia 5,1% em mulheres saudáveis (SO-TO-DE LEON et al., 2009).

No nosso estudo, o HPV 58 mostrou-se o mais prevalente entre as mulheres infectadas (25%). Esta taxa é muito alta, quando comparada a outros estudos realizados no Brasil. Este é um dado importante, pois como evidenciado por Muñoz et al. (2006), o HPV 58 apresenta uma *odds ratio* (OR) de 91,3 para carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. Assim, faz-se necessário o rastreamento epidemiológico destas pacientes com ASC-US e LSIL que apresentaram como resultado da genotipagem, o HPV 58 neste estudo, devido seu potencial para o desenvolvimento de câncer cervical.

Apesar de o estudo ter sido feito em uma população amostral pequena, a alta prevalência do HPV 58 nas lesões precursoras do câncer do colo uterino leva a uma reflexão em relação ao impacto das vacinas disponíveis no mercado.

O HPV 6 foi o segundo tipo mais frequente e foi encontrado em 20% (4/20) das mulheres estudadas com amostras positivas para o HPV-DNA. Foi também um dos mais prevalentes nos dois tipos de alterações citológicas analisadas (ASC-US-25%, LSIL-75%), corroborando com os resultados encontrados por Dursun et al. (2009) que, estudando a prevalência dos tipos de HPV em mulheres turcas, encontraram o HPV-DNA do tipo 6 em 22% das mulheres com citologia normal e 19% com citologia alterada. O HPV 6 é benigno, responsável por lesões exofíticas (verrugas), pertence ao gênero alfa e espécie 10 considerado de baixo risco para o câncer.

Um estudo de prevalência molecular do HPV em mulheres na Irlanda, realizado por Meton et al. (2009) relataram que um dos genótipos presentes mais incidente no estudo foi o do HPV 6. Insinga, Dasbach, Elbasha (2007), nos Estados Unidos, encontraram uma prevalência de 3,2% do genótipo do HPV 6 em mulheres jovens Norte-Americanas, arroladas num estudo aleatório duplo cego e teste de Papanicolaou anormais, resultado menor do que o encontrado por este estudo.

No Brasil um estudo realizado por Bagarelli e Oliani (2004) encontrou uma prevalência de 6,4% do genótipo do HPV 6 em mulheres com LSIL. Lira (2010) relatou uma prevalência de 11% nas mulheres com citologia inflamatória considerada normal por não apresentarem lesões pré-malignas e malignas, na cidade de Manaus, estado do Amazonas. O HPV 6, segundo tipo viral mais encontrado neste estudo, apresenta OR baixa de 3,6, segundo Muñoz et al. (2006).

O HPV-6 e 11 são relatados na literatura como os genótipos mais prevalentes entre os de baixo risco (HARIRI et al., 2011), porém o tipo 11 não foi detectado neste estudo, o

que é surpreendente, pois se esperava encontrá-lo em casos de LSIL. Tal fato, talvez, deva-se ao número da amostra deste estudo ou pode ser que verdadeiramente não tenha este tipo de HPV nas mulheres estudadas ou, pelo fato do método usado nesta pesquisa para tipificação viral só possibilita detectar o HPV que tenha a maior carga viral no caso de uma co-infecção.

Ferreira (2007) estudando mulheres com LSIL atendidas na FCECON-AM verificou que o HPV 11 não esteve presente nas amostras estudadas usando a mesma metodologia utilizada por este estudo. Lira (2010) encontrou uma prevalência de 1,5% do HPV 11 nas amostras com citologia normal e inflamatória usando este mesmo método em mulheres atendidas pelo serviço de ginecologia da policlínica Castelo Branco situada na zona centro-sul de Manaus.

O HPV 16 pertencente ao gênero alfa espécie 9 de alto risco oncogênico, não foi o tipo mais frequente nas mulheres estudadas e foi encontrado em 1 caso (5%) das amostras positivas analisadas, diferente do relatado por outros autores: 17,9% (n=56) em mulheres com ASC-US e 29,3% (n=75) com LSIL na região Sudeste da Espanha (CANESA-ZAMORA et al., 2009), 19,3% em mulheres com LSIL no México (CANHE et al., 2010), 18% em mulheres chilenas com LSIL (JAIME LÓPEZ et al., 2010), 19% em mulheres com ASC-US e 20% com LSIL nas mulheres francesas (VAUCEL et al., 2011), 28,4% nas mulheres tchecas com LSIL (TACHEZY et al., 2011).

Para o Brasil, Freitas et al. (2007) relataram um positividade de 20% do DNA do HPV-16 para mulheres com LSIL, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Ainda no Brasil, uma revisão sistemática realizada por Ayres e Silva (2010) relatam uma prevalência de 9% do HPV-16 em mulheres com LSIL e 2% em mulheres com citologia normal. Outro estudo, realizado por Pitta et al. (2010), revelou uma prevalência de 40% em um estudo utilizando amostras de mulheres em Campinas. No Amazonas, Lira (2010), relatou que o tipo de HPV

mais frequente em mulheres com citologia normal e alterada foi o 16 (LSIL-57,4%, HSIL-66,7%, normal-90,9%).

Um artigo publicado por Muñoz et al (2006) relatam o alto risco que mulheres HPV-positivas, sem qualquer lesão citológica aparente, têm de desenvolver lesões do tipo LSIL e HSIL. Esse risco aumenta quando a infecção é causada pelo HPV-16 ou por tipos relacionados filogeneticamente a ele como o HPV 58. Esses autores observaram durante dois anos o desenvolvimento de lesões deste tipo após a detecção do HPV. Isso indica, que nem sempre é necessária uma infecção por tempo prolongado. Essas lesões podem se manifestar precocemente, inclusive em mulheres jovens (MUÑOZ et al., 2006). Neste estudo uma paciente teve evolução semelhante ao relatado anteriormente (citologia prévia em 2009 com LSIL e a atual em 2011 com HSIL) e constatado HPV-16 na PCR realizada logo após o segundo teste citológico.

Neste estudo, foi possível avaliar a situação de mulheres atendidas na rede pública de saúde, através do exame citopatológico e métodos sensíveis de biologia molecular, o que evidenciou uma considerável prevalência do HPV. Este quadro corrobora com as altas taxas de incidência do câncer cervical no Brasil e, principalmente na Região Norte, onde a incidência deste tipo de câncer ainda é maior do que a observada no restante do país apresentando uma estimativa de 23,65 a 35,13 por 100.000 mulheres para este ano de 2012 (BRASIL, 2011).

A presença do HPV de alto risco oncogênico, destaca a importância das ações específicas, voltadas para a prevenção da infecção por este vírus, como o uso de vacinas que ainda não estão disponíveis para a população na rede pública e no rastreamento da doença através do exame citológico nas mulheres da cidade de Manaus.

A retomada da discussão em relação à implementação da vacina anti-HPV na rede pública é importante, pois elas estão atualmente disponíveis somente nas clínicas particulares.

A distribuição dos tipos de HPV varia conforme a região, fato que deve ser considerado na confecção de uma vacina que leve em conta as diferenças regionais em relação aos genótipos mais frequentes.

Os resultados deste estudo reforçam a importância de medidas preventivas urgentes para o controle dessa infecção a fim de reduzir seu impacto sobre a população de mulheres vulneráveis ao câncer do colo uterino.

Este estudo ainda evidencia a grande importância do uso de técnicas mais sensíveis, como as técnicas de biologia molecular, aliada aos exames como o PCCU na prevenção do câncer do colo uterino.

7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste estudo, conclui-se que:

1. A prevalência de infecção pelo HPV foi de 28,6% na amostra estudada.
2. Houve alterações nos resultados entre a primeira e a segunda citologia; na primeira citologia encontrou-se 34 casos de ASC-US e 36 de LSIL. Na segunda citologia encontrou-se 8 casos normais (dentro do limite da normalidade), 33 casos de inflamação, 22 ASCUS e 6 LSIL e 1HSIL.
3. Considerando o resultado da segunda citologia, encontrou-se o DNA do HPV em 12,5% das mulheres com citologia normal, 18,2% com citologia inflamatória, 45,5% com ASC-US , 33,3% com LSIL e 100% de HSIL.
4. O tipo de HPV mais prevalente foi o HPV 58, estando presente em 25% das mulheres infectadas, seguido pelo HPV 6, presente em 20% das mulheres infectadas.
5. Os outros tipos de HPV identificados foram: HPV 6, 16, 61, 70, 83, 84 e 85.
6. A população estudada apresentou um perfil típico da epidemiologia da infecção pelo HPV, sendo constituída na sua maioria de mulheres jovens que tiveram o início de suas atividades sexuais precocemente.
7. Não foram encontradas associações estatisticamente significantes entre a infecção pelo HPV e os fatores socioeconômicos e clínicos analisados, com exceção das variáveis contraceptivos orais ($p= 0,034$) e aborto ($p= 0,032$).
8. A vacina anti-HPV bivalente não atenderia a necessidade desta amostra populacional, uma vez que o HPV 16 foi encontrado em baixa prevalência e o HPV 18 não foi encontrado.
9. Por sua vez, a vacina quadrivalente teria um maior impacto devido o HPV 6 ter sido encontrado em 20% das mulheres infectadas.

10. Considerando que o HPV 58 foi o mais prevalente, enfatizamos a necessidade de produção de uma vacina mais direcionada à diversidade genotípica regional.

REFERÊNCIAS

AKUTSU, N.; SHIRASAWA, H.; ASANO, T. et al. P53-dependent and independent transactivation by the E6 protein of human papillomavirus type 16. **Journal of General Virology**, v.77, p.459-463, 1996.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SHAFFER, A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997

ALVES, V.F.; LOGATO FILHO, A.; SCHMITT, F.C.L. Desempenho da citologia em amostras líquidas: revolução no teste de papanicolaou? **Femina**, São Paulo, v.31, n.5, p.393-96, jun.2003.

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

BAGARELLI, L.B.; OLIANI, A.H. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.26, n.1, p. 59-64, 2004.

BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR Detection of genital human papillomavirus. In: **Applicatons: viral pathogens**, p. 407-413, 1998

BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v.32, supl.1, p. S1-S6, 2005.

BETTINI, J.S.R.; SIMÕES, R.T.; RUIZ, A.C.G. et al. Absolute quantification of gene E7 in cervical samples of women infected by HPV using real time PCR. **Applied Cancer Research**, v.28, n.2, p.62-66, 2008.

BODILY, I.M.; METHA, K.P.; CRUZ, L.; MEYERS C.; LAIMINS, L.A. The E7 open reading frame acts in cis and to mediate differentiation-dependent activities in the human papillomavirus type 16 life cycle. **Journal of Virology**, v.85, n.17, p.8852-62, 2011.

BOUSARGHIN, L.; TOUZÉ, A.; SIZARET, P.Y. et al. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. **Journal of Virology**, v.77, n.6, p.3846-50, mar.2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos, 2003**. Disponível em: <<http://www.portalsbc.com.br/documentos/nomenclaturalaudos.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer-INCA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2011, 101p.

_____. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 07 set. 2010a.

_____. **Plano de ação para redução da incidência e mortalidade por câncer do colo do útero**: sumário executivo: programa nacional de controle do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2010b, 42p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p.124.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Controle das doenças sexualmente transmissíveis (DST)**: manual de bolso. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p.71-2.

_____. **Prevalências e frequências relativas de doenças sexualmente transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.p.138-39.

BRENNAN, S.M.; SYRJANEN, K.J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV): associated cervical carcinogenesis. **São Paulo Medical Journal**, v.121,p. 128-132,2003.

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

BURK, R.D; CHEN, Z.; DOORSLAER, R.V. Human Papillomaviruses:Genetic Basis of Carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v.12, p.281–290, 2009.

CAMARA, G.N.L.; CERQUEIRA, D.M.; OLIVEIRA, A.P.G. et al. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.879-83, jan.2003.

CANCHE, J.C.; ROSADO LÓPEZ, I.; SUÁREZ, N.G. et al. High prevalence and low E6 genetic variability of human papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursor lesions in Southeast Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p.144-148, mar.2010

CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papiloma vírus humanos. **Sábios, Revista de Saúde e Biologia**, v.2, n.1, p.29-31, 2007.

CARVALHO, J.P. Câncer do colo do útero: quadro clínico e diagnóstico. In: HALBE, H. W. **Tratado de Ginecologia**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2000.

CASTRO, M.M. **Deteção do Papilomavírus Humano-HPV em esfregaços endocervicais de mulheres que procuram serviços de ginecologia em Manaus**. Manaus: UFAM, 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal do Amazonas, 2002

CASTRO, M.M.; FARIAS, L.P.; BORBOREMA-SANTOS, C.M. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v. 10 n.1, p. 186-196, 2011

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Genital HPV infection**: CDC Fact Sheet. Centers for Disease Control and Prevention, 2004.

CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; KELLOKOSKI, J. et al. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.20,n.7, p.305-17, aug.1991.

CHUNG, S.; WIEDMEYER, K.; SHAI, A. et al. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. **Cancer Research**, v.68, n.23,p. 9928–9934, dez. 2008.

CIAPPONI, A.; BARDACH, A.; GLUJOVSKY, D. et al. Type-Specific HPV Prevalence in Cervical Cancer and High-Grade Lesions in Latin America and the Caribbean: Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE** | www.plosone.org,v.6,n. 10 , e25493, 2011

CONESA-ZAMORA, P.; ORTIZ-REINA, S.; MOYA-BIOSCA, J. et al. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. **BMC Infectious Diseases**, v.9, p.124, 2009.

CORRÊA, D.A.D.; VILLELA, W.V. O controle do câncer do colo do útero: desafios para implementação de ações programáticas no Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.8, n.4, p.491-97, out./dez.2008.

CORRÊA, G.J. **Prevalência do papilomavírus humano (hpv) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino**. UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

CUZICK, J.; SZAREWSKI, A.; CUBIE, H. et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. **Lancet**, v.362 n.9399, p.1871-1876, 2003.

de PAULA, F.D.F.; FERNANDES, A.P.; DO CARMO B.B.; VIEIRA, D.C.D.; DUTRA, M.S.; SANTOS, C.G.M.; SOUZA, M.C.M.; ANDRADE, T.C.A.; VAGO, A.R.; FERNANDES, P.A. Molecular Detection of *Chlamydia trachomatis* and HPV Infections in cervical samples With Normal and abnormal Cytopathological Finding. **Diagnostic Cytopatology**, v.35,n.4, p.198-202, 2007

de RODA HUSMAN, A.M.; WALBOOMERS,J.M.; VAN DEN BRULE,A.J. et al. The use of primers GP5 and GP6 elongated at by their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves Human Papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v.76, p.1057-1062, 1995

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v.324, p.17-27, 2004.

DINC, B.; ROTA, S.; ONAN, A. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with several cervical pathologies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.1, p.19-23, 2010.

DOOBAR, J. The Papillomavirus life cycle. **Journal of clinical Viriology**, v.32, p.7-15,2005.

DUARTE, D.V.; BRITO, E.B.; CANTO, A.S.S.; ISHIKAWA, E.A.Y.; PINHEIRO, J.G.; COSTA, J.H.G.; SOUSA, M.S. Frequencia e genotipagem do Papilomavírus humano em mulheres de comunidades ribeirinhas do município Abaetetuba Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazonica de Saúde**, v.1, n.3, p. 75-82, 2010.

DURSUN, P.; SENGER, S.S.; ARSLAN, H. et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. **BMC Infectious Diseases**, v.9, p.191, 2009.

ELEUTÉRIO JUNIOR, J.; CAVALCANTE, J.R.; SANTIAGO, R.O. et al. Citologia oncológica, colposcopia e histologia no diagnóstico de lesões epiteliais do colo uterino. **NewsLab**, ed. 63, 2004.

FEBRASGO. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. **Papilomavírus humano (HPV): diagnóstico e tratamento**. [Brasília]:AMB/CFM, 2002. 19p. Disponível em: < <http://www.febrasgo.org.br/arquivos/diretrizes/079.pdf>>. Acesso em: 09.06. 2011.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v.22, n.33, p.5201-7, aug.2003.

FERNANDES, J.V.; MEISSNER, R.V.; CARVALHO, M.G.F.; FERNANDES, T.A.A.M.; AZEVEDO, P.R.M.; SOBRINHO, J.S.; PRADO, J.C.M.; VILLA, L. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pré-malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Research Notes**, n.3,p.96, 2010.

FERNANDES, T.A.A.M.; MEISSNER, R.V.; BEZERRA, L.F. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.573-578, 2008.

FERREIRA, J.R.D. **Deteção da Infecção pelo HPV e do polimorfismo da protein p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas**. Manaus:UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

FIORINI, A.; FRANCINI.E.S.C. Principais técnicas moleculares para detecção do papillomavirus humano. **Sábios, Revista de Saúde e Biologia**, v.2,n.1, p.29-31, 2007.

FREITAS, T.P.; CARMO, B.B.; PAULA, F.D.F. et al. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.5, p.297-301, sep./oct., 2007

GAËLLE, A.V.B.; CAROLINE, A.J.H.; BERGHMANS, S. et al. Important role as biomarker human papillomavirus in cervical cancer screening: **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 2008;v.17,p.810-817. apr. 2008.

GALLOWAY, D.A. Human papillomaviruses: a growing field. **Genes & Development**,v.23, p.138-142, 2009.

GHOSH, S.K., CHOUDHURY, B.; MONDAL, R. et al. Human papillomavirus testing suspected cervical cancer patients from Southern Assam by fast-PCR. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.12, n.3, p.749-51,2011.

GIROGLOU, T.; FLORIN, L.; SCHAFER, F. et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **Journal of Virology**, v75, n.3, p.1565-1570, 2001.

GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL, L.; PLETT-TORRES, T.; MADRID-GONZÁLEZ, C.L. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. **Salud Pública de México**, v.51, suplemento 3, s479-488, 2009.

HALL, T.A. BioEdit: a User-friendly biological sequence alignment editor na analysis program for Windows 95/98. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v. 41, p.95-98, 1999.

HARIRI, S.; DUNNE, SARAYA, M. et al. **Chapter 5:human papillomavirus**. In: Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. 5. Ed. Atlanta: CDC, 2011

HERRERO, R.; HIDEISHEIM, A.; BRATTI, C. et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, p.464-474, 2000.

HORTA, A.L.A.H.; FONSECA, N.M. **Manual de padronização de laudos histopatológicos**. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores, 1999.

HUGHES, F.J.; ROMANOS, M.A. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.25, p.5817-5823, 1993.

IARC. **Capítulo 1: introdução a anatomia do colo uterino**. Disponível em:< <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=1>>. Acesso em: 20 maio 2012.

INSINGA, R.P.; DASBACH, E.J.; ELBASHA, E.H. Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women. **Infectious Agents and Cancer**, n.2, p.15, 2007

JAIME LÓPEZ, M.; CARMEN GLORIA, I.G.; PRISCILLA BREBI, M. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas de cuello uterino. **Revista Médica de Chile**, n.138, p.1343-1350, 2010.

JANICEK, M.F.; AVERETTE, H.E. Cervical câncer: prevention, diagnosisand therapeutics. **CA - Cancer Journal for Clinicians**, v.51, p. 92-114,2001.

JEON, S.; PAUL, F.; LAMBERT, P.F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.1654-1658, feb.1995.

KANESHIMA, E.N.; BIDOIA, C.C.G.; GABRIEL, M. et al. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, v.23, n.3, p.731-737, jun.2001.

KANESHIMA, E.N.; SUZUKI, L.E.; IRIE, M.M.T. et al. Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.35, n.1, p.29-33, 2003.

KERKAR, R.A.; KULKARNI, Y.V. Screening for cervical cancer: an overview. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**. v.56, n.2, p.115-122, March/April., 2006

KJAER, S.K.; CHACKERIAN, B.; VAN DEN BRULE, A. et al. High-Risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 2001;10:101-106

KOJIMA, A.; MAEDA, H.; SUGITA, Y. et al. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v.38, n.6, p.591-596, sep.2002.

LACE, M.J.; ANSON, J.R.; KLUSMANN, J.P. et.al. Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Genomes Integrated in Head and Neck Cancers and in HPV-16-Immortalized Human Keratinocyte Clones Express Chimeric Virus-Cell mRNAs Similar to Those Found in Cervical Cancers. **Journal of Virology**, v.85, n.4, p. 1645–1654, 2011.

LEE, C.; LAIMINS, L.A. The differentiation-dependent life cycle of human papillomaviruses in keratinocytes. In:GARCEA, R.L.; DIMAIO, D. **The papillomaviruses**. New York: Springer, 2007. p.45-67.

LETO, M.G.P.; SANTOS JÚNIOR, G.F.; PORRO, A.M. et.al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.2, p.306-17, 2011.

LINDEMANN, M.L.M.; CALVO, J.M.S.; de ANTONIO, J.C. et.al. Prevalence and Distribuição of High-Risk Genotypes of HPV in Women with severe Cervical Lesions in Madrid, Spain:Importence of Detection Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. **Advances in Preventive Medicine**, v.2011, 269468, 2011.

LIPPMAN, S.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; JONES, H.E. et al. Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women. **International Journal of STD & AIDS**, v.21, n.2, p.105-109, 2010

LIRA, E.E.; **Co-Infecção do Papilomavírus Humano e Chlamydia trachomatis em mulheres com citologia normal e alterada**: UFAM, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Amazonas, 2010

- LIRA NETO, J.B. **Citopatologia e histologia do colo uterino**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p. 15.
- LONGWORTH, M.S.; LAIMINS, L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.68, n.2, p.362-72, 2004.
- LÓPEZ M, J.; ILI G, C. G.; BREBI M, P. et al. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásica de cuello uterino. **Revista Médica do Chile**, n.138, p. 1343-1350, 2010.
- LOPES, F.; LATORRE, M.R.D.O.; PIGNATARE, A.C.C. et al. Prevalência de HIV, papilomavírus humano e sífilis na penitenciária feminina da capital, São Paulo, 1997-1998. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.6, p.1473-1480, 2001.
- LOUVANTO, K.; RINTALA, M.A.; KARI J SYRJÄNEN, K.J. et al. Incident cervical infections with high- and lowrisk human papillomavirus (HPV) infections among mothers in the prospective Finnish Family HPV Study. **BMC Infectious Diseases**, v.11, n.179, 2011 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/179>
- MANOS, M.N.; TING, Y.; WRIGHT, D.K. et al. Use of the polimerase chain reaction for the detection of genital human papillomaviruses. In: FURTH, M., editors. *Molecular diagnostics of human cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. p.209-214. (Cancer Cell Series, 7).
- MARTINS, M.C.L.; BÔER, C.G.; SVIDZINSKI, T.I.E. et al. Avaliação do método papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.3, p.217-221, 2007.
- MARTINS FILHO, P.R.S.; PIVA, M.R.; SANTOS, T.S. et al. Papiloma de células escamosas da cavidade oral. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v.9, n.3, jul./set.2009.
- MENDONÇA, M.L.; A. NETTO, J.C. Importância da infecção pelo papiloma vírus humano em pacientes do sexo masculino. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.17, n.4 p.236-310, 2005.
- MENTON, J.F.; CREMIN, S.M.; CANIER, L. Molecular epidemiology of sexually transmitted human papillomavirus in a self referred group of women in Ireland. **Virology Journal**, n.6:112, 2009.
- MONTEIRO, J.C. **Prevalência da infecção pelo papilomavírus humano (hpv) em mulheres investigadas para o câncer cervical, na cidade de Belém, Pará**. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, 2009. Dissertação (Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários). UFPA, 2009.
- MOODLY, C.A.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus oncoproteínas: pathways to tansfomation. **Nature Reviews Cancer**, V.10, n.8, p.550-60, 2010.

MOTTA, E.V.; FONSECA, A.M.; BAGNOLI, V.R. et al. Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, n.4, p.302-10, 2001.

MÜLLER, G.C.; MAZIERO, C. Alterações citológicas: uma revisão sobre a importância da Citologia Oncótica. **Unoesc & Ciências – ACBS**, Joaçaba. V1, n.2, p.87-94, jul./dez.,2010

MÜNGER, K.; BASILE, J.R.; DUENSING, S. et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v.20, n.54, p.7888-98, 2001.

MUÑOZ, N.; CASTELLAGUÉ, X.; GONZALEZ, A.B. et.al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**. V.24S3, p.S31-S310, 2006.

NASCIMENTO, E.M.; SPINELLI, M.O.; RODRIGUES, C.J. et al. Protocolo de extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.3, p.2253-2255, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n3/17004.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

NAUD, P.; MATOS, J.C.; HAMMES, L. et al. Infecção pelo papiloma vírus humano (HPV). **Revista HCPA**, v.20, n.2, p.138-142, 2000.

NOBILE, L.; TACLA, M. DST: HPV: parte I: considerações sobre o diagnóstico e a transmissão do vírus. **Breves de Saúde**, n.5, abr./maio 2005. Disponível em:<<http://www.brevesdesaude.com.br/ed05/HPV.htm>>. Acesso em: 02 fev.2011.

NORONHA, V.L.; NORONHA, R.; CARMONA, B. et al. Papiloma vírus humano (HPV) em mulheres com citologia oncótica dentro dos limites da normalidade. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.7, n.1, p.49-55, 2005.

NONNENACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L.L. et al. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.1, p.95-100, 2002.

NÚÑEZ-TROCONIS, J.; DELGADO, M.; GONZÁLEZ, J. et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area. **Investigación Clínica**, v.50, n.2, p.203-212, 2009.

OLIVEIRA, L.H.S.; ROSA, M.L.G.; PEREIRA, C.R.N. Human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.5, p.279-285, sep./oct., 2006.

PEREIRA, C.R.N.; ROSA, M.L.G.; VASCONCELOS, G.A.L.B.M. et al. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.17,p. 651–660, 2007.

PIÑA, P.; HERNANDEZ, D.; LOPEZ, R. et al. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.16, p.1041-1047, 2006.

PINOTTI, J.A.; RICCI, M.D. **Panorama do HPV no Brasil e no Mercosul, novembro de 2004**. Disponível em: <<http://www.hpvinfosite.com.br/hpv-19htm>> Acesso em: 21 maio 2010.

PIRAS, F.; PIGA, M.; DE MONTIS, A. et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Benin, West Africa. **Virology Journal**, n.8, p.514, 2011.

PITTA, D.R.; ELISABETE, A.C.; SARIAN, L.O.; et.al. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.32, n.7, p.315-20, 2010.

PIVA, M.R.; MARTINS FILHO, P.R.S.; SANTOS, T.S. et al. Detecção de HPV em lesões orais através da técnica de hibridização *in situ*. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-facial**, v.8, n.4, p.61-68, out./dez.2008.

PONTES, I.; ANGELO, P.; ASTOLFI-FILHO, S. **Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos**. Anais do 4º Encontro de Genética na Amazônia 1º Encontro de Genética da Região Norte; 2003, v.1, n.79. 4º Encontro de Genética na Amazônia 1º Encontro de Genética da Região Norte. Manaus, 2003.

QUEIROZ, A.M.A.; CANO, M.A.T.; ZAIA, J.E. O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas-MG. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n. 2, p.151-157, 2007.

RAMA, C.H.; ROTELI-MARTINS, C.M.; DERCHAIN, S.F.M. et al. Prevalência do PV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, v.42 n.1, p.123-30, 2008a.

_____. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Revista de Saúde Pública**, v.42, n.3, p.411-9, 2008b.

RAMOS, S.P. **HPV e o câncer de colo uterino**. Disponível em: <<http://www.gineco.com.br/hpvum.htm>> Acesso em: 13 mar. 2011.

RAPAPORT, D. Biologia do HPV. In ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M. et al. **HPV na prática clínica**. São Paulo: Ateneu, 2005. Cap. 2, p.7-23.

RIVERA, Z.R.; DELGADO D.J.; PAINEL, P. et al. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical / Infection mechanism and neoplastic transformation produced by human papilloma virus in cervical epithelium. **Revista Chilena de Obstetricia y Ginecologia**, v.71, n.2, p.135-140, 2006.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.V.E. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.2, p.179-84, 2001.

_____. Biologia molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.6,n. 4, p.447-451,2006.

ROSA, M.I.; MEDEIROS, L.R.; ROSA, D.D. et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical: [revisão]. **Cadernos de Saúde Pública**, v.25, n.5, p.953-964, maio 2009.

ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N.A. **Epidemiologia e saúde**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. p.570.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. USA, 1989

SAQUETE, P.R.; FILHO M.; PIVA, M.R. et.al. Papiloma de células escamosas da cavidade oral. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, Camaragibe, v.9, n.3, p. 69 - 78, jul./set. 2009.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.K. Natural history or anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v 31, p. 14-19,2003

SCHIFFMAN, M.; CASTLE,, P.E.; JERONIMO, J. et.al. Human papillomavirus and cervical câncer. **Lancet**, v.370, p.890-907,2007.

SCHNEIDER, M.L.; SCHNEIDER, V. Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 165p.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncology**, v.38, n.3, p.227-234, 2002.

SILVA, A.M.T.C.; AMARAL, M.V.T.; CRUZ, A.D. O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.29, nov./dez.2002. Disponível em; < <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/hpv.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

SILVEIRA, L.M.S.; SILVA, H.A.; PINHEIRO, V.M.F. et al. Anormalidades citológicas da cérvix de mulheres atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão. **NewsLab**, n. 81, p.130-140, 2007.

SIMONATO, L.E.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.43, n.2, p.121-127, abr.2007.

SOARES, M.B.O.; SILVA, S.R. Oncotic cytology results in a health center in the period of 2007-2008. **Revista Rene**, v.11, Número Especial, p.23-31, 2010.

SOARES, V.L.; MESQUITA, A.M.T.; CAVALCANTE, F.G. et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. **Tropical Medicine and International Health**, v.8 n.7, p. 595–603, 2003.

SOBRE câncer: exame preventivo do câncer do colo uterino. Disponível em:< <http://www.sobrecancer.com/40/cancer-colo-de-uterio/exame-preventivo-do-cancer-do-colo-uterino>> Acesso em: 20 maio 2012.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal: definições, critérios e notas explicativas**. 2.ed. São Paulo: Revinter, 2005.

SOTO-DE LEON, S.C.; CAMARGO, M.; SANCHEZ, R. et al. Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, p.93-102, 2009.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D.C. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.2, p.155-160, 2005.

SOUZA, T.R.B.; GONÇALVES, A. J. Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma espinocelular da cavidade oral. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v.38, n.1, p.62-66, jan./fev./mar.2009.

SUGERMAN, P.B.; SHILLITOE, E.J. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. **Oral Diseases**, v.3, n.3, p.130-147, 1997.

SUNDSTRÖM, K.; ELORANTA, S.; SPARÉN, P. et al. Prospective study of HPV types, HPV persistence and risk of squamous cell carcinoma of the cervix. **Cancer Epidemiology Biomarkers**, v.19, n.10, p.2469-2478. oct.2010.

TABORA, N.; BAKKERS, J.M,J.E.; QUINT, W.G.V. et al. Human Papilomavírus infection in Honduran women with normal cytology **Cancer Causes Control**, v.20, p.1663-1670, 2009.

TACHEZY, R.; SMAHELOVA, J.; SALAKOVA, M. et al. Human papillomavirus genotype distribution in czech women and men with diseases etiologically linked to HPV. **PLoS ONE**, v.6, n.7, p.e21913, jul.2011

TAKEHARA, K.; TODA, T.; NISHIMURA, T. et al. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in uterine cervical squamous lesions from japanese women. **Pathology Research International**, v.11, p.1-7, 2011.

TAMAYO, J.G.; MOLINA, J.; OLAETXEA, E.B. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical: una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. **Investigación Clínica**, v. 51, n.2, p. 193 - 208, 2010.

TANG, W.K. Oncogenic human papillomavirus infection: epidemiology in local high-risk women. **Hong Kong Dermatology and Venereology Bulletin**, v.10,n.4, p. 160-163, 2002.

TCHERNEV, G. Sexually transmitted papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, clinic, morphology, important differential diagnostic aspects, current diagnostic and treatment options. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.4, p.377-89, 2009.

TERAI, M.; TAKAGI, M. Human papillomavirus in the oral cavity. **Oral Medicine & Pathology**, v.6, p.1-12, 2001.

TOUZE, A.; de SANJOSE, S.; COURSAGET, P. et.al. Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31 and 58 viruslike particles in women in the general population and in prostitutes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.4344-4348, 2001.

TULIO, S.; PEREIRA, L.A.; NEVES, F.B. et al. Relação entre a carga viral de HPV oncogênico determinada pelo método de captura híbrida e o diagnóstico citológico de lesões de alto grau. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.1, p.31-35, fev.2007.

VALE, D.B.A.P.; MORAIS, S.S.; PIMENTA, A.L. et.al. Avaliação do rastreamento do câncer do colo do útero na estratégia saúde da família no Município de Amparo, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.26, n.2, p.383-90, fev.2010.

VAUCEL, E.; COSTE-BUREL, M.; LABOISSE, C. et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical samples collected in routine clinical practice at the Nantes University Hospital, France. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, n.284, p.989-998, 2011.

VIEIRA, Sonia. **Bioestatística: tópicos avançados: agora com mais de 150 exemplos e exercícios para as áreas de saúde**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

VILLA, L.L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advanced Cancer Research**, v.71, p.321-341, 1997.

VILLA, L.L.; COSTA, R.L.; PETTA, C.A. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncology**, v.6, n.5, p.271-278, 2005.

WAWER, M.J.; TOBIAN.A.A.R; KIGOZI,G;KONG,X. et al. Male circumcision reduces human papillomavirus transmission to HIV-negative female partners: a randomized trial in Rakai, Uganda. **Lancet**. v. 15,n.377, p. 209–218, 2011.

WHITE, A.E.; LIVONOS, E.M.; TLSTY, T.D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by HPV oncoproteins. **Genes & Development**, n.8, p.666-667,1994.

WHO. World Health Organization. **Human papillomavirus**. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index3.html. Acesso em: 02 maio 2011.

WOLSCHICK, N.M.;CONSOLARO, M.E.L.; SUZUKI, L.E. et.al. Cancer do colo do útero:tecnologias emergentes no diagnostico, tratamento e prevenção da doença. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.2, p. 123-129,2007.

WYANT, P.S. **Caracterização molecular dos HPVs de alto risco dos genótipos-53, -56 e -66 infectando mulheres no Distrito Federal e entorno**. Universidade de Brasília, 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular.

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

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.9, may.2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

<p>Deteção molecular e genotipagem de papilomavirus humano (HPV) em mulheres com citologia positiva para lesões de baixo grau e células atípicas de significado indeterminado.</p>
<p>Termo de Consentimento Livre Esclarecido</p>
<p>Você está sendo convidada a participar do projeto “Deteção molecular e genotipagem de papilomavirus humano (HPV) em mulheres com citologia positiva para lesões de baixo grau e células atípicas de significado indeterminado”. O objetivo deste estudo é verificar a presença do HPV, microorganismo responsável pelo câncer do colo do útero que quando diagnosticado e tratado precocemente evita a evolução para o câncer nas pacientes com essas alterações citológicas quando o HPV está presente. Para isso serão coletadas amostras do colo do útero e vagina para serem analisadas nos Laboratórios da FUAM. Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto será o momento da introdução do espéculo para a coleta da amostra que será feita com espátula e escova apropriadas. O material biológico coletado (amostra cervical) será armazenada e posteriormente utilizada para os testes laboratoriais a que se propõem este estudo. Os resultados obtidos a partir deste estudo deverão ser publicados em revista científica especializada, além e serem divulgados em congresso científico de abrangência nacional e/ou internacional. Serão feitas algumas perguntas sobre dados pessoais e sobre sua saúde (haverá questionário). Você poderá recusar-se a responder algumas delas e todas as informações obtidas serão sigilosas. Em momento nenhum sua identidade será revelada.</p> <p>Sua participação nesse estudo é voluntária e caso não queira participar, continuará a receber o tratamento atual ou futuro neste serviço. Não receberá pagamento para sua participação no estudo e nem vale transporte para o seu deslocamento até a FUAM. Poderá ser contatada pelo telefone ou por carta caso haja necessidade de mais coletas ou para comunicação de algum resultado.</p> <p>Se tiver alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, poderá contatar Dra. Francisca Andrade de Queiroz no tel: (092)99970674 e 3212-8300 no Lab. de Citologia da FUAM de 8:00h às 11:00h pela manhã e de 14: às 17:00h no horário da tarde às segundas, terças, quartas e sextas-feiras.</p> <p>Uma vez que li e entendi o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, VOLUNTARIAMENTE concordo em fazer parte neste estudo, e assino abaixo: _____, _____ de _____ de 20__.</p> <p>Assinatura:-----</p> <p>DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR</p> <p>Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para responder as perguntas e respondi em sua totalidade. O indivíduo compreendeu minha explicação e aceitou assinar este consentimento.</p> <p>_____, _____ de _____ de 20__</p> <p>Assinatura do investigador local: _____</p>

APÊNDICE B – Questionário de Detecção molecular e genotipagem de papilomavirus humano (HPV) em mulheres com citologia positiva para LSIL e ASC-US

Pront. n°

QUESTIONÁRIO IDENTIFICAÇÃO

1. Citologia anterior: 2. Data: ____/____/____ 3. Resultado: _____
 4. Nome: _____

 5. Idade: _____ 6. Data de nascimento: ____/____/____
 7. Naturalidade: _____ 8. Telefones: _____
 9. Endereço: _____

ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS

10. Qual é o seu grau de escolaridade?
 1. Ensino fundamental incompleto () 2. Ensino fundamental completo ()
 3. Ensino médio completo () 4. Ensino superior incompleto ()
 5. Pós-graduação (especialização, mestrado ou doutorado) completo ()
 6. Não alfabetizado 7. Ensino superior completo
11. A senhora trabalha?
 1. Sim ()
 2. Não ()
12. Se sim, qual é a sua profissão? _____
13. Qual a renda total da sua família?
 1. Menos de um salário mínimo () 2. Um salário mínimo ()
 3. Dois salários mínimos () 4. Três salários mínimos ()
 5. Quatro salários mínimos () 6. Acima de cinco salários mínimos ()

ASPECTOS DE HISTÓRIA CLÍNICA/DST

14. Qual é o seu estado civil?
 1. Solteira ()
 2. Casada/união estável ()
 3. Divorciada/Separada
 4. Viúva
15. A senhora está grávida atualmente?
 1. Sim ()
 2. Não ()
16. Quantas gestações a senhora já teve? _____
17. Dessas gestações, quantos filhos a senhora teve? _____
18. Quantos nasceram vivos?-----
19. A senhora já sofreu abortos:
 1. Sim ()
 2. Não ()
20. Se já, quantos foram espontâneos? _____
21. Se já, quantos foram provocados? _____
22. A senhora lembra qual era sua idade quando a senhora teve sua primeira relação sexual?
 1. Sim ()
 2. Não ()
23. Se sim, qual era? _____
24. A senhora lembra qual era sua idade quando a senhora teve sua primeira gestação?
 1. Sim ()
 2. Não ()
25. Se sim, qual era? _____

26. Com quantos parceiros **FIXOS** a senhora tem se relacionado sexualmente nos últimos 12 meses?
27. Com que frequência a senhora usa(va) preservativo com este(s) parceiro(s) fixo(s)?
1. Sempre ()
 2. Nem sempre ()
 3. Raramente ()
 4. Nunca ()
28. Se não usa(va), qual é o motivo? _____
29. Com quantos parceiros **EVENTUAIS** a senhora tem se relacionado sexualmente nos últimos 12 meses?
30. Com que frequência a senhora usa (va) preservativo com este(s) parceiro(s) eventuais(s)?
1. Sempre ()
 2. Nem sempre ()
 3. Raramente ()
 4. Nunca ()
31. Se não usa(va), qual é o motivo? _____
32. Quantos parceiros sexuais a senhora já teve ao longo da sua vida?
1. 1 a 5 ()
 2. 5 a 10 ()
 3. Acima de 10 ()
33. A senhora já realizou o exame preventivo alguma vez? Teste para detecção do HPV e câncer do colo uterino?
1. Sim ()
 2. Não ()
34. Se sim, qual foi o motivo? _____
35. Se não, qual foi o motivo? _____
36. A senhora sabe dizer o resultado?(caso tenha respondido sim na questão 34)
1. Sim ()
 2. Não ()
37. Se sim qual foi o resultado?
1. Dentro do Limite da Normalidade ()
 2. Inflamação ()
 3. ASC-US- cel.e sc.() em cél.end.()
 4. LSIL ()
 5. HSIL ()
 6. HSIL não podendo excluir micro-invasão()
 7. Carcinoma invasor ()
38. A senhora teve alguma doença sexualmente transmissível?
1. Sim ()
 2. Não ()
39. Se sim, qual é esta doença?
1. Verrugas (doenças relacionadas com HPV) ()
 2. Corrimento ()
 3. Ferida ()
 4. HIV
 5. Citomegalovírus ()
 6. Sífilis ()
 7. Hepatite B ()
 8. Outra () Especificar: _____
40. A senhora se relaciona ou se relacionou sexualmente nos últimos 12 meses com um parceiro (fixo ou eventual) que você sabia ser portador de alguma dessas doenças?
1. Sim ()
 2. Não ()
41. Se sim, qual era a doença?
1. Verrugas (doenças relacionadas com HPV) ()
 2. Corrimento ()
 3. Ferida ()
 4. HIV
 5. Citomegalovírus ()
 6. Sífilis ()
 7. Hepatite B ()
 8. Outra () Especificar: _____
42. A senhora já se vacinou contra o papiloma vírus humano (HPV)?
1. Sim ()
 2. Não ()
43. A senhora usa algum método anticoncepcional (exceto camisinha)?
1. Sim ()
 2. Não ()
1. Pílula (anticoncepcional oral) ()
 2. Anticoncepcional injetável ()
 3. Adesivo anticoncepcional ()
 4. Dispositivo intra-uterino (DIU) ()
 5. Diafragma ()
 6. Camisinha feminina ()
 7. Tabela ()
 8. Coito interrompido ()
 9. Outro () Especificar: _____
44. Qual o motivo de sua consulta hoje?
1. Consulta de rotina para realização de preventivo ()
 2. Apresentação de queixas clínicas ()
 3. Outro () Especificar: _____
45. Se estiver apresentando queixas clínicas, quais são?
1. Úlceras genitais ()
 2. Dificuldade de urinar ()
 3. Corrimento vaginal ()
 4. Coceira ()
 5. Dor pélvica ()
 6. Outras () Especificar: _____
46. A senhora fez uso de algum medicamento sistêmico nos últimos 3 meses?
1. Sim ()
 2. Não ()
47. Se sim, qual foi o tipo?

1. Antibiótico () 2. Antifúngico ()
3. Antiinflamatório () 4. Analgésico ()
5. Outro () Especificar: _____

48. Qual foi a data da sua última menstruação? _____/_____/_____

Resultado da citologia atual:

1. Dentro do Limite da Normalidade () 2. Inflamação ()
3. ASC-US () 4. LSIL ()
5. HSIL () 6. HSIL não podendo excluir micro-invasão
7. Carcinoma invasor ()

Resultado da PCR: _____

Resultado da Genotipagem: _____

Em _____/_____/_____

APÊNDICE C – Equipe Científica

Nome	Formação	Título	Órgão	Função
Cristina Maria Borborema dos Santos	Farmacêutica Bioquímica	Doutora	UFAM	Orientadora
Adele Schwartz Benzaken	Médica Ginecologista	Doutora	FUAM	Co-orientadora
Daniel Lucio Rodrigues Dutra	Biólogo	Mestre	FUAM	Colaborador
Francisca Andrade de Queiroz	Farmacêutica Bioquímica		FUAM	Pesquisadora
Soledad Couto V. Borborema	Médica	Médica Ginecologista	FUAM	Colaboradora
Dnielle Albuquerque Pires Rocha	Odontóloga	Mestre	UFAM	Colaboradora

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

	<p>Governo do Estado do Amazonas Secretaria de Estado da Saúde FUNDAÇÃO "ALFREDO DA MATTA" COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p>	 AMAZONAS
---	--	--

Manaus, 25 de novembro de 2010

CARTA Nº. 052/10 – CEP/FUAM

A: Pesquisadora
FRANCISCA ANDRADE DE QUEIROZ

Assunto: Encaminhamento de PARECER CONSUBSTANCIADO Nº.036/2010 – CEP/FUAM

Prezada Pesquisadora:

Informamos a Vossa Senhoria que o Projeto: "DETECÇÃO MOLECULAR E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES COM CITOLOGIA POSITIVA PARA LESÃO DE BAIXO GRAU E CÉLULAS ATÍPICAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO", de sua responsabilidade, foi APROVADO, conforme o Parecer nº. 0036/2010 – CEP/FUAM, devendo comparecer ao Departamento de Ensino e Pesquisa para operacionalização do projeto.

Respeitosamente,


ROSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Requisição de exame citopatológico – colo do útero (frente)

MINISTÉRIO DA SAÚDE **REQUISIÇÃO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO - COLO DO ÚTERO**
 Viva Mulher - Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama

UF: _____ ONS de Unidade de Saúde: _____
 Unidade de Saúde: _____
 Município: _____ Prioritário: _____

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Cartão SUS: _____
 Nome Completo da Mulher: _____
 Nome Completo da Mãe: _____
 Idade: _____ Data de Nascimento: _____ Sexo: Masculino Feminino Estado Civil: Solteiro Casado Viúva Divorciado Outro: _____
 Data de Referência: _____ Local de Referência: _____
 Nome: _____ Complemento: _____
 Endereço: _____ Município: _____ Estado: _____ UF: _____
 CEP: _____ Ponto de Referência: _____

ESCOLARIDADE: Analfabeta Básica Fundamental Incompleta Básica Fundamental Completa Básica Média Completa Ensino Superior Completo

RESULTADO DO EXAME CITOMOLÓGICO DE ENCAMINHAMENTO

<p>CÉLULAS ATÍPICAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO</p> <p>Suspeitas: <input type="checkbox"/> Passa novamente no esfregaço <input type="checkbox"/> Não se pode fazer o teste de citologia</p> <p>Duvidosas: <input type="checkbox"/> Passa novamente no esfregaço <input type="checkbox"/> Não se pode fazer o teste de citologia</p> <p>De difícil interpretação: <input type="checkbox"/> Passa novamente no esfregaço <input type="checkbox"/> Não se pode fazer o teste de citologia</p>	<p>ATÍPICAS EM CÉLULAS ESCAROSAS</p> <p><input type="checkbox"/> Lesão intra-epitelial de baixo grau (comprometendo a lâmina própria pelo HPV e no plano intra-epitelial cervical) (L1)</p> <p><input type="checkbox"/> Lesão intra-epitelial de alto grau (comprometendo no plano intra-epitelial o terço inferior) (L2 e L3)</p> <p><input type="checkbox"/> Lesão intra-epitelial de alto grau, não pode interpretar o nível de lesão</p> <p><input type="checkbox"/> Carcinoma em estágio inicial</p> <p>ATÍPICAS EM CÉLULAS GLANDULARES</p> <p><input type="checkbox"/> Adenocarcinoma "in situ"</p> <p>Adenocarcinoma invasor: <input type="checkbox"/> Cervical <input type="checkbox"/> Endocervical <input type="checkbox"/> Sem outra especificação</p> <p><input type="checkbox"/> Outros diagnósticos citopatológicos. Qual(s): _____</p>
---	---

INFORMAÇÕES DA COLPOSCOPIA DO COLO DO ÚTERO

<p>1. COLPOSCOPIA</p> <p><input type="checkbox"/> NORMAL</p> <p><input type="checkbox"/> ANORMAL <input type="checkbox"/> Suspeito de NIC</p> <p><input type="checkbox"/> INSUFICIENTE <input type="checkbox"/> Suspeito de lesão</p>	<p>2. PROCEDIMENTOS</p> <p><input type="checkbox"/> Biópsia a frio</p> <p><input type="checkbox"/> Conização endocervical</p> <p><input type="checkbox"/> CAP <input type="checkbox"/> Sistema de gestão de saúde transmissível</p> <p><input type="checkbox"/> Retiro de lesão</p> <p><input type="checkbox"/> Biópsia</p>
--	--

Informações adicionais para o patologista: _____


Data do exame: _____ Médico responsável: _____

*Observar de 2011

ANEXO 2 -Requisição de exame citopatológico – colo do útero (verso)

IDENTIFICAÇÃO DO LABORATÓRIO	
OPJ do Laboratório	Número da Caixa
Nome do Laboratório	Realizado em:
RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO - COLO DO ÚTERO	
Tipo de procedimento cirúrgico	
<input type="checkbox"/> Bópio <input type="checkbox"/> Conização <input type="checkbox"/> Histerectomia Simples <input type="checkbox"/> Histerectomia <input type="checkbox"/> Outros	
MICROSCÓPIA	
Tipo de material recebido:	
<input type="checkbox"/> Bópio, número de fragmentos: _____	
<input type="checkbox"/> Papcolótico, tamanho do tumor: _____ cm	
<input type="checkbox"/> Diagnóstico de margem em colposcopia: _____	
<input type="checkbox"/> Avaliação de tumor: <input type="checkbox"/> Endocervix <input type="checkbox"/> Ectocervix <input type="checkbox"/> Anjo ecto-endocervix	
MICROSCÓPIA	
Lesões de caráter benigno:	
<input type="checkbox"/> Metaplasia Squamosa <input type="checkbox"/> Cervicitis crônica benigna	
<input type="checkbox"/> Pólipo Endocervical <input type="checkbox"/> Alterações citológicas compatíveis com HPV	
Lesões de caráter neoplásico ou pré-neoplásico:	
<input type="checkbox"/> NIC I (displasia leve)	
<input type="checkbox"/> NIC II (displasia moderada)	
<input type="checkbox"/> NIC III (displasia severa / carcinoma in situ)	
<input type="checkbox"/> Carcinoma epidermóide invasivo	
<input type="checkbox"/> Carcinoma epidermóide in situ	
<input type="checkbox"/> Carcinoma glandular (impossível avaliar grau de invasão de tecido)	
<input type="checkbox"/> Carcinoma sarcoma	
<input type="checkbox"/> Carcinoma epidermóide-ovariárico	
<input type="checkbox"/> Adenocarcinoma in situ	
<input type="checkbox"/> Metastase melanocítica	
<input type="checkbox"/> Metastase carcinoma de glândula	
<input type="checkbox"/> Outros neoplasias malignas	
Grau de diferenciação	
<input type="checkbox"/> Não neoplásico <input type="checkbox"/> Bem diferenciado (Grau I) <input type="checkbox"/> Moderadamente diferenciado (Grau II)	
<input type="checkbox"/> Pouco diferenciado (Grau III) <input type="checkbox"/> Indiferenciado (Grau IV)	
Dados em relação à extensão do tumor:	
Infiltração:	
Profundidade de invasão: _____ mm	
Vasos: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Útero uterino: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Peri-vascular: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Vagina: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Parametrial: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Linfáticos regionais: _____ comprometidos e _____ não comprometidos	
Margem cirúrgica	
<input type="checkbox"/> Livre <input type="checkbox"/> Comprometida <input type="checkbox"/> Impossível de serem avaliadas	
Diagnóstico Descritivo: _____	
Critério de representação histológica: <input type="checkbox"/> Fragmentos <input type="checkbox"/> Slides	
<input type="checkbox"/> Material insuficiente para: _____	
Data da liberação do resultado: _____ / _____ / _____	
Médico responsável pelo resultado: _____ CRM: _____ OPF (OP): _____	

ANEXO 3 - POP da citologia 131

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Elaborado:	Rev.: 00	N°: 0131
		Aprovado:	Data: 27/10/2009	Fl(s): 1/1
SETOR: Histopatologia	PROCESSO: Conjunto para Coloração de Papanicolau	ATIVIDADE: Conjunto de Corantes para Coloração Citológica		

MATERIAL NECESSÁRIO:

1. Lâminas
2. Cubas de coloração

ITEM	DESCRIÇÃO	FOTOS / DESENHOS																																																															
	<p>INFORMAÇÕES TÉCNICAS PRINCÍPIO</p> <p>Coloração utilizada para a pesquisa de células cancerosas do útero (por coleta cérvico vaginal) dos brônquios pelo exame do escarro. Em caso de derrame pleural, do pericárdio e do peritônio, permite a pesquisa de células cancerosas e de metástase. Pode ser utilizado na citologia hormonal, na pesquisa da cromatina sexual (esfregaço de mucosa oral). Permite o diagnóstico de diversos agentes etiológicos, tanto nos esfregaços vaginais quanto no escarro.</p> <p>A Hematoxilina de Harris é um corante nuclear, que atua em meio aquoso, por isso requer hidratação previa dos esfregaços em concentrações alcoólicas decrescente. A coloração citoplasmática é feita pelo Orange G6 e EA-36, que são precedidos por uma desidratação em concentração alcoólica crescente. Por último, os esfregaços são lavados e clarificados com álcool a 96% e xilol. A transparência conferida ao citoplasma permite a observação de esfregaços celulares grossos.</p> <p>TÉCNICA DE COLORAÇÃO</p> <p>Imergir as lâminas nas cubas de coloração contendo as soluções na seqüência abaixo discriminada, respeitando o tempo determinado.</p>																																																																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>CUBA Nº</th> <th>REATIVO</th> <th>TEMPO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>Etanol a 80%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>2</td><td>Etanol a 70%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>3</td><td>Etanol a 50%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>4</td><td>Água destilada</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>5</td><td>HEMATOXILINA DE HARRIS</td><td>45 segundos</td></tr> <tr><td>6</td><td>Água corrente</td><td>10 minutos</td></tr> <tr><td>7</td><td>Etanol a 50%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>8</td><td>Etanol a 70%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>9</td><td>Etanol a 80%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>10</td><td>Etanol a 96%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>11</td><td>ORANGE G6</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>12</td><td>Etanol a 96%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>13</td><td>Etanol a 96%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>14</td><td>EA-36</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>15</td><td>Etanol a 96%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>16</td><td>Etanol a 96%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>17</td><td>Etanol a 96%</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>18</td><td>Xilol</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>19</td><td>Xilol</td><td>2 minutos</td></tr> <tr><td>20</td><td>Montagem com Bálsamo do Canadá</td><td></td></tr> </tbody> </table>	CUBA Nº	REATIVO	TEMPO	1	Etanol a 80%	2 minutos	2	Etanol a 70%	2 minutos	3	Etanol a 50%	2 minutos	4	Água destilada	2 minutos	5	HEMATOXILINA DE HARRIS	45 segundos	6	Água corrente	10 minutos	7	Etanol a 50%	2 minutos	8	Etanol a 70%	2 minutos	9	Etanol a 80%	2 minutos	10	Etanol a 96%	2 minutos	11	ORANGE G6	2 minutos	12	Etanol a 96%	2 minutos	13	Etanol a 96%	2 minutos	14	EA-36	2 minutos	15	Etanol a 96%	2 minutos	16	Etanol a 96%	2 minutos	17	Etanol a 96%	2 minutos	18	Xilol	2 minutos	19	Xilol	2 minutos	20	Montagem com Bálsamo do Canadá		
CUBA Nº	REATIVO	TEMPO																																																															
1	Etanol a 80%	2 minutos																																																															
2	Etanol a 70%	2 minutos																																																															
3	Etanol a 50%	2 minutos																																																															
4	Água destilada	2 minutos																																																															
5	HEMATOXILINA DE HARRIS	45 segundos																																																															
6	Água corrente	10 minutos																																																															
7	Etanol a 50%	2 minutos																																																															
8	Etanol a 70%	2 minutos																																																															
9	Etanol a 80%	2 minutos																																																															
10	Etanol a 96%	2 minutos																																																															
11	ORANGE G6	2 minutos																																																															
12	Etanol a 96%	2 minutos																																																															
13	Etanol a 96%	2 minutos																																																															
14	EA-36	2 minutos																																																															
15	Etanol a 96%	2 minutos																																																															
16	Etanol a 96%	2 minutos																																																															
17	Etanol a 96%	2 minutos																																																															
18	Xilol	2 minutos																																																															
19	Xilol	2 minutos																																																															
20	Montagem com Bálsamo do Canadá																																																																

ANEXO 3 -POP da citologia 131

OBSERVAÇÃO:

- A fase de hidratação é gradativa, que é a preparação da célula para o corante nuclear que é a HEMATOXILINA, que é uma solução aquosa.
- Na coloração do citoplasma ocorre uma desidratação, porque os corantes citoplasmáticos são alcoólicos.
- O orange tem a afinidade por ceratina e vai corar as células ceratinizadas, corando-as de rosa a alaranjada brilhante, o nucléolo também é corado pelo orange, corando-se de rosa a vermelho.
- O Xilol tem como função desidratar e clarificar.

- Os tempos dos corantes podem ser ajustados conforme a preferência tintorial de cada profissional.
- Deve-se eliminar o excesso das soluções quando se passa de uma cuba para outra, menos na passagem da Hematoxilina para a água corrente que deve ser imediata.
- Os corantes devem ser renovados regularmente.
- Os corantes devem ser filtrados antes do uso e regularmente.
- As soluções alcoólicas devem ser renovadas regularmente porque evaporam e turvam facilmente.
- Tempo maior no Xilo pode alterar a coloração dos nucléolos.
- Seguindo os princípios técnicos de Masson, as passagens pelo álcool podem ser feitas diretamente pelo álcool absoluto, para hidratação e desidratação dos esfregaços. Assim, eliminam-se as passagens pelos álcoois de concentração mais baixa, o que torna a coloração mais rápida.

CONDIÇÕES ADEQUADAS PARA ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE O PRODUTO

Conservar este produto entre 15 e 30°C.
Válido por 02 anos após a fabricação.
Nunca utilize produtos com prazo de validade expirado.

CUIDADOS COM A AMOSTRA

Por tratar-se de amostra biológica, manuseá-la de acordo com as normas de biossegurança, utilizando equipamentos de proteção individual (luvas, avental e máscara).

ANEXO 4 - Protocolo de Extração de DNA - Método FENOL;CLOROFORMIO (Sambrook et al., 1989)

1. Adicionar 400 μ L de Fenol hidratado a 400 μ L da amostra que foi previamente digerida com proteinase K;
2. Homogeneizar suavemente por 10 min. Seguidos de 10min. De centrifugação a 12000rpm;
3. Coletar o sobrenadante e adicionar 400 μ L de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1);
4. Homogeneizar essa mistura por 10min. E a seguir centrifugar a 12000rpm por 10 min.;
5. Coletar o sobrenadante e adicionar 400 μ L de Clorofórmio hidratado 1:1
6. Agitar por 10min. E centrifugar a 12000rpm.
7. Coletar o sobrenadante e adicionar 1/10 (10%) do volume do sobrenadante de NaCl3M e 1000 μ L de Etanol Absoluto gelado;
8. Deixar precipitar a -20°C por 12 horas;

NO DIA SEGUINTE

9. No dia seguinte pegar o material precipitado e centrifugar a 10000rpm por 30 min.
10. Descartar o sobrenadante cuidadosamente e lavar o sedimento de DNA (pellet) com 500 μ L de Etanol a 70% gelado;
11. Centrifugar a 8000rpm por 10min. E em seguida descartar o sobrenadante cuidadosamente;
12. Secar os sedimento por aproximadamente 40min. No fluxo laminar;
13. Ressuspender o sedimento de DNA com 50 μ L de Água Milli-Q

ANEXO 5 - Protocolo para a precipitação do DNA com Isopropanol/Etanol – (Applied Biosystems)

1. Foram adicionados 80 μ L de Isopropanol 75% em cada poço de uma placa constituída de 96 poços (com reação de seqüenciamento de 20 μ L);
2. A placa deve ser selado e deixada a temperatura ambiente por 15 min.;
3. Em seguida a placa foi centrifugada durante 30min. A 4000rpm em centrífuga refrigerada.
4. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente;
5. Foi aplicado um pulso da centrifuga com a placa invertida em papel absorvente;
6. Foram adicionados 200 μ L de Etanol a 70% em cada amostra e a placa foi selada novamente;
7. Cetrifugou-se durante 10min. a 4000rpm em centrífuga refrigerada;
8. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente;
9. O passoa de 6 a 8 foram repetidos;
10. A placa foi acondicionada em termociclador a 60°C durante 5 a 8 min. para que o *apilet* secasse;
11. Em seguida as amostras foram preparadas para o seqüenciador.

ANEXO 6 - Protocolo para o preparo das amostras para o seqüenciador

1. Foram adicionados 10 μ L de Formamida Hi-Di em cada amostra;
2. A placa foi selada e vortexada, em seguida, aplicou-se um pulso na centrífuga;
3. As amostras foram desnaturadas em termociclador durante 2min.;
4. Em seguida a placa foi imediatamente colocada no gelo durante 2 min.;
5. Foi aplicado m pulso na centrífuga para a remoção de bolhas de ar;
6. O adesivo foi removido e a septa foi colocado na placa;
7. Em seguida, a placa com a bandeja e a tampa adaptadora foram colocadas no “autosampler”;
8. As amostras com formamida foram corridas antes de completar 48 h para prevenir a degradação da fluorescência e da própria formamida.