

KARLA LOPES MANDU DE CAMPOS

**EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE COLETA CLÍNICA E
AUTOCOLETA, DE CÉLULAS CERVICAIS E VAGINAIS, PARA
DETECÇÃO DO DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

CAMPO GRANDE
2013

KARLA LOPES MANDU DE CAMPOS

**EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS DE COLETA CLÍNICA E
AUTOCOLETA, DE CÉLULAS CERVICAIS E VAGINAIS, PARA
DETECÇÃO DO DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr. Inês Tozetti

CAMPO GRANDE
2013

Aos meus pais por me indicarem os bons caminhos,
essa vitória também é de vocês;
Ao meu esposo por estar ao meu lado nessa conquista,
seu apoio foi essencial.

O fim das coisas é melhor que o seu início, e o paciente é melhor que o orgulhoso.

Não diga: "Por que os dias do passado foram melhores que os de hoje?" Pois não é sábio fazer esse tipo de pergunta.

A sabedoria, como uma herança, é coisa boa, e beneficia aqueles que veem o sol.

A sabedoria oferece defesa, como o faz o dinheiro, mas a excelência do conhecimento é esta: a sabedoria preserva a vida de quem a possui.

Quando os dias forem bons, aproveite-os bem; mas, quando forem ruins, considere: Deus fez tanto um quanto o outro, para evitar que o homem descubra alguma coisa sobre o seu futuro.

Nesta vida sem sentido eu já vi de tudo: Um justo que morreu apesar da sua justiça, e um ímpio que teve vida longa apesar da sua impiedade.

Não seja excessivamente justo nem demasiadamente sábio; por que destruir a você mesmo?

Não seja demasiadamente ímpio e não seja tolo; por que morrer antes do tempo?

É bom reter uma coisa e não abrir mão da outra, pois quem teme a Deus evitará ambos os extremos.

A realidade está bem distante e é muito profunda; quem pode descobri-la?

Por isso dediquei-me a aprender, a investigar, a buscar a sabedoria e a razão de ser das coisas, para compreender a insensatez da impiedade e a loucura da insensatez.

Assim, cheguei a esta conclusão: Deus fez os homens justos, mas eles buscaram muitas intrigas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, essa oportunidade Tu colocaste na minha vida.

À minha orientadora Inês Aparecida Tozetti, que faz jus ao ofício de orientar, ensinar e transferir o conhecimento com tanta dedicação, obrigada por confiar na capacidade dos seus alunos e dar o exemplo de lecionar.

Aos meus pais (Ruth e Luiz Carlos), minha gratidão e admiração serão eterna, obrigada pelo “sim”, pelo “não”, a confiança, o apoio, o amor, isso tudo fez parte do meu crescimento pessoal e levarei por toda minha vida.

Ao meu esposo (Eduardo), essencialmente presente todos os dias, nossa união é minha inspiração e meu ânimo de conquistar nossos objetivos.

Às professoras: Alda Maria Teixeira Ferreira e Cacilda Tezelli Junqueira Padovani, pela contribuição e parceria nesta jornada, que bom foi tê-las por perto.

Ao professor Carlos Eurico dos Santos Fernandes pela ajuda na análise estatística.

Às colegas Ana Paula Machado, Ana Paula Machado de Almeida e Flávia Gatto de Almeida, que com muito carinho agradeço, foi ótimo trabalharmos juntas.

Aos alunos de iniciação por participarem comigo neste trabalho, Camila Bonin, Larissa Zatorre, Leandro Ávila, Simone Domingues de Sales e Thiago Prata.

Às mulheres participantes deste estudo, que confiaram na seriedade deste projeto.

Aos professores da Pós-graduação, em especial a professora Sônia Maria Fernandes Fitts, sua dedicação é admirável.

À fundação de apoio e desenvolvimento do ensino, ciência e tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

Àqueles do Laboratório Municipal Central (LABCEN), que participaram diretamente no andamento deste trabalho.

Aos demais amigos, irmãos, primos, tios, sogro e sogra, eu sei que a torcida foi enorme, obrigada pelo olhar carinhoso e pela atenção ao ouvir minhas apresentações.

RESUMO

A infecção por Papilomavírus humano de alto risco é a causa principal do câncer cervical. Estudos demonstram que o teste de DNA do HPV em amostras cervicais tem maior sensibilidade do que a citologia cervical (Papanicolau). Entretanto, o rastreamento baseado na coleta clínica de amostras cervicais para o teste molecular, exige consultas médicas e exames ginecológicos com espécuro. A autocoleta poderia ser uma alternativa apropriada de obtenção de amostra, especialmente para pacientes resistentes à coleta clínica. O objetivo desta pesquisa foi: determinar a concordância entre a detecção de DNA de HPV em amostras obtidas por autocoleta e coleta clínica de mulheres atendidas no serviço público de saúde e avaliar a associação entre a infecção por HPV e infecções genitais concomitantes. A presença de HPV foi analisada em 170 pares de amostras, obtidas pela autocoleta e coleta clínica, através da PCR, utilizando os *primers* PGMY09/11. As amostras positivas para HPV foram submetidas à PCR tipo específica para os tipos HPV16, 18, 33, 31, 45, 6 e 11. O resultado da bacteriologia do esfregaço vaginal das pacientes foi fornecido pelo LABCEN-MS. A prevalência da infecção por HPV foi de 30%. Detectou-se DNA de HPV em 26,5% das amostras autocoletadas comparada a 22,9% das amostras obtidas por da coleta clínica. Houve boa concordância entre ambos os métodos de coleta (concordância=84,6%; $\kappa=0,72$). Em ambos os métodos de coleta, o HPV16 foi o tipo viral de alto risco mais frequente, com 6 amostras positivas. *Gardnerella vaginalis* foi o microorganismo com maior prevalência em mulheres com infecção por HPV (19,6%), contudo não houve associação entre a prevalência de HPV e outras infecções genitais ($p=0,24$). Os resultados demonstram que a autocoleta pode ser um método eficaz na detecção DNA de HPV. A introdução desse novo método poderá aumentar a percentual de participação das mulheres nos programas de prevenção ao câncer cervical.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, autocoleta, coleta clínica, PCR.

ABSTRACT

Infection with high-risk of Human papillomavirus is a major cause of cervical cancer. Studies demonstrated that HPV-DNA testing for cervical specimens has a higher sensitivity than cervical cytology (Papanicolaou). However, the screening based in clinician-collected cervical sampling for molecular test requires medical visits and gynecological exams with speculum. Self-collected might be a suitable alternative for obtaining sample, especially in resistant patients clinician-collected. The purpose of this research was to determine the concordance among detection of HPV-DNA in self and clinician-collected specimens from women attended in public health service and to evaluate the association between HPV infection and concomitant genital infections. The presence of HPV was analyzed in 170 paired specimens, obtained by self-collected and clinician-collected, in PCR, using primers PGMY09/11. The positives samples for HPV underwent PCR type-specific for HPV16, 18, 33, 31, 45, 6 e 11. The results of bacteriology of the vaginal smears were provided by LABCEN-MS. HPV infection prevalence was 30%. DNA-HPV was detected in 26.5% self-collected specimens compared to 22.9% obtained by clinician-collected specimens. There was good concordance between both collected methods (agreement=84.6%; $\kappa=0.72$). For both collection methods HPV16 was the most common high risk viral type, with 6 samples positives. *Gardnerella vaginallis* was the most prevalent microorganism in women with HPV infection (19.6%), however there was no association between HPV prevalence and others genital infections ($p=0.24$). These results demonstrated that the self-collected may be an effective method for HPV-DNA detection. The introduction of this method could increase the percentage of women participation in cervical cancer screening programs.

Keywords: Human papillomavirus, self-collected, clinician-collected, PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Histórico.....	10
2.2 Papilomavírus humano (HPV)	11
2.2.1 Estrutura e classificação do HPV	11
2.2.2 Ciclo de vida do HPV	12
2.2.3 Propriedades de transformação e immortalização celular.....	13
2.3 Epidemiologia.....	14
2.3.1 Fatores de risco para infecção	14
2.3.2 Prevalência da infecção por HPV	15
2.4 Resposta imunológica	16
2.5 Diagnóstico clínico e laboratorial	17
2.5.1 Autocoleta	19
2.6 Prevenção e tratamento.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Tipo de estudo	24
4.2 Local do estudo	24
4.3 Sujeitos do estudo	24
4.4 Coleta das amostras	24
4.5 Coleta dos dados subsidiários ao estudo	25
4.6 Detecção do DNA de HPV.....	25
4.6.1 Extração do DNA.....	25
4.6.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	26
4.6.3 PCR tipo viral específico	26
4.6.4 Análise do produto da reação de PCR	27
4.7 Análise dos dados.....	28
4.8 Aspectos éticos.....	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Dados sociodemográficos da população estudada	29

5.2 Resultados obtidos na PCR.....	30
5.2.1 PCR HPV tipo específico.....	31
5.3 Coinfecção HPV e outros microorganismos.....	34
5.4 Fatores de risco para infecção por HPV	35
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIA.....	45
ANEXOS	57
APÊNDICES	59

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavirus humano (HPV) tem tropismo por células epiteliais da pele e mucosas. A infecção pelo HPV é muito comum, ainda que a maioria dos infectados eliminem o vírus sem desenvolver manifestações clínicas ou subclínicas. Em algumas mulheres, as infecções podem persistir e progredir para lesões pré-cancerosas ou câncer cervical. Com elevado índice de mortalidade, o câncer do colo uterino é o segundo mais comum entre as mulheres.

Devido ao potencial de formar lesões benignas ou malignas, o HPV está dividido em grupos de baixo risco e alto risco oncogênico. Está bem estabelecido que a infecção do trato genital por HPV de alto risco é o fator causal para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais de alto grau (NIC III) e do câncer cervical. Cofatores associados à infecção pelo vírus, como o uso prolongado de contraceptivos orais e infecções com outros microorganismos, podem aumentar o risco da carcinogênese.

A detecção precoce das lesões e seu tratamento são essenciais na prevenção do câncer cervical. O exame preventivo mais comum é o Papanicolau, teste que verifica alterações nas células cervicais. Apesar da sua importância no diagnóstico do HPV, este apresenta uma importante limitação por ter interpretação subjetiva dos resultados. Assim, métodos que detectam o DNA do vírus HPV têm sensibilidade maior que métodos citológicos.

No método convencional de coleta de amostra cervical, o DNA do HPV é obtido a partir de células cervicais, coletadas por um profissional treinado, durante exame pélvico com espéculo, o que limita a aceitabilidade do método. A detecção do DNA do HPV, em amostras cervicovaginais coletadas pela própria paciente, seria uma estratégia alternativa e eficiente como teste primário para rastreamento do câncer cervical. Neste procedimento, a mulher pode coletar sua amostra com privacidade, sem necessidade de consultas médicas e exames ginecológicos prévios.

Nos países em desenvolvimento, devido a ineficiente infraestrutura dos programas de rastreamento, há pouca efetividade no controle da incidência do câncer cervical. O resultado satisfatório dos programas de prevenção do câncer do colo do útero está essencialmente relacionado com o tamanho da população atingida e com a qualidade do método de diagnóstico. Portanto, o presente estudo teve como objetivo, pesquisar a concordância entre os métodos de coleta de células cervicais e vaginais para detecção de DNA do HPV, esses dados poderão contribuir para implantação de um diagnóstico mais abrangente, de forma a aumentar o número de mulheres atendidas nos serviços de prevenção do câncer.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Historicamente as verrugas genitais foram observadas desde a época greco-romana. Gemy (1893) foi o primeiro a sugerir a relação entre verrugas genitais e da pele, devido às suas semelhanças histológicas (ORIEL, 1971). Denominadas por condiloma acuminado, as verrugas genitais foram descritas por Virchow, em 1867, como lesões semelhantes à couve-flor (apud YAMAMOTO; ALVES, 1998, p.1).

Ciuffo (1907) foi o primeiro a produzir verrugas em experimentos através da inoculação de extrato filtrado de verruga plana e estabeleceu a etiologia viral e sua forma contagiosa (apud YAMAMOTO; ALVES, 1998, p.2). Em 1949, com a tecnologia da microscopia eletrônica, estudiosos verificaram a presença de partículas virais em padrão cristalino em verrugas da pele (STRAUSS et al., 1949).

Através de infecções experimentais em coelhos selvagens e domésticos, Shope (1933), constatou que o período de incubação para o agente viral das lesões papilomatosas era de seis a doze dias. Observou também que os coelhos infectados ficavam imunes a reinfecções, além de sugerir que o vírus responsável pelos papilomas induzia tumores em mamíferos (SHOPE; HURST, 1933).

Em 1968, Dunn e Ogilvie observaram por microscopia eletrônica (ME) um vírus com morfologia típica do papilomavirus em condiloma acuminado, e concluíram a etiologia das verrugas genitais (DUNN, OLGIVIE, 1968). Por ser um vírus epiteliotrópico, causar verrugas e condilomas aumentaram as suspeitas do envolvimento do papilomavírus como agente etiológico de câncer em humanos (GREEN et al., 1982).

Em 1976, Zur Hausen levantou a possibilidade da relação do papilomavírus humano com o câncer genital em humanos, e seu papel nos carcinomas escamosos. No mesmo ano, Gissman e Zur Hausen, confirmaram a evidência da heterogeneidade genética do vírus em condilomas acuminados, revelando os diferentes tipos virais do HPV (ZUR HAUSEN, 1976; GISSMAN; ZUR HAUSEN, 1976).

A partir do ano 2000, com o avanço tecnológico da biologia molecular, estudos epidemiológicos indicaram resultados consistentes e esclarecedores do envolvimento da infecção de alguns tipos de HPV como causa necessária para progressão do câncer cervical (BOSCH et al., 2002).

2.2 Papilomavírus humano (HPV)

2.2.1 Estrutura e classificação do HPV

O Papilomavírus humano (HPV), membro da família Papillomaviridae, possui DNA circular de dupla hélice, com 8 mil pares de bases. São vírus não envelopados, com diâmetro de 50 a 60 nm, o capsídeo viral é icosaédrico com 72 capsômeros (BURD, 2003; BUCK et al, 2008). O genoma do HPV (Figura 1) é organizado em duas regiões gênicas, onde seis genes estão na região conhecida como precoce ou *early* (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), e dois (L1 e L2) na região conhecida como tardia ou *late* (FEHRMANN; LAIMINS, 2003).

Os Papilomavírus filogeneticamente semelhantes estão unidos em gêneros, os principais gêneros são o Beta-papilomavírus associado à lesão cutânea no homem e o Alpha-papilomavírus, o mais amplo, que contém HPV de tropismo mucoso e cutâneo. Atualmente são reconhecidos cerca de 230 tipos de HPV, novos tipos são identificados quando a sequência dos nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 diferirem mais de 10% dos tipos conhecidos (HAWS et al., 2004; DE VILLIERS, 2004). Há aproximadamente 40 tipos de HPV com tropismo pelo epitélio genital e classificado de acordo com o seu potencial em induzir à malignidade. Os tipos de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81) são encontrados em verrugas genitais e raramente progridem para malignidade, já os de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68, 73 e 82) estão associados à lesão de alto grau e câncer cervical (MUÑOZ et al., 2003).

Figura 1 – Relação entre os genes de Papilomavírus e suas funções

Expressão Gênica	Genes	Função
Precoce	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Transcrição e replicação
	E4	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	E5, E6, E7	Estímulo de proliferação transformação celular
Tardia	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo

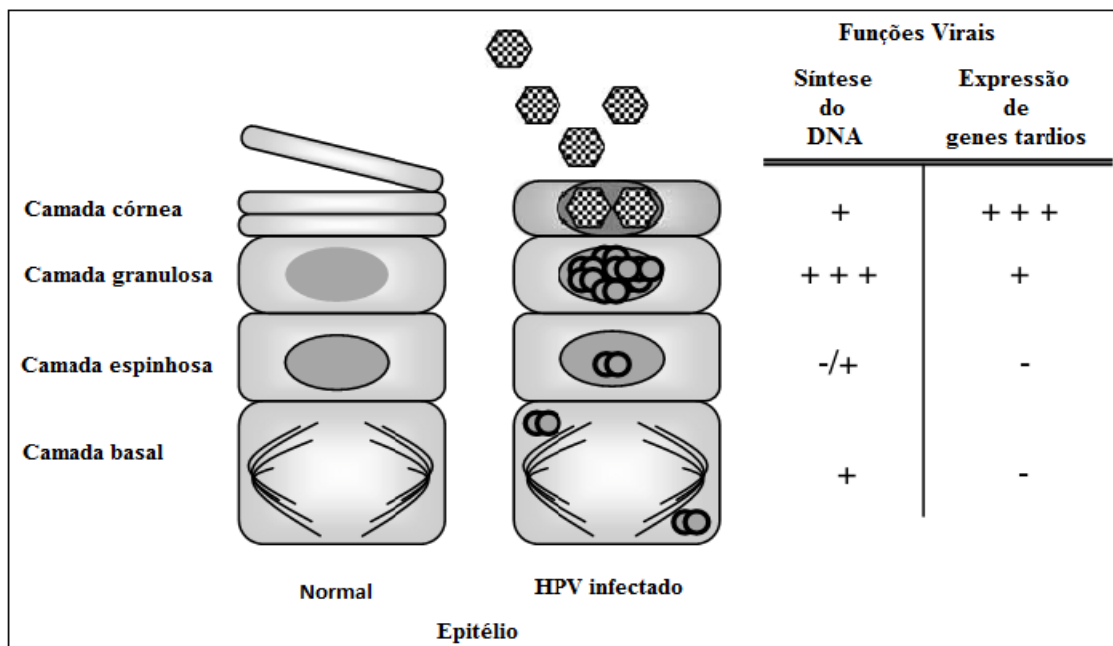
Fonte: adaptado de Souto; Falhari; Cruz (2005)

2.2.2 Ciclo de vida do HPV

O HPV inicia a infecção na camada basal da epiderme através de fissuras existentes no epitélio da mucosa genital. O ciclo de vida produtivo do HPV (Figura 2) é dependente de células em diferenciação. Após infectar uma célula, o genoma viral fica dentro do núcleo da célula hospedeira, de forma episomal (extracromossomal), e o número de cópias aumenta de 50 a 100 por células. As células infectadas se dividem e o DNA viral é distribuído entre as células-filhas. Uma dessas células migra para camada suprabasal e inicia o processo de diferenciação (STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999; BODILY; LAIMINS, 2011).

O estabelecimento do genoma viral nas células da camada basal, de forma episomal, exige a expressão de proteínas de replicação, E1 e E2. Na infecção produtiva, o gene E2 tem várias funções de segregação e replicação do genoma viral, também age como fator de transcrição e pode regular a expressão de oncogenes (E6 e E7). As proteínas do capsídeo viral L1 e L2 são produzidas na fase tardia, nas camadas superficiais, ambas com papel importante na infectividade viral, uma vez que essa etapa libera os vírions infectantes (DOORBAR, 2006).

Figura 2 – Representação esquemática da diferenciação anormal do epitélio infectado por HPV comparado com o epitélio normal e as funções virais em cada fase de diferenciação



Fonte: adaptado de Fehrman e Laimins (2003)

2.2.3 Propriedades de transformação e imortalização celular

A carcinogênese iniciada pela infecção do HPV de alto risco relaciona-se com a integração do vírus no cromossomo da célula hospedeira e a clivagem na região do gene E1/E2. A ruptura do gene E2 aumenta a expressão dos dois genes precoces, as oncoproteínas E6 e E7, as quais são necessárias e suficientes para imortalização, *in vitro*, de queratinócitos genitais humanos. A expressão das proteínas E6 e E7 podem ser responsáveis pela transformação e imortalização celular (DOORBAR, 2006; MÜNGER et al., 1989).

Foi demonstrado que o gene E5 do HPV16 está envolvido na transformação celular e interage com o fator de crescimento epidérmico, EGF (*epidermal growth factor*), o que implica na estimulação do crescimento celular (GENTHER WILLIAMS et al., 2005). Porém, a proteína E5 não está presente em carcinomas cervicais, o que indica não ser essencial na manutenção da transformação maligna das células do hospedeiro (MOTOYAMA et al., 2004).

Responsável pela degradação da p53, o gene E6 tem efeito mutagênico nas células infectadas por HPV de alto risco, agindo como fator importante na progressão de tumor. O gene p53 é capaz de detectar o crescimento defeituoso das células, desse modo ativa o reparo do DNA, senão, induz a morte celular por apoptose. (MANTOVANI; BANKS, 1999). Além da associação com a proteína supressora de tumor, o gene E6 também aumenta a atividade da enzima telomerase, ativação responsável pela imortalização da célula (VELDMAN et al., 2001).

O papel crítico do gene E7 do HPV de alto risco está relacionado com a proteína pRb (proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma). A função fisiológica da proteína pRb é controlar a divisão celular, exercendo efeito antiproliferativo ao bloquear a proteína estimuladora de transcrição E2F, que estimula genes de transcrição da fase S do ciclo, impedindo a passagem da fase G1 para S do ciclo celular. A expressão da proteína E7 desloca o complexo pRb/E2F, inativa a proteína pRb e desequilibra o crescimento normal da célula, estimulando a expressão de genes responsáveis pela divisão celular (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012; JO; KIM, 2005).

A interação das proteínas E6-p53 e E7-pRb apresenta propriedades bioquímicas distinta entre os diferentes tipos de HPV. Os tipos de baixo risco oncogênico fazem interações de baixa afinidade, em comparação com os de alto risco, portanto não demonstram capacidade de transformação celular (HECK et al., 1992; WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990).

A contínua estimulação da proliferação celular pelo gene E7 juntamente com a degradação da p53, como resultado da expressão do gene E6 permitem o acúmulo de mutações no genoma celular que eventualmente leva ao câncer (DOORBAR, 2006).

2.3 Epidemiologia

2.3.1 Fatores de risco para infecção

A aquisição do HPV é muito comum, especialmente entre jovens sexualmente ativas. Mundialmente, pelo menos 50% das mulheres sexualmente ativas, foram ou serão infectadas com um ou mais tipos de HPV (BASEMAN, KOUTSKY, 2005). A maior parte das mulheres infectadas, 70 a 90%, têm cura espontânea de 8 a 12 meses (HO et al., 1998).

Estudos moleculares e epidemiológicos têm mostrado fortes evidências de que o HPV é o fator etiológico principal para o desenvolvimento do câncer cervical. O DNA do HPV tem sido encontrado em 80-99% dos casos de câncer cervical. A *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC, 1995) categorizou o HPV 16 e o 18 como carcinogênicos. A infecção por HPV é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer de colo do útero. Outros fatores influenciam a progressão neoplásica, tal como a alta paridade, o uso prolongado dos contraceptivos orais e o fumo (BOSCH et al, 1995; WALBOOMER et al, 1999; BOSCH, MUÑOZ, 2002).

Os principais fatores de risco para adquirir a infecção por Papilomavírus humano são ligados ao comportamento sexual, como o número de parceiros sexuais durante a vida e a idade do início da atividade sexual. Roteli Martins e colaboradores (2007) observaram associação significativa entre o início precoce da atividade sexual e a aquisição da infecção por HPV de alto risco (ROTELI-MARTINS et al., 2007). A incidência de infecção é maior no grupo com idade entre 15-19 anos, sendo assim jovens são mais expostos à aquisição de HPV. Com base nesses dados, foi sugerido que a positividade para HPV depois dos 29 anos pode ser resultado de infecção persistente (SELLORS et al., 2003).

Os fatores de risco para infecções persistentes são a infecção por HPV de alto risco e mulheres acima de 35 anos. Por sua vez, as infecções persistentes pelo HPV aumentam a chance de desenvolver lesões intraepiteliais cervicais (HO et al., 1998). Estudo retrospectivo no Rio de Janeiro mostrou que 95% das pacientes com infecção persistente por Papilomavírus humano eram positivas para HPV de alto risco (CARVALHO et al., 2005).

A maioria das infecções por HPV são transientes, sendo que o pico de incidência acontece aos 20 anos, enquanto que a detecção de NICIII (Neoplasia Intraepitelial Cervical III) é a mais incidente em torno dos 30 anos de idade (KITCHENER; CASTLE; COX, 2006). Mulheres com infecção por HPV têm 11 vezes mais risco de desenvolver NICII ou NICIII, do que aquelas com nenhuma infecção (KOUTSKY et al., 1992). Esse risco excessivo está fortemente associado à infecção por HPV16 e 18. Em todo o mundo, o HPV16 é o tipo mais comum, com prevalência de 58,9%, e o segundo tipo é o HPV 18, com 15%. (MUÑOZ et al., 2003). Em mulheres positivas para HPV16 e HPV18, o risco de desenvolver lesões NICIII no período de 10 anos é de 20%, enquanto aquelas positivas para outros HPV oncogênicos tem 2% de risco (KAHN et al., 2005).

Outro possível fator de risco para adquirir infecção por HPV é a presença de vaginose bacteriana (VB). Na VB, onde predominam bactérias anaeróbicas, as mais comuns são *Mobiluncus sp*, *Atopobium vaginae* e *Gardnerella vaginalis*. Essa última é a mais encontrada nas mulheres com VB, porém também presente em pequenas colônias na microflora vaginal saudável. A VB é marcada pela diminuição dos microorganismos responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio, os *Lactobacillus sp*, com isso o pH vaginal aumenta, permitindo o desequilíbrio da flora vaginal. Além disso, na VB, há o aumento da enzima sialidase, o que prejudica a eficácia da barreira defensiva contra a invasão de outros microorganismos no epitélio vaginal. Esses fatores aumentam a susceptibilidade em adquirir infecção por HPV ou outras infecções sexualmente transmissíveis (LIVENGOOD, 2009; GILLET et al, 2011).

2.3.2 Prevalência da infecção por HPV

Ao redor do mundo o câncer cervical é o terceiro mais diagnosticado e o quarto motivo de morte em mulheres, contabilizando 9% do total de novos casos de câncer e 8% do total de mortes por câncer em mulheres em 2008. Mais de 85% desses casos de câncer e mortes ocorrem em países em desenvolvimento (JEMAL et al, 2011).

A África é o país com maior prevalência de infecção por HPV e incidência de câncer cervical. Um estudo recente apontou a estimativa global da prevalência de infecção por HPV em mulheres com achados citológicos normais. As maiores taxas de prevalência estavam presentes na África, Leste da Europa e América Latina, com 24%, 21,4% e 16,1% de prevalência, respectivamente. Os tipos de HPV mais comuns encontrados no estudo foram HPV16, HPV18, HPV52, HPV31 e HPV58 (BRUNI et al., 2010).

Mundialmente a prevalência de HPV em mulheres com citologia normal é de 11,4%, na América do Sul de 13,2% e no Brasil, 14,1%. A estimativa geral de infecção por HPV realizada em quatro regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste) variou de 10,4% a 24,5% (WHO, 2010; AYRES; SILVA, 2010). O risco estimado de câncer do colo do útero no Brasil no ano de 2012 foi de 17 casos a cada 100 mil mulheres. As regiões com maior incidência do câncer em ordem crescente são: Norte, Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul (INCA, 2011).

A prevalência da infecção por HPV de alto risco em cidades como São Paulo e Campinas foi de 17,8%, com distribuição maior em mulheres com idade inferior a 25 anos (RAMA et al., 2008). No estudo de Porto Alegre, foi detectado o DNA de HPV de alto risco e baixo risco oncogênico em 16% das amostras cervicais (NONNENMACHER et al., 2002). No Rio de Janeiro, a presença de HPV de alto risco oncogênico foi observada em 12,8% das mulheres (GIRIANELLI; THULER, SILVA, 2010).

Em Campo Grande, MS, foi analisada a infecção por HPV em mulheres com suspeitas clínicas de lesão cervical. A PCR tipo específico foi realizada em 48% das amostras positivas para DNA do HPV, e os tipos virais mais encontrados foram HPV6/11, HPV66, HPV45, HPV18 e HPV16, respectivamente. A infecção por múltiplos tipos foi encontrada em 26,8% da população estudada (TOZETTI et al., 2006).

2.4 Resposta imunológica

O sistema imune atua com importante papel na eliminação da infecção pelo Papilomavírus humano, sendo que a maioria das infecções é eliminada antes de desenvolver lesões pré-malignas. Infecções por HPV de alto risco podem persistir, possibilitando o desenvolvimento do câncer cervical (DE JONG et al., 2004). A duração prolongada da infecção é explicada pelo ciclo de replicação do vírus e aos mecanismos de evasão utilizados por este para resistir à imunidade inata. Durante a replicação, montagem e liberação viral não há sinais de inflamação, nem lise celular, o que retarda a ativação da imunidade inata e adaptativa (STANLEY, 2009).

Foi demonstrado o papel protetor das células T citotóxicas (CTLs) contra as proteínas E6 e E7, nas lesões cervicais associadas ao tipo HPV16 (NAKAGAWA et al., 1997). A caracterização da resposta imune aos genes E6 e E7 do HPV16 foi analisada por Nakagawa e colaboradores (1999), os quais verificaram que são as células T CD4⁺ e células T CD8⁺ que contribuem para a resposta imune da infecção por HPV (NAKAGAWA et al., 1999). Células

T auxiliares CD4⁺ são importantes no desenvolvimento de respostas humorais e células efectoras contra a infecção, assim a resposta prejudicada de linfócitos CD4⁺ contra o antígeno viral favorece a indução de neoplasia associada ao HPV (DE JONG et al., 2004).

Os subconjuntos mais bem definidos das células T efectoras da linhagem auxiliar CD4⁺ são as células TH1 e TH2; interferon gama (INF- γ) é a citocina de assinatura das células TH1, e a IL-4 é a citocina que define as células TH2 (ABBAS; LITCHMAN, PILLAI, 2008). A resposta TH1 é importante para eliminar a infecção por HPV, e sua falha pode estar associada às infecções persistentes e ao desenvolvimento de neoplasia relacionada. Foi demonstrado que em um grupo de mulheres positivas para HPV, e que eliminaram a infecção depois de alguns meses, a resposta TH1 esteve presente, com expressão de INF- γ e ausência de IL-4 (SCOTT, STITES, MOSCICKI, 1999).

Na resposta humoral contra o vírus HPV são produzidos anticorpos específicos contra proteínas estruturais da região tardia (L1). A soroconversão não é sempre observada, cerca de 20 a 50% das mulheres com infecção ou lesões associadas por HPV não tem anticorpo específico anti-HPV detectáveis no soro. Tal fato pode ser explicado, pois testes sorológicos para HPV não detectam baixos títulos de anticorpos. Na infecção, além de não haver viremia, as partículas virais estão localizadas na camada epitelial, com pouco acesso aos vasos linfáticos, prejudicando a ativação da resposta imune (CARTER et al, 2000; STANLEY, 2009).

O período médio da produção de anticorpos contra o capsídeo L1 é de 12 meses. Os anticorpos neutralizantes anti-HPV protegem contra reinfecções do mesmo tipo viral ou outros tipos semelhantes, demonstrando a proteção cruzada dos anticorpos (CARTER et al, 2000).

A presença de anticorpos neutralizantes anti-HPV16 pode ser usada para identificar mulheres com maior risco de persistência viral e progressão da doença. Foi demonstrado que entre mulheres com lesão intraepitelial de baixo grau induzida por HPV16, a presença de anticorpos determina um aumento significativo no risco de progressão de pré-câncer. Provavelmente, a razão dessa associação seja porque a produção contínua dos anticorpos contra o capsídeo do HPV-16 venha ser reflexo de persistência viral (OCHI et al, 2012).

2.5 Diagnóstico clínico e laboratorial

A zona de transição epitelial, localizada entre o epitélio da exocérvice e o colunar do canal endocervical, é particularmente vulnerável ao HPV por ser o local onde a metaplasia

escamosa ocorre, o que é favorável ao desenvolvimento da forma subclínica da infecção - a displasia cervical (BEUTNER et al, 1999; WEAVER, 2006).

A mudança da morfologia dessas células epiteliais cervicais é verificada na citotologia através do exame conhecido por Papanicolau. Aplicado desde os anos 50 nos EUA, é responsável por notável redução nos casos de câncer no colo do útero neste país, porém ao redor do mundo o câncer cervical ainda é um dos mais comuns, devido à falta de estrutura dos programas de prevenção (DUNNE; MARKOWITZ, 2006).

A classificação da citologia realizada pelo Papanicolau foi padronizada pelo Sistema Bethesda proposta em 1988, que subdivide células epiteliais escamosas anormais em quatro grupos: (1) células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS); (2) lesões escamosas intra-epiteliais de baixo grau (LSILs), abrangendo displasia leve e neoplasia intra-epitelial cervical (NIC-I), bem como alterações celulares associadas ao Papilomavírus humano; (3) lesões escamosas intra-epiteliais de alto grau (HSIL), incluindo displasia moderada e neoplasia intra-epitelial cervical (NIC-II), displasia severa, e carcinoma *in situ* (NIC-III) e (4) carcinoma invasivo (BARCELOS et al., 2011).

Mais de dois milhões de mulheres recebem diagnóstico ASCUS na citologia de cérvix uterina por ano nos EUA. Essa situação foi questionada, constatou-se em um estudo que 5,1% das mulheres com lesão cervical de alto grau NIC-III foram erroneamente diagnosticadas com ASCUS (SOLOMON et al., 2001). Em 2001, o Sistema Bethesda reclassificou o diagnóstico de ASCUS para duas subdivisões: ASC-US células escamosas de significado indeterminado; e ASCU-H células escamosas de significado indeterminado na qual não é descartada lesão intra-epitelial de alto grau (BARCELOS et al., 2011).

Os recursos necessários para infraestrutura e tecnologia, juntamente com a necessidade de repetições de exames em intervalos regulares, fazem o exame citológico ter suas limitações (BHATLA; MODA, 2009). A interpretação do resultado deste exame é subjetiva, principalmente em programas de prevenção sem garantia de qualidade, o que explica as altas taxas de incidência de câncer cervical em países com nível socioeconômico baixo (KITCHENER; CASTLE; COX, 2006).

Métodos adicionais como o diagnóstico molecular usado para detectar o DNA do HPV está associado com a redução na incidência do câncer cervical e mortalidade, refletindo a alta sensibilidade do teste em detectar lesões com potencial de malignidade comparada aos exames citológicos e VIA (inspeção visual com ácido acético). A técnica molecular é mais objetiva, com maior reprodutibilidade, fácil treinamento e garantia de qualidade para triagem do câncer cervical (SANKARANARAYANAN et al., 2009).

Métodos diagnósticos para detecção do DNA do HPV, tais como PCR, captura de híbridos, tem maior sensibilidade que o exame Papanicolau, porém a especificidade é maior no exame citológico, nessas circunstâncias há sugestões que o teste mais sensível, detecção de DNA do HPV, seja feito primeiro; e o citológico, teste mais específico, é recomendado quando o resultado for positivo para HPV (CUZICK et al, 2006).

Estratégias de prevenção do câncer cervical que unem os testes citológico e molecular mostraram-se mais eficazes. Segundo Naucler e colaboradores (2007), as mulheres que passaram por exames específicos para HPV em conjunto do Papanicolau tiveram aproximadamente 40% de redução na frequência de NIC II/III ou câncer cervical, comparadas a mulheres que foram examinadas somente com Papanicolau (NAUCLER et al., 2007).

A avaliação do custo-benefício na estratégia de triagem de lesão cervical realizada a cada 3 ou 5 anos, onde inclui a detecção do DNA do HPV como prevenção primária e citologia como secundária, foi melhor do que o exame citológico anual feito isoladamente. Os resultados mostraram que também houve redução nos casos de câncer em estratégias que usaram a combinação simultânea dos dois exames como prevenção primária (CHOW et al., 2010).

Outra vantagem da detecção molecular do DNA de HPV é a possibilidade de determinação dos tipos virais causadores da infecção. Os tipos oncogênicos HPV16 e HPV18 foram considerados de maior risco cumulativo para NIC-III do que outros tipos carcinogênicos ou não carcinogênicos, principalmente em mulheres maiores que 30 anos. Um único teste de diagnóstico do DNA tipo específico do HPV, em mulheres com mais de 30 anos, pode constatar o risco de progressão de pré-câncer e câncer (KHAN et al., 2005).

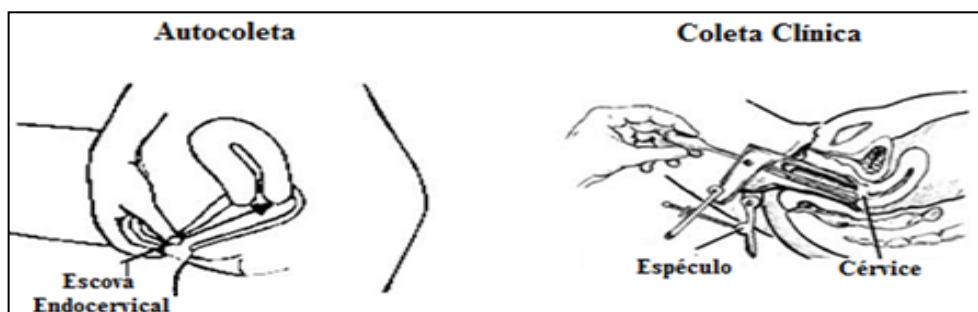
Na América do Sul e Central, os programas de prevenção do câncer do colo do útero abrangem boa parte da população, porém a qualidade diagnóstica e o acesso ao tratamento são fracos, e os índices de câncer cervical são os maiores do mundo (KITCHENER; CATLE; COX, 2006). A autocoleta é alvo de estudos como nova alternativa de obtenção de amostra para diagnóstico, pois pode identificar mais mulheres com risco para doenças cervicais, que não tem acesso ao sistema de saúde ou que resistem aos exames ginecológicos (BHATLA; MODA, 2009).

2.5.1 Autocoleta

A autocoleta é a opção de coleta mais atrativa para detecção do DNA do HPV, pois dispensa o uso do espécúlo, a amostra é coletada pela própria paciente com a escova

endocervical, pode ser feita em casa, além de ser mais adequada em regiões distantes ou sem unidades de saúde (Figura 3). As mulheres são instruídas verbalmente ou com diagramas pelos assistentes de saúde, mas as amostras são coletadas com privacidade (BHATLA et al, 2009). Para o diagnóstico molecular do vírus, demonstrou-se que adolescentes e mulheres adultas são capazes de coletar amostra de si mesmas e esse método de autocoletar-se obteve a sensibilidade suficiente para detectar HPV de alto risco oncogênico (KAHN et al, 2005).

Figura 3 – Ilustração dos métodos de autocoleta e coleta clínica.



Fonte: Adaptado de Khanna et al (2007).

Atualmente o método de amostragem para detectar o DNA do HPV considerado como *gold standard*, é a amostra coletada com o espéculo, pelo profissional de saúde. Porém a técnica da autocoleta tem o potencial de diminuir as limitações da coleta clínica convencional, por ser um método menos invasivo e mais aceito pelas mulheres. (PETGNAT et al, 2007; IGDIBASHIAN et al, 2011).

Estudos têm investigado se a detecção do DNA do HPV em amostras autocoletadas é eficiente na prevenção primária do câncer cervical. Na meta-análise realizada em 2007 verificou-se a acurácia da coleta clínica e da autocoleta em identificar mulheres com infecções genitais por HPV, e demonstrou que os dois métodos foram equivalentes na detecção de DNA do HPV (PETGNAT et al, 2007).

A necessidade de repetições e múltiplas visitas ao clínico, por parte das pacientes, inviabiliza a estratégia de prevenção através do exame citológico nos países em desenvolvimento. O reconhecimento de que a infecção por HPV de alto risco oncogênico é a causa primária do câncer cervical, tornou os ensaios para DNA de HPV uma técnica alternativa ao teste citológico. Porém a triagem baseada em amostragem cervical coletada por profissionais ainda requer visitas médicas e exame pélvico com espéculo, limitando o acesso e a aceitabilidade do método (SOWJANYA et al., 2009).

A aceitabilidade do método da autocoleta tem sido avaliada em países em desenvolvimento. Mulheres participantes do estudo de Igdibashian et al. (2011) declararam que autocoleta é mais fácil de realizar, que não é desconfortável e nem dolorosa. Sowjanya et al. (2009) em um estudo na Índia, com mulheres de 30 a 45 anos, verificaram que o índice de participação no rastreamento do câncer cervical baseado em amostragem aucoletada aumentou significativamente em relação à coleta realizada nas clínicas por profissionais, 71,5% *versus* 53,8%, respectivamente. É importante determinar a aceitabilidade do método de autocoleta, principalmente quando é aplicada no intuito de triar mulheres que recusam participar do rastreamento convencional.

2.6 Prevenção e tratamento

O modo de transmissão mais comum do Papilomavírus humano é pelo contato sexual. O uso do preservativo reduz a carga viral inoculada durante o ato da infecção e diminui o contato com as regiões genitais infectadas. Porém é improvável que esse preservativo ofereça o mesmo nível de proteção ao HPV como faz para o HIV, foi demonstrado que este previne contra lesões intraepiteliais e verrugas genitais, mas talvez não atue completamente na proteção da infecção por HPV, pois esta pode ocorrer em locais não protegidos pelo preservativo (MANHART; KOUTSKY, 2002).

A vacina contra o HPV é a mais recente estratégia de proteção às lesões associadas à infecção por HPV e na prevenção do câncer cervical. A vacina profilática contra o HPV é composta por proteína do capsídeo viral L1 produzida como partículas semelhante ao vírus (VLP) que induzem fortemente a resposta humoral com anticorpos neutralizadores. A vacina pode ser quadrivalente (HPV16, 18, 6, 11) ou bivalente (HPV16, 18), a injeção intramuscular é administrada em três doses no período de seis meses (LOWY; SCHILLER, 2006).

A vacina quadrivalente demonstrou prevenir doenças relacionadas ao HPV por cinco anos, induzir altos títulos de anticorpos anti-HPV no soro, com eficácia de 100% em reduzir infecção persistente, neoplasia e verrugas genitais causadas por HPV16, 18, 6, e 11. Os anticorpos gerados pela vacina protegem contra infecções, evitando a entrada do vírus na célula. O benefício máximo da vacina é alcançado em meninas jovens, de 11 a 15 anos, que ainda não iniciaram a atividade sexual, porém jovens com idade entre 16 e 26 anos que já iniciaram relação sexual e podem ter novos parceiros no futuro, também se beneficiam com a vacina (VILLA et al, 2006; STANLEY, 2010).

As lesões intraepiteliais não invasivas são tratadas com procedimentos ablativos superficiais como a crioterapia e a vaporização a laser de CO₂. Como técnica excisional, a conização é o tratamento padrão para a lesão HSIL, trata-se da excisão do tecido da zona de transição epitelial para análise histopatológica. No caso de carcinoma in situ, a radioterapia é indicada após a histerectomia total (WOLSCHICK et al, 2007).

O tratamento com agentes antivirais, tais como interferons (IFNs) têm sido utilizado em lesões intraepiteliais e condiloma acuminado. A imidazoquinolona (Imiquod) agente terapêutico tópico responsável em estimular a resposta imune inata, tem efeitos antivirais, sendo útil no tratamento de verrugas genitais externas e anogenitais. O Ácido Tricloroacético, agente citotóxico, também é usado na destruição química do epitélio das verrugas (WOLSCHICK et al, 2007; GARLAND, 2003; IARC, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a eficiência dos métodos de coleta clínica e de autocoleta de células epiteliais da cérvice e canal vaginal, para a detecção do DNA de Papilomavírus humano em pacientes atendidas no setor de Microbiologia do Laboratório Municipal Central (LABCEN), de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a concordância entre os métodos de coleta clínica e autocoleta para detecção de DNA do HPV.
- Avaliar a concordância entre os tipos virais de baixo e alto risco oncogênicos encontrados nas amostras obtidas por coleta clínica e autocoleta.
- Determinar a prevalência de infecção por HPV e os tipos virais predominantes em pacientes atendidas no setor de microbiologia do LABCEN-MS.
- Associar a prevalência da infecção com os resultados do exame bacterioscópico para determinar coinfeção.
- Analisar diferentes fatores de risco relacionados à presença de infecção por HPV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

O estudo presente é descritivo do tipo transversal.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado em amostras de células epiteliais da cérvix e canal vaginal coletadas de pacientes atendidas no setor de microbiologia do LABCEN-MS durante o período de agosto a dezembro de 2011.

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Imunologia Básica e Biologia Molecular de Vírus, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.3 Sujeitos do estudo

Participaram desse estudo mulheres encaminhadas ao LABCEN-MS para fazer exame bacteriológico e exame a fresco de secreção vaginal. As pacientes, após convidada para participar da pesquisa, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Foram excluídas do estudo pacientes com idade menor que 18 anos, aquelas que se encontravam, no momento da coleta, no período menstrual e aquelas que foram histerectomizadas.

4.4 Coleta das amostras

Para a coleta de amostra cervical e vaginal, na abordagem para participação da pesquisa, cada paciente recebeu um conjunto composto do material necessário para a realização da coleta clínica e da autocoleta. O material para a coleta foi composto de duas escovas endocervicais macia e com pontas protegidas, dois tubos do tipo *Falcon*, para acondicionamento das amostras, e espéculo vaginal descartável. A primeira amostra foi coletada pelo método de autocoleta e obtida sob supervisão, para tanto, as pacientes receberam um folheto explicativo com instruções sobre como proceder (Apêndice B).

Na sequência a mesma paciente foi submetida à coleta clínica de amostra cervical, realizada por uma profissional treinada do setor de microbiologia do LABCEN-MS, utilizando espéculo e nova escova endocervical macia e com ponta protegida. Ambas as escovas com as amostras obtidas foram identificadas, colocadas em separado em tubos do tipo *Falcon* de 15ml e armazenadas a -20°C até o processamento, o qual não excedeu 15 dias.

Em anexo tem-se a autorização para a realização da coleta no Setor de Microbiologia do LABCEN-MS (Anexo A).

4.5 Coleta de dados subsidiários ao estudo

As participantes do estudo responderam a um questionário (Apêndice C), contendo informações sigilosas sobre nível de escolaridade, fatores predisponentes à infecção, relacionados às suas práticas sexuais, presença ou utilização de co-fatores associados à progressão de carcinogênese, utilização de métodos preventivos da infecção e realização do exame citológico de Papanicolau.

Foram incluídos no estudo os dados provenientes dos resultados do exame de bacterioscopia do esfregaço vaginal, realizado por coloração GRAM (ISENBERG, 1998) e do exame a fresco, obtidos por acesso ao sistema do LABCEN-MS. A obtenção dos resultados foi autorizada pelas pacientes no TCLE.

4.6 Detecção do DNA de HPV

4.6.1 Extração do DNA

Após a realização da coleta, as escovas endocervicais contendo as amostras foram transportadas até o Laboratório de Imunologia Básica e Biologia Molecular de Vírus (CCBS/UFMS), e mantidas em temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA. Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de Extração de DNA – Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega®.

Adicionou-se às escovas 900 µl de tampão de lise celular e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Após agitação vigorosa, transferiu-se o líquido obtido para microtubos e centrifugou-se a 12000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao pellet presente 300 µl de solução de lise do núcleo. Em seguida procedeu-se a incubação a 37°C por 1 hora.

Na etapa seguinte adicionou-se 3 µl de RNase ao lisado celular e novamente incubou-se a 37°C por 15 minutos. Na sequência adicionou-se 100 µl de solução de precipitação de proteínas e centrifugou-se por 5 minutos a 12000 rpm. A um microtubo com 300µl de isopropanol transferiu-se 300µl do sobrenadante centrifugando novamente a 12000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 300µl de etanol gelado a 70%. Em seguida centrifugou-se novamente a amostra a 12000 rpm por 10 minutos, aspirou-se o sobrenadante e o pellet foi levado ao banho-maria a 37°C para evaporar por completo o etanol. Por último adicionou-se 100µl de tampão Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5) e o DNA obtido foi então estocado a temperatura de -20°C, para posterior análise.

4.6.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

As amostras foram submetidas à análise molecular para detecção do DNA de HPV. Foi realizada a reação de PCR utilizando os *primers* PGMY09/11 (GRAVITT et al, 2000) e como controle da presença de DNA humano foi realizada a amplificação de um fragmento de 286 pb do gene beta-globina, utilizando os *primers* PC04 e GH20 (BAUER et al, 1991).

Preparou-se então solução contendo: 26,5 µl de água ultra pura; 10 µl de tampão para PCR Tris-EDTA [5x]; 4 µl de dNTPs [2,5 mM]; 1 µl do *primer* HPV PGMY09 [10 pmol]; 1 µl do *primer* HPV PGMY11 [10 pmol]; 1 µl do *primer* para β-globina PC04 [10 pmol]; 1 µl do *primer* para β-globina GH20 [10 pmol]; 0,5 µl de enzima Taq Polimerase (Invitrogen®) 100 UI e 5 µl de DNA da amostra, totalizando 50 µl de solução. Utilizou-se, como controle de amplificação, amostras previamente analisadas como positivas para o DNA de HPV e como controle de não amplificação água estéril livre de DNA.

Colocou-se as reações em termociclador programado para 94°C por 5 minutos, para desnaturação inicial e, em seguida, para 40 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para o anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para extensão do amplificado. Após esses 40 ciclos seguiu-se uma extensão final a 72°C durante cinco minutos. Os produtos amplificados foram congelados a -20°C até serem submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

4.6.3 PCR tipo viral específico

As amostras positivas para o DNA do HPV foram testadas para os tipos específicos de alto risco oncogênico: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45 e para os tipos específicos de baixo risco oncogênico: HPV6 e HPV11.

A reação de PCR para os tipos específicos consistiu de solução com 2,5 µl de tampão para PCR Tris-EDTA [10x]; 2 µl de dNTPs [2,5 mM]; 0,75 µl de MgCl₂ [1,5 mM]; 1 µl de *primers forward* e *reverse* do HPV tipo específico desejado, na concentração de 10 pmol; 0,1 µl de Taq Polimerase (Invitrogen®) 100 UI e por último 3 µl de DNA da amostra positiva para os *primers* PGMY09/11. A água ultra pura foi adicionada para completar o volume final de 25 µl de solução. O reagente de MgCl₂ não foi utilizado para os tipos HPV11 e HPV31. Como controle de amplificação utilizou-se amostras padrão com tipo viral previamente determinado e como controle de não amplificação utilizou-se água ultrapura estéril.

Para amplificação colocou-se em termociclador utilizando o mesmo programa para os tipos HPV16, HPV33, HPV18, HPV45 e HPV6: 94°C por 5 minutos para desnaturação, seguido de 40 ciclos (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final de 72°C por 5 minutos. Para o tipo HPV31 o programa foi alterado para temperatura de anelamento a 54°C, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 3 minutos. Com relação ao HPV11 a temperatura de anelamento foi alterada para 52°C. O produto amplificado foi armazenado a -20°C para posterior análise por eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Na figura 4 observam-se as sequências dos primers utilizados e os tamanhos dos fragmentos amplificados.

Figura 4 – Tipos específicos de HPV, sequência dos respectivos *primers* e tamanho dos fragmentos amplificados.

HPV	Forward	Reverse	Fragmento pb
16*	TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA	CTTGTCCAGCTGGACCATCTATTT	174
33*	AAACCTTTGCAACGATCTGAGGTA	GTTTACATATTCCAAATGGATTTCCTCTCT	90
18*	CAACCGAGCACGACAGGAA	CTCGTCGGGCTGGTAAATGTT	219
31*	ATTCCACAACATAGGAGGAAGGTG	CACTTGGGTTTCAGTACGAGGTCT	75
45*	GGACAGTACCGAGGGCAGTGTA	TCCCTACGTCTGCGAAGTCTTTC	70
6**	CACGTCTGCAACGACCATAG	CCATGAAATTCTAGGCAGCA	194
11**	CGCAGAGATATATGCATATG	AGTTCTAAGCAACAGGCACAC	89

* Guo et al, 2007 ** Silva et al, 2003.

4.6.4 Análise do produto da reação de PCR

Os produtos da PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose. Diluiu-se a agarose com a solução de TBE [1x] 0,5M pH 8,0 (Trisbase + Ácido bórico + EDTA). Para a detecção do produto da PCR para DNA de HPV utilizou-se gel de agarose

com concentração de 1,5%, e para o produto da PCR para DNA de HPV tipo específico o gel de agarose foi de 2,5%.

Para aplicação da amostra no gel pipetou-se 8 µl do produto da PCR aos quais adicionou-se 3 µl do tampão marcador de corrida da amostra (azul de bromofenol e sacarose). A fonte foi ajustada para 100 mA, por 1 hora para análise dos dois tipos de produto da PCR. Após a corrida, o gel foi corado pelo brometo de etídeo 0,5 µg/ml, observado no transiluminador e a imagem fotodocumentada.

4.7 Análise dos dados

A frequência dos dados obtidos através do questionário foi analisada pelo teste do Qui-quadrado de Pearson (χ^2) para tabelas de contingência, ajustado pelo teste nominal de Phi e Cramér V. Ambos os testes foram corrigidos pelo teste de Yates. Como medida de associação entre os métodos de coleta clínica e autocoleta, o grau de concordância e discordância foram testados a pelo teste kappa e McNemar, respectivamente. Foi utilizado o programa SPSS 10.0 e BioEstat 5.0 para o teste de Qui-quadrado e o nível de significância foi considerado com valor de $p < 0.05$.

4.8 Aspectos éticos

A pesquisa que originou essa dissertação, intitulada “Eficiência dos métodos convencional e de autocoleta, de células da cérvix uterina e canal vaginal, para a detecção de DNA de Papilomavírus humano” e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS, protocolo nº 2172 de 25 de agosto de 2011 (Anexo B).

5 RESULTADOS

5.1 Dados sociodemográficos da população estudada

Participaram do presente estudo 171 mulheres com idade de 18 a 65 anos (média=34,7). A média da idade da primeira relação sexual foi aos 16,7 anos, variando de 11 a 30 anos. As características da população estudada estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características demográficas e comportamentais das mulheres participantes do estudo em Campo Grande, MS – 2012

Variável	N	%
Escolaridade (n=166)		
Ensino Fundamental Incompleto	48	28,9
Ensino Fundamental Completo	33	18,9
Ensino Médio Incompleto	17	10,2
Ensino Médio Completo	50	30,1
Ensino Superior Incompleto	14	8,4
Ensino Superior Completo	4	2,4
Nº de parceiros nos 2 últimos anos (n=167)		
Até 2 parceiros	149	82,2
Mais que 2 parceiros	18	10,8
Nº de parceiros anteriores aos 2 anos (n=163)		
Até 2 parceiros	127	77,9
Mais que 2 parceiros	36	22,1
Uso de preservativo (n=170)		
Sim	86	50,6
Não	84	49,4
Outros métodos contraceptivos (n=170)		
Não	118	69,4
Sim (DIU, pílula, injeção)	52	30,2
Tabaco (n=170)		
Não	158	92,9
Sim	12	7,1
Etilismo (n=170)		
Não	114	67,1
Sim/Às vezes	56	32,9

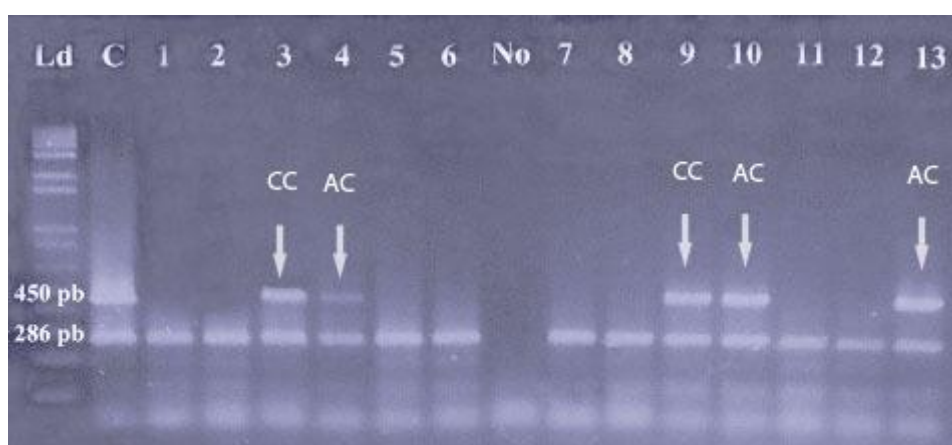
Em relação à realização do exame preventivo para câncer de colo de útero (n=170), 163 (95,9%) mulheres relataram que já haviam feito, e somente 7 (4,1%) disseram nunca ter realizado. Quando se avaliou a frequência com que as mulheres realizaram o exame preventivo Papanicolau (n=162), 15 (8,9%) relataram fazer esse exame menos que uma vez ao ano, 113 (67,7%) uma vez ao ano e 34 (20,4%) mais que uma vez por ano.

Quanto às doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), somente 14 (8,2%) mulheres relataram infecções como HPV, sendo mencionada infecção por Herpes, Clamídia, Gonorréia ou Tricomoníase (n=170).

5.2 Resultados obtidos na PCR

Do total de 171 amostras, apenas uma amostra foi negativa para amplificação do gene de beta-globina humana, tanto para amostra obtida na coleta clínica quanto para autocoleta, portanto, foi excluída da análise. Para os *primers* PGMY09/11, região L1 do HPV, foram detectadas 39 (22,9%) amostras positivas na coleta clínica e 45 (26,5%) na autocoleta (n=170). Na Figura 5, observamos o resultado da amplificação com os *primers* acima citados.

Figura 5 – Resultado da PCR utilizando os *primers* PGMY09/11 PC04/GH20 em amostras obtidas por coleta clínica e autocoleta, Campo Grande, MS – 2012. Gel de agarose a 1,5%.



Nota: Ld: marcador de peso molecular 100 pb; C: controle positivo HPV- 450 pb e controle positivo para betaglobina-286 pb; No: controle negativo; Setas: Amostras 3, 4, 9, 10 e 13 positivas para DNA de HPV; CC: coleta clínica; AC: autocoleta.

A prevalência de infecção por HPV foi observada em 51 (30%) mulheres considerando ambos os tipos de coleta. Com relação às amostras positivas, 33 (33/51-64,7%) foram concordantes em ambos os métodos de coleta, 12 (12/51-23,5%) amostras foram positivas somente no método de autocoleta e 6 (6/51-11,8%) somente na coleta clínica.

A concordância entre os métodos de coleta clínica e autocoleta para o diagnóstico da infecção por HPV apresenta-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Concordância entre os métodos de coleta clínica e autocoleta de amostras cervicovaginais segundo os resultados da PCR para detecção de DNA de HPV em Campo Grande, MS – 2012

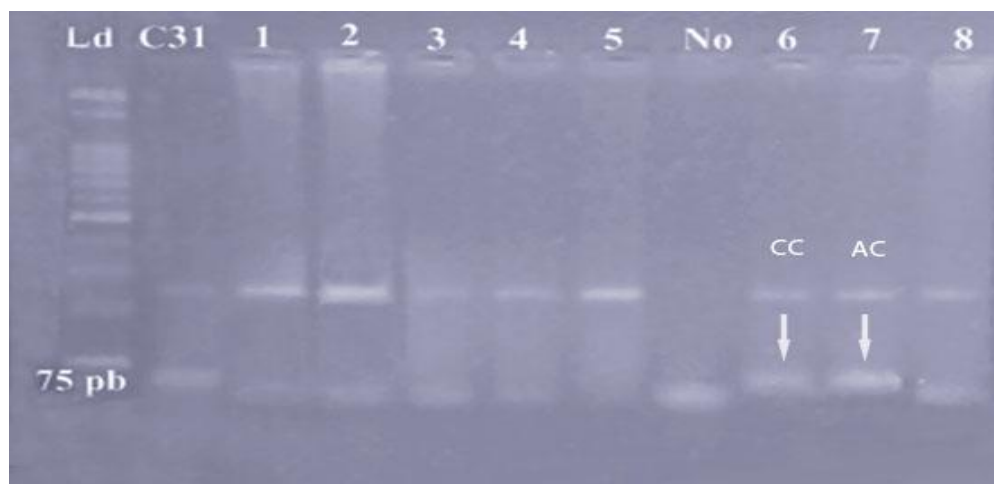
Coleta Clínica	Autocoleta		Total	kappa	% Conc.	McNemar
	Negativo	Positivo				
Negativo	119 (70%)	12 (7,1%)	131 (77,1%)	0,72	84,6%	0,23
Positivo	6 (3,5%)	33 (19,4%)	39 (22,9%)			
Total	125 (73,5%)	45 (26,5%)	170 (100%)			

Nota: % Conc- concordância entre os métodos.

5.2.1 PCR HPV tipo específico

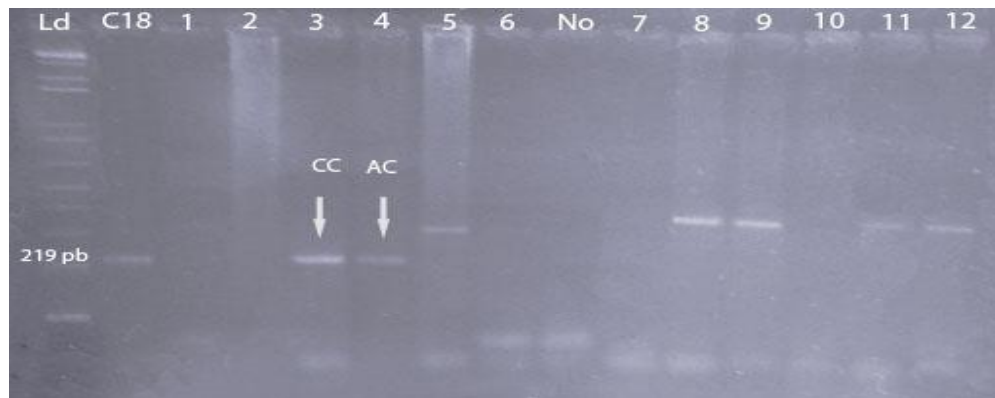
As amostras positivas pela amplificação com os *primers* PGMY09/11 foram submetidas à PCR HPV tipo específico, e o resultado pode ser observado nas figuras 6, 7, 8 e 9.

Figura 6 – Resultado da PCR para detecção do HPV31 em amostras obtidas por coleta clínica e autocoleta em Campo Grande, MS – 2012. Gel de agarose a 2,5%.



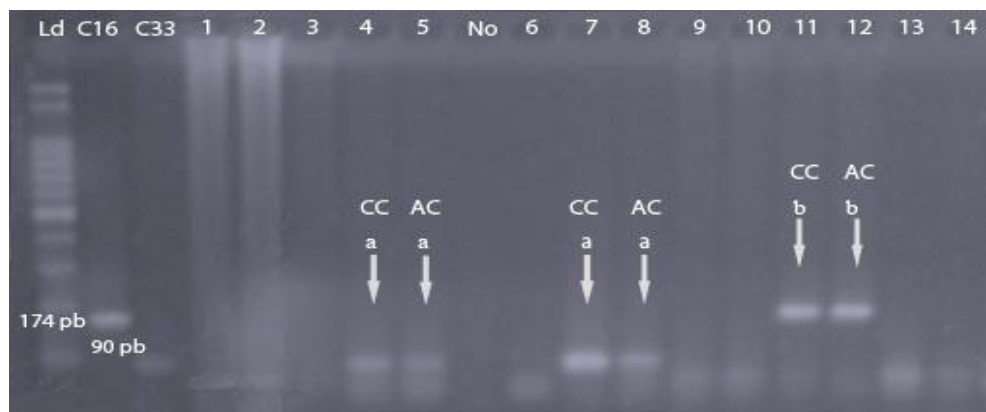
Nota: Ld: marcador de peso molecular 100 pb; C31: controle positivo para HPV31; No: controle negativo; Setas: amostras 6 e 7 positivas para HPV-31; CC: coleta clínica; AC: autocoleta.

Figura 7 – Resultado da PCR para detecção do HPV18 em amostras obtidas por coleta clínica e autocoleta em Campo Grande, MS – 2012. Gel de agarose a 2,5%.



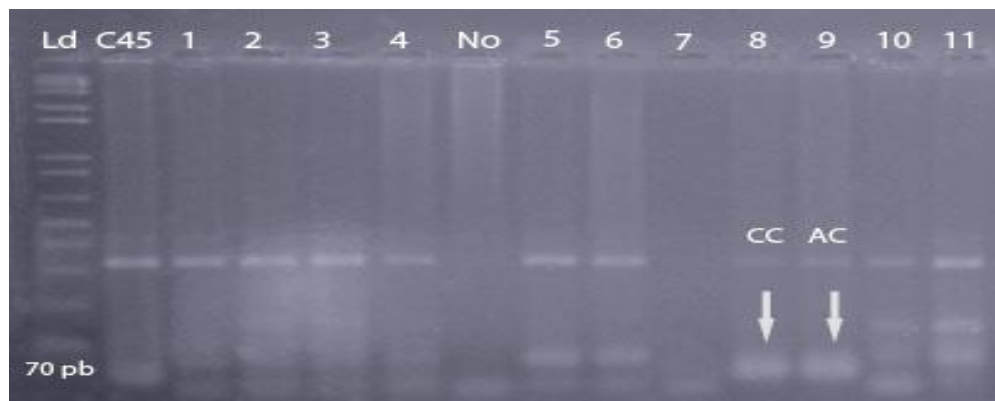
Nota: Ld: marcador de peso molecular 100 pb; C18: controle positivo HPV18; No: controle negativo; Setas: amostras 3 e 4 positivas para HPV-18; CC: coleta clínica; AC: autocoleta.

Figura 8 – Resultado da PCR para detecção do HPV16 e 33 em amostras obtidas por coleta clínica e autocoleta em Campo Grande, MS – 2102. Gel de agarose a 2,5%.



Nota: Ld: marcador de peso molecular 100 pb; C16: controle positivo HPV16; C33: controle positivo HPV33; No: controle negativo; Setas "a": amostras 4, 5, 7 e 8 positivas para HPV-33; Setas "b": amostras 11 e 12 positivas para HPV-16; CC: coleta clínica; AC: autocoleta

Figura 9 – Resultado da PCR para detecção do HPV45 em amostras obtidas por coleta clínica e autocoleta em Campo Grande, MS – 2012. Gel de agarose a 2,5%.



Nota: Ld: marcador de peso molecular 100 pb; C45: controle positivo para HPV45; No: controle negativo; Setas: amostras 8 e 9 positivas para HPV-45; CC: coleta clínica; AC: autocoleta.

O tipo viral de alto risco oncogênico mais frequente em ambos os métodos de coleta, foi o HPV16, presente em 6 (15,4%) amostras obtidas pela coleta clínica e também em 6 (13,3%) amostras obtidas pela autocoleta. O resultado da PCR HPV tipo-específico, segundo o método de coleta pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Tipos virais distribuídos segundo o método de coleta de amostras cervicovaginais, Campo Grande, MS – 2012

Tipos Virais	Coleta Clínica (n=39)	Autocoleta (n=45)
Alto risco		
45	3 (7,7%)	3 (6,7%)
18	4 (10,2%)	3 (6,7%)
31	4 (10,2%)	4 (8,9%)
33	5 (12,8%)	3 (6,7%)
16	6 (15,4%)	6 (13,3%)
Baixo risco		
6/11	8 (20,6%)	12 (26,7%)
Indeterminado	9 (23,1%)	14 (31,0%)
Total	39 (100%)	45 (100%)

A concordância entre os resultados da PCR para os tipos virais de baixo e alto risco oncogênico está representada na Tabela 4.

Demonstramos que entre as amostras obtidas pela autocoleta, detectou-se maior frequência de tipos virais de baixo risco oncogênico do que entre as amostras obtidas por coleta clínica, sendo 12 (23,5%) e 8 (15,7%), respectivamente ($p=0,78$; $n=51$). Com relação aos tipos de alto risco oncogênico, esses foram mais frequentes entre as amostras obtidas pela coleta clínica, com 17 (33,3%) amostras positivas, do que entre as obtidas pela autocoleta, com 14 (27,4%) amostras positivas ($p=0,55$; $n=51$).

Considerando a concordância de resultados entre os dois métodos de coleta para a positividade entre os diferentes tipos de HPV, os tipos virais de alto risco oncogênico foram concordantes em 14 (27,4%; $\kappa = 0,9$) amostras e entre os tipos de baixo risco oncogênico, 7 (13,7%, $\kappa= 0,6$) amostras foram completamente concordantes ($p=0,25$; $n=51$).

Tabela 4 – Concordância entre a detecção dos tipos virais de baixo e alto risco oncogênico em amostras obtidas por ambos os métodos de coleta em Campo Grande, MS – 2012

HPV	CC+/AC+	CC+/AC-	CC-/AC+	CC-/AC-	n	Conc. %	κ	McNemar
BR	7 (13,7%)	1 (1,9%)	5 (9,8%)	38 (74,5%)	51	88,2%	0,6	0,21
AR	14 (27,4%)	3 (5,9%)	-	34 (66,7%)	51	94,1%	0,9	0,25

Nota: BR: baixo risco oncogênico; AR: alto risco oncogênico; CC: coleta clínica; AC: autocoleta; +: positivo; -: negativo; % Conc: concordância entre os métodos; κ : kappa.

Considerando as 51 amostras positivas para HPV, a infecção por múltiplos tipos foi detectada em 8 (20,5%) amostras na coleta clínica e 7 (15,5%) na autocoleta, não houve associação significativa na detecção de múltiplos tipos de HPV entre as coletas ($p=0,38$). A maioria das infecções múltiplas foi por até dois tipos virais, além disso, 1 (2,6%) amostra foi positiva para 5 tipos virais e outra para 3 tipos. Ambos os resultados foram concordantes tanto pela coleta clínica como pela autocoleta.

Mesmo agrupado por risco oncogênico, não foi observada diferença estatística significativa para detecção de infecção por múltiplos tipos de HPV, considerando ambos os métodos de coleta. A frequência da infecção múltipla por HPV de baixo risco e alto risco oncogênico em amostras cervicovaginais está representada na Tabela 5.

Tabela 5 – Infecções por múltiplos tipos de HPV em amostras cervicovaginais obtidas por coleta clínica e autocoleta, Campo Grande, MS – 2012

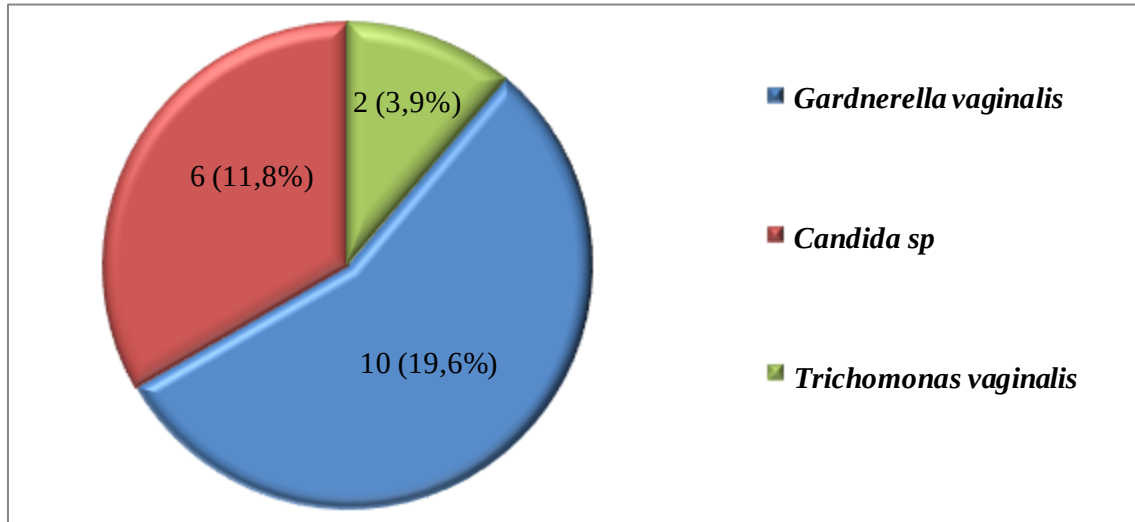
Tipos virais	Coleta Clínica (n=39)	Autocoleta (n=45)
Baixo risco + Baixo risco	1 (2,6%)	1 (2,2%)
Alto risco + Alto risco	2 (5,1%)	2 (4,4%)
Alto risco + Baixo risco	5 (12,8%)	4 (8,9%)

5.3 Coinfecção HPV e outros microorganismos

Entre as 170 mulheres participantes do estudo, em 24 (14,1%) foi detectado *Gardnerella vaginalis*, em 16 (9,4%) *Candida sp* e em 4 (2,4%) *Trichomonas vaginalis*. A infecção concomitante por HPV (n=51) e *Gardnerella vaginalis* foi observada em 10 (19,6%) mulheres, representando a coinfecção mais frequente entre as mulheres analisadas. Não houve associação significativa ($p=0,24$) em relação à coinfecção por HPV e outros microorganismos.

A frequência das coinfecções envolvendo HPV e outros microorganismos encontra-se na Figura 10.

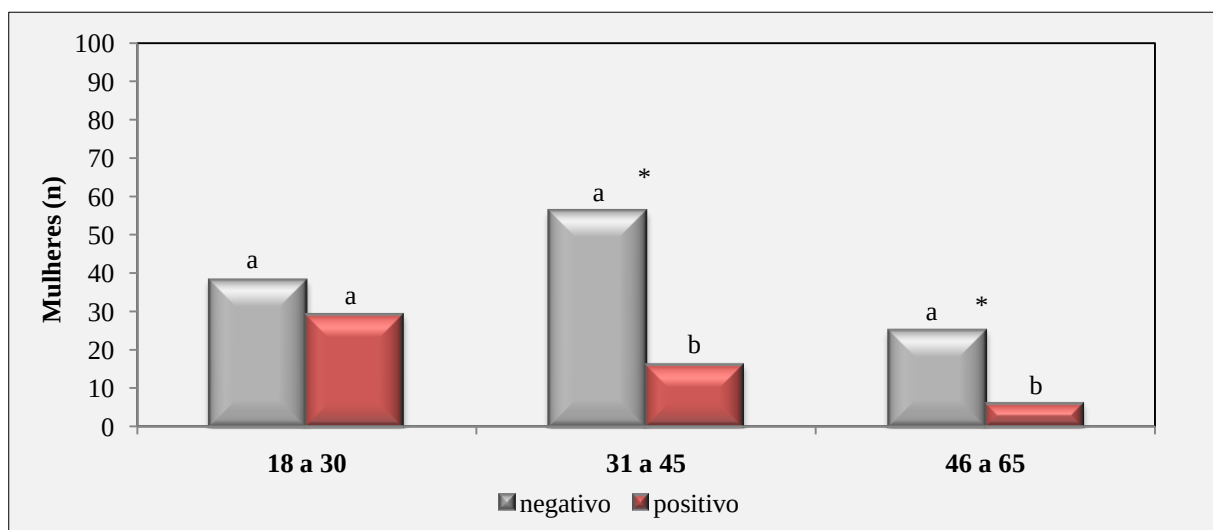
Figura 10 – Frequência de coinfeção por HPV e outros microorganismos em mulheres positivas para DNA de HPV, atendidas no setor de microbiologia do LABCEN, em Campo Grande, MS – 2012 (n=51)



5.4 Fatores de risco para infecção por HPV

Entre as participantes do estudo, observou-se menor frequência da infecção por HPV nas mulheres com mais de 30 anos (Figura 11).

Figura 11 – Distribuição das pacientes atendidas no setor de microbiologia do LABCEN de acordo com a presença de DNA de HPV e faixa etária em Campo Grande, MS – 2012 (n=170)



Nota: * faixas de idade com diferença significativa $\chi^2 = 9,37$; GL = 2; $p=0,009$; letras diferentes denotam diferença significativa entre cada grupo de faixa etária.

Na Tabela 6 observamos a relação estatística de outros fatores de risco para aquisição da infecção por HPV. As mulheres que relataram não usar métodos contraceptivos como contraceptivos orais, injeções hormonais ou DIU, tiveram maior chance de ser negativas para HPV (OR= 2,25; IC 95%: 1,12 - 4,49; p= 0,03). Do mesmo modo, a população que relatou não ingerir bebida alcoólica foi associada à proteção da infecção.

Tabela 6 – Fatores de risco para infecção por HPV segundo a presença do DNA de HPV em mulheres atendidas no LABCEN, Campo Grande, MS – 2012

Variável	HPV		χ^2	GL	p
	Positivo (n=51)	Negativo (n=119)			
Uso de preservativo					
Sim	31 (60,8%)	55 (46,2%)	3,03	1	0,11
Não	20 (39,2%)	64 (53,8%)			
Outros métodos Contraceptivos					
Não	29 (56,9%)	89 (74,8%)	5,40	1	0,03
Sim	22 (43,1%)	30 (25,2%)			
Álcool					
Sim	2 (4%)	2 (1,7%)	8,58	2	0,01
Não	26 (51%)	88 (74%)			
Às vezes	23 (45%)	29 (24,3%)			
Cigarro					
Sim	2 (3,9%)	10 (8,4%)	1,09	1	0,47
Não	49 (96,1%)	109 (91,6%)			
N ° parceiros em dois anos¹					
Nenhum	-	4 (3,4%)	1,80	2	0,40
Até 2	42 (87,5%)	103 (86,5%)			
Mais que 2	6 (12,5%)	12 (10,1%)			
N ° parceiros anterior aos dois anos²					
Nenhum	2 (4%)	4 (3,6%)	0,69	2	0,70
Até 2	35 (70%)	86 (76,1%)			
Mais que 2	13 (26%)	23 (20,3%)			
Idade do início das atividades sexuais¹					
11 a 14 anos	14 (33,3%)	28 (66,7%)	0,30	1	0,57
≥ 15	36 (28,8%)	89 (71,2%)			
DSTs					
Não	46 (90,2)	110 (92,4%)	0,23	1	0,62
Sim	5 (9,8%)	9 (7,6%)			

¹ 167 participantes responderam; ² 163 participantes responderam.

6 DISCUSSÃO

A eficiência do rastreamento do câncer cervical está essencialmente relacionada com a proporção da população que é atingida e com a eficácia do método de diagnóstico utilizado. Países desenvolvidos alcançaram a redução significativa do câncer cervical, pois tem ampla cobertura de prevenção, cuja execução é bem organizada. No entanto, mulheres negligenciadas pelos programas de prevenção tem o risco aumentado para desenvolvimento de neoplasia, e representam mais da metade das mulheres com câncer invasivo em países com pouca infraestrutura (KITCHENER; CASTLE; COX, 2006; KINNEY et al, 1998).

No presente estudo foi avaliada a concordância entre os métodos de autocoleta e coleta clínica para detecção de DNA do HPV. Em razão da alta porcentagem de amostras positivas para detecção de betaglobulina (99,4%), concluímos que a autocoleta permite a coleta de material suficiente para a detecção do DNA de HPV quando comparada à coleta clínica. Quanto à concordância dos resultados nas amostras obtidas por ambos os métodos, este mostrou-se satisfatório com 84,6% de concordância ($\kappa = 0,72$), semelhante ao estudo de Brink et al (2006), que foi de 87%, indicando que a autocoleta pode retratar a infecção por HPV na cérvix, se equiparando aos resultados da coleta realizada em ambulatório clínico.

Esses resultados concordantes para HPV são justificados pela presença de partículas virais ou fragmentos de DNA do vírus na vagina, em consequência da exfoliação de células infectadas da cérvix, ou do próprio epitélio vaginal estar infectado pelo HPV (BRINK et al., 2006). O tipo de ensaio utilizado na análise do DNA de HPV é outra variável relevante para a eficiência da triagem das amostras em ambos os métodos de coleta. Bhatla et al. (2009) alcançaram concordância de 93,6% entre as coletas e verificaram melhor acurácia do diagnóstico da PCR utilizando os *primers* PGMY09/11 em relação ao teste de captuta híbrida. A sensibilidade do método pode permitir que quantidades menores de amostra sejam detectadas com sucesso.

Apesar da escolha do ensaio de DNA de HPV ser determinante na sensibilidade do diagnóstico, o tipo de instrumento utilizado para coleta das células pode interferir no resultado. Lorenzato et al. (2002), conferiram que a autocoleta realizada com *swabs* não detectou 50% dos casos de câncer invasivo comparado à coleta clínica utilizando escova endocervical. No atual estudo, as coletas foram realizadas com a escova endocervical, tanto na autocoleta quanto na coleta clínica.

Gravitt et al. (2001) demonstraram que o bom desempenho da autocoleta também está relacionada com a ordem de coleta. A primeira amostra, coletada pela paciente, contém

células exfoliadas da cérvix e alta proporção de células da vulva/vagina. Tal fato pode ter influenciado o resultado desse estudo, uma vez que a autocoleta foi executada primeiro e na sequência realizou-se a coleta clínica.

Belinson et al. (2010) mostraram que se a amostragem vaginal não for coletada por completo, e for inapropriadamente obtida de áreas muito baixas, como vulva e ânus, a autocoleta terá poucas células por amostragem, com baixa carga viral. Orientamos as participantes para obter o máximo de amostra da região mais alta da vagina, sendo o procedimento ideal para melhor concordância da autocoleta com a coleta clínica.

Houve frequência semelhante entre as amostras positivas para DNA do HPV obtidas pela autocoleta e pela coleta clínica (26,5% *versus* 22,9%), o que indica que a infecção por HPV pode ser detectada tanto no epitélio vaginal como na endocérvice. Esse resultado defende a hipótese que a autocoleta pode ser útil como nova metodologia de amostragem na triagem do câncer cervical.

Quanto aos tipos de HPV obtidos entre as diferentes amostragens, a detecção de HPV de alto risco oncogênico foi mais comum na coleta clínica, por outro lado o HPV de baixo risco oncogênico esteve mais presente na autocoleta, porém não houve diferença estatística em ambos os casos. Provavelmente, os tipos oncogênicos de HPV possuem mecanismos de sobrevivência e produção viral diferentes dos tipos de baixo risco oncogênico. Quando o HPV de alto risco oncogênico infectar as células da cérvix, na zona de transição cervical, haverá maior susceptibilidade à carcinogênese. De outra forma, o HPV de baixo risco oncogênico, raramente produz anormalidades citológicas e tem preferência em infectar as células da vagina, onde o tecido é queratinizado (CASTLE et al., 2007).

Quando analisada a concordância entre os resultados de ambos os métodos de coleta, conforme o risco oncogênico do HPV, foi demonstrado que os tipos de alto risco oncogênico foram mais detectados do que os de baixo risco oncogênico (94,1% *versus* 88,2%, respectivamente). Esse fato estaria associado à escolha restrita, na metodologia dessa pesquisa, da identificação apenas do DNA de HPV dos tipos 6 e 11 por PCR tipo específico, uma vez que entre os tipos de baixo risco oncogênico são os tipos mais prevalentes (BROWN et al., 1999).

Entre os tipos de alto risco oncogênico a autocoleta não detectou os tipos HPV33 e HPV18 em 3 amostras, porém quando considerados os tipos de baixo risco oncogênico, a coleta clínica não identificou 5 amostras com HPV dos tipos 6/11, positivas somente na autocoleta. Houve concordância menor de HPV de baixo risco oncogênico entre as coletas, esse resultado está atribuído à alta proporção desses tipos em amostras obtidas pela

autocoleta, pois este método obtém mais células do canal vaginal, região de maior afinidade à infecção por HPV de baixo risco (CASTLE et al, 2007).

O HPV de alto risco oncogênico mais prevalente nesse estudo foi o HPV16, concordante igualmente em ambos os métodos de amostragem. Comparado a outros tipos de HPV, os carcinogênicos HPV16 e HPV18 conferem um risco aumentado em desenvolver lesões de alto grau (KOUTSKY et al., 1992). Mostramos boa representação de HPV de alto risco oncogênico na autocoleta, sendo assim, promissora como metodologia alternativa de diagnóstico. Além disso, pode ser útil em estudos epidemiológicos e na avaliação do impacto da vacina na população (PETGNAT et al., 2007).

A infecção por múltiplos tipos de HPV foi detectada em 8 (20,5%) amostras de coleta clínica e 7 (15,5%) da autocoleta, consistente com o estudo de Baldwin et al. (2005), que ressaltaram a importância da positividade de múltiplos tipos de HPV, por ser um fator de risco para infecções persistentes ou para desenvolver neoplasias cervicais. A análise longitudinal de Trottier et al. (2006), constatou que o risco de lesão aumenta com o número cumulativo de tipos de HPV e essa associação é forte em curto período de tempo. Desse modo, demonstramos que o método da autocoleta pode identificar, através das reações de PCR, DNA de HPV oncogênico, assim como infecções por múltiplos tipos.

A infecção por HPV é necessária, porém não é o suficiente para desenvolver o câncer cervical, outros cofatores endógenos e exógenos, em conjunto com o vírus, podem influenciar no risco de progressão da infecção por HPV até a neoplasia. Hormônios endógenos, fatores genéticos e a resposta imune são cofatores relacionados ao hospedeiro que estão associados à carcinogênese. Assim como, a infecção por tipos específicos de alto risco, coinfeção com outro tipo de HPV, a carga viral e a integração do vírus. Os cofatores exógenos que contribuem para aquisição, persistência e progressão da infecção, são por exemplo, o uso do contraceptivo oral, tabaco, alta paridade, e coinfeções com outros agentes sexualmente transmissíveis. (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

As infecções vaginais como vaginose bacteriana (VB), Candidíase vulvovaginal e tricomoníses podem ser diagnosticadas sem o uso do espécúlo (BLAKE et al., 1998). A infecção de outros microrganismos, coletados com *swab* na região vaginal, nas mulheres participantes deste estudo foram confrontados com o resultado do DNA de HPV. A coinfeção mais frequente entre as amostras HPV positivas foi a *Gardnerella vaginalis*, seguida de *Trichomonas vaginalis*, e em terceiro *Candida sp*, no entanto, não encontramos um aumento significativo de infecções por outros microorganismos em amostras positivas para HPV.

A importância da avaliação de coinfeções genitais, deve-se ao fato de que a mudança da microbiota vaginal e a redução dos microorganismos protetores poderia facilitar a sobrevivência de outros agentes sexualmente transmitidos, sendo um fator de risco para desenvolver infecções vaginais. A VB está relacionada com o predomínio de bactérias anaeróbicas como a *Gardnerella vaginalis*, e com a diminuição de *Lactobacillus*. Neste contexto, a VB provocaria um risco maior para adquirir ou reativar a infecção por HPV, porém essa questão ainda é controversa. Não está bem compreendido se a relação entre VB e infecção por HPV é devido a uma interação entre os agentes, ou porque ambas são infecções frequentes em mulheres sexualmente ativas. Há indícios de associação significativa entre a presença de VB e a infecção por HPV com *odds ratio* estimado em 1,43 (GILLET et al.,2011).

Achados que incluíam mulheres positivas e negativas para HIV, demonstraram que a VB foi associada com aumento do risco de infecção prevalente e incidente por HPV, porém não significativa na duração da infecção e no desenvolvimento de lesões cervicais. A infecção por *Trichomonas vaginalis* esteve associada com o aumento na incidência, mas diminuição na prevalência de infecção por HPV, e sua relação com a duração da infecção ou com lesões cervicais não foi significativa. Os autores sugeriram que a variação da microbiota vaginal tem efeitos importantes na história natural e na infecção por HPV (WATTS et al.,2005).

A *Candida albicans* é um fungo existente na microbiota vaginal de mulheres saudáveis, sendo o tipo mais prevalente em casos de colonização assintomática e de candidíase vulvovaginal associada com a inflamação. A associação de candidíase com a prevalência e incidência da infecção por HPV não é significativa, por outro lado a vaginose bacteriana pode predispor à infecção por HPV e atrasar a eliminação do vírus (KING et al., 2011).

Em nosso estudo, não houve relação significativa entre a infecção por HPV e outras infecções vaginais. Por ser uma pesquisa transversal, onde não há o acompanhamento da população, não foi possível averiguar se a infecção por HPV surgiu antes, durante ou após a presença destes outros microorganismos. Esse resultado pode ter sido subestimado, por tratar-se de dado secundário, em que o diagnóstico bacterioscópico foi concluído somente por um profissional, sendo a acurácia do observador crucial para detecção do microorganismo. Por esses motivos, dando seguimento, outro estudo realizará pesquisa dos microorganismos presentes nessas amostras através de ensaio molecular, cuja sensibilidade e especificidade é maior.

Nessa análise, a prevalência da infecção por HPV entre mulheres de 18 a 65 anos foi de 30% (51/170). Em relação a outro estudo, Karwalajtys e colaboradores (2006), constataram 20,8% de prevalência em mulheres com idade semelhante, assim notamos que houve significativa prevalência de infecção por HPV em amostra vaginal e cervical entre as mulheres atendidas no LABCEN, já que entre elas havia suspeita clínica de infecções vaginais.

Nesse estudo observou-se menor frequência de infecção por HPV em mulheres com idade maior que 30 anos. A idade é um fator de risco para aquisição da infecção por HPV, a maior parte das infecções por HPV ocorrem em mulheres mais jovens, logo após o início da atividade sexual e são na maioria transientes. As mulheres com mais de 30 anos, positivas para HPV, podem apresentar falhas para eliminar o vírus e representar o grupo de mulheres com infecção adquirida no passado e persistente, que por consequência têm alto risco de desenvolver neoplasia. Em contrapartida, a incidência do câncer cervical aumenta depois dos 30 anos e alcança um platô na idade entre 45-50 anos, provavelmente devido à persistência da infecção pelo mesmo tipo viral (BOSCH; DE SANJOSE, 2003).

Sabe-se que a especificidade do teste de DNA de HPV mostrou ser maior ou equivalente à citologia, quando analisado em mulheres maiores que 35 anos. A prevalência de HPV de alto risco oncogênico difere de acordo a faixa etária e é menos frequente em mulheres com mais idade (LINDELL et al., 2012). Assim, o rastreamento de câncer cervical através do DNA de HPV é mais recomendado para mulheres com idade maior que 30 anos, pois são mais susceptíveis às infecções persistentes (FRANCO, 2003).

O teste de DNA do HPV como triagem para detecção de lesão cervical tem maior valor preditivo positivo em detectar neoplasias cervicais de alto grau (NIC-II ou III) do que a citologia. Diante disto, a maior importância da citologia seria triar as mulheres que foram positivas no teste primário para DNA do HPV. Desta forma, evitaria a realização desnecessária da colposcopia e tratamento de mulheres com nenhuma ou mínima anormalidade citológica, e que poderiam estar com infecção transiente (CUZICK et al., 2008).

Neste estudo, houve frequência significativa de mulheres negativas para DNA de HPV, que relataram não usar métodos contraceptivos, como contraceptivo oral, injeção hormonal ou DIU. Isso sugere que, essas mulheres adotavam como método contraceptivo o uso do preservativo. Quando se considera o contraceptivo oral, sua administração por longo período, é um fator de risco para aquisição do HPV, sendo que mulheres que fazem seu uso tem menor chance de eliminar a infecção comparada àquelas que não usam hormônio contraceptivo (MARKS et al., 2011).

A eficiência do preservativo é limitada na redução da incidência de infecção por HPV, dado que sua transmissão é através de contato, e não somente pelo ato sexual. Winer e colaboradores (2006), em uma avaliação mais detalhada, observaram que as mulheres que se protegiam em 100% das vezes, tiveram 70% de chance a menos de adquirir infecção do que aquelas em que seus parceiros usavam preservativo somente em 5% das vezes. Assim, quando a utilização do preservativo for correta e consistente, protegerá contra infecção por HPV.

Em relação aos fatores comportamentais que facilitariam a infecção por HPV, a ingestão de bebida alcoólica está relacionada como fator de risco para aquisição da infecção (SIKSTRÖM et al., 1995). Em nossa análise, as mulheres que relataram não ingerir álcool tiveram menor chance de aquisição da infecção por HPV. A razão de tal fato seria que o uso em excesso do álcool poderia alterar a percepção psicológica dos atos, condicionando a comportamentos susceptíveis à infecção viral. Sugerimos que prevenir o consumo de bebida alcoólica seria um fator secundário protetor da infecção, por não promover conduta de risco.

Considerando-se os aspectos abordados neste estudo, relativos à eficiência dos métodos de obtenção de amostras para detecção de DNA de HPV, para a implementação da autocoleta, como método de escolha de triagem dessa infecção, será necessário que testes moleculares para diagnóstico sejam acessíveis. A identificação de DNA do HPV tem o potencial de aprimorar a eficácia no rastreamento do câncer cervical, além de representar maior custo-benefício. Nesta estratégia, o intervalo do preventivo pode ser prolongado a cada 3 anos comparado à utilização do Papanicolaou, feito anualmente (CHOW et al., 2010).

A mobilização da comunidade em direção aos programas de prevenção é um ponto crítico para a redução da mortalidade do câncer cervical. A técnica da autocoleta seria capaz de ampliar o atendimento da população para a prevenção do câncer. Para tanto, é fundamental o trabalho em equipe multidisciplinar para organizar, registrar e instruir a coleta das amostras. Os profissionais deverão ser treinados para entregar e interpretar os resultados positivos e negativos, fornecendo com eficiência o acompanhamento e tratamento apropriados para as mulheres com infecção por HPV. Assim, para reduzir a incidência do câncer cervical, é preciso a detecção e o tratamento precoce da infecção por HPV. Para isso, deve-se atingir no mínimo 70% da população feminina, levando-as a participar ao menos uma vez de programas de prevenção (GRAVITT et al., 2011).

O novo desafio futuro será integrar a triagem do câncer cervical com a incipiente programação de vacinação contra HPV. Em um longo período de tempo, a vacina reduzirá a doença induzida por HPV16/18, assim mais anormalidades citológicas serão falso positivas e mais infecções por HPV estarão relacionadas com outros tipos oncogênicos e com menor

risco oncogênico. Dessa maneira, a opção mais viável para o rastreamento primário será o teste de DNA ao invés da citologia. No entanto, será necessário descobrir o potencial progressivo dos outros tipos de HPV de alto risco oncogênico não incluídos na vacina (CUZICK et al., 2008).

Neste estudo, demonstramos que a autocoleta obteve boa concordância em comparação com a coleta clínica para detecção e determinação do tipo de HPV. A autocoleta, como estratégia de prevenção primária em países com poucos recursos, pode ser suficientemente eficaz para determinar HPV de alto risco. Por ser mais aceita, esse método alcançaria mais mulheres para os programas de rastreamento do câncer cervical, contribuindo significativamente para sua redução.

Nossa sugestão, como perspectiva para redução do câncer cervical em nosso país e sobretudo em nosso estado, é a revisão dos programas de prevenção com a implantação da autocoleta sob assistência dos Programas de Saúde da Família e dos métodos moleculares de diagnóstico do DNA de HPV pelos serviços de saúde. O custo adicional poderia ser recompensado pela maior cobertura do programa, reduzindo o número de casos a serem tratados e acompanhados pelo clínico e por um intervalo maior preconizado entre a triagem.

7 CONCLUSÕES

Foi observada concordância satisfatória entre os métodos de coleta de amostras de células cervicovaginais obtidas por autocoleta e por coleta clínica, para detecção de DNA do HPV.

O método da autocoleta foi suficientemente eficaz em identificar infecção por HPV de alto risco oncogênico comparada à coleta clínica, justificando o uso da autocoleta como metodologia alternativa em programas de prevenção do câncer cervical.

A prevalência de infecção por HPV encontrada no estudo foi significativa, com menor detecção de DNA do HPV entre mulheres com idade maior que 30 anos. Entre os tipos virais de alto risco oncogênico, o HPV16 foi o mais frequente.

A presença de infecções vaginais por microorganismos como *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* e *Trichomonas vaginalis*, não foram associadas com o aumento do risco da prevalência de infecção por HPV.

Observou-se menor frequência da infecção por HPV entre as pacientes com mais de 30 anos. O relato de não utilização de métodos contraceptivos, bem como a não ingestão de bebida alcóolica foram comportamentos associados a proteção contra a infecção pelo HPV.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abbas AK, Lichtman HA, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Ayres ARG, Silva GA. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. *Rev. Saúde Pública*. 2010 Out; 44(5): 963-974.

Baldwin S, Santos C, Mendez Brown E, Nuño T, Giuliano A, Davis J, et al. Comparison of type-specific human papillomavirus data from self and clinician directed sampling. *Gynecol Oncol*. 2005 May; 97(2): 612-7.

Barcelos AC, Michelin MA, Adad SJ, Murta EF Atypical squamous cells of undetermined significance: Bethesda classification and association with Human Papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2011: 904674.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005 Mar; 32 Suppl 1: S16-24.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*. 1991 Jan; 265(4): 472-7.

Belinson JL, Hu S, Niyazi M, Pretorius RG, Wang H, Wen C, et al. Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: Implications for vaginal self-collection. *Int J Cancer*. 2010 Sep; 127(5): 1151-7.

Beutner KR, Wiley DJ, Douglas JM, Tyring SK, Fife K, Trofatter K, et al. Genital warts and their treatment. *Clin Infect Dis*. 1999 Jan; 28 Suppl 1: S37-56.

Bhatla N, Dar L, Patro AR, Kumar P, Kriplani A, Gulati A, et al. Can human papillomavirus DNA testing of self-collected vaginal samples compare with physician-collected cervical samples and cytology for cervical cancer screening in developing countries? *Cancer Epidemiol.* 2009 Dec; 33(6): 446-50.

Bhatla N, Moda N. The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. *Indian J Med Res.* 2009 Sep; 130(3): 261-5.

Blake DR, Duggan A, Quinn T, Zenilman J, Joffe A. Evaluation of vaginal infections in adolescent women: can it be done without a speculum? *Pediatrics.* 1998 Oct; 102(4 Pt 1): 939-44.

Bodily J, Laimins LA. Persistence of papillomavirus infection: key to malignant progression. *Trends Microbiol.* 2011 Jan; 19(1): 33-9.

Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31): 3-13.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun; 87(11): 796-802.

Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Research.* 2002 Nov; 89(2): 183-190.

Bosh FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr; 55(4): 244-65.

Brink AA, Meijer CJ, Wiegerinck MA, Nieboer TE, Kruitwagen RF, van Kemenade F, et al. High concordance of results of testing for human papillomavirus in cervicovaginal samples collected by two methods, with comparison of a novel self-sampling device to a conventional endocervical brush. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul; 44(7): 2518-23.

Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol*. 1999 Oct; 37(10): 3316-22.

Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010 Dec; 202(12): 1789-99.

Buck CB, Cheng N, Thompson CD et al. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. 2008 Jun; 82(11): 5190-7.

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

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000 Jun; 181(6): 1911-9.

Carvalho MOO, Carestiato FN, Perdigão PH, Xavier MPPT, Silva KC, Botelho MO, et al. Human Papillomavirus Infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective Study. *BJID*. 2005 Oct; 9(5): 398-404.

Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003 Jun; (31): 20-8.

Castle PE, Rodriguez AC, Porras C, Schiffman M, Herrero R, Gonzalez P, et al. A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus. *Sex Transm Dis*. 2007 Nov; 34(11): 849-55.

Chow IH, Tang CH, You SL, Liao CH, Chu TY, Chen CJ, et al. Cost-effectiveness analysis of human papillomavirus DNA testing and Pap smear for cervical cancer screening in a publicly financed health-care system. *Br J Cancer*. 2010 Dec; 103(12): 1773-82.

Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008 Aug; 26 Suppl 10: K29-41.

Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine*. 2006 Aug; 24 Suppl 3: S3/90-7.

De Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*. 2004 Aug; 64(15): 5449-55.

De Villiers ME, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun; 324(1): 17-27.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006 May; 110(5): 525-41.

Dunn AE, Ogilvie MM. Intranuclear virus particle in genital wart tissue: observation on the ultrastructure of the epidermal layer. *J Ultrastructure Research*. 1968; 22: 282-95.

Dunne EF, Markowitz LE. Genital human papillomavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2006 Sep; 43(5): 624-9.

Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003 Aug; 22(33): 5201-7.

Ferraz LC, Santos ABR, Discacciati MG. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *J Health Sci Inst*. 2012 Abr-Jun; 30(2): 107-11.

Franco EL. Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31): 89-96.

Garland SM. Imiquimod. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Apr; 16(2): 85-9.

Genther Willians SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threaldgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncoprotein. *Cancer Res.* 2005 Aug; 65(15): 6534-42.

Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011 Jan; 11: 10.

Giriani VR, Thuler LCS, Silva GA. Prevalência de HPV em mulheres assistidas pela estratégia saúde da família na Baixada Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2010 Jan; 32(1): 39-46.

Gissmann L, Zur Hausen H. Human papillomavirus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci.* 1976 Apr; 73(4): 1310-3.

Gravitt PE, Belinson JL, Salmeron J, Shah KV. Looking ahead: a case for human papillomavirus testing of self-sampled vaginal specimens as a cervical cancer screening strategy. *J Cancer.* 2011 Aug; 129(3): 517-27.

Gravitt PE, Lacey JV, Brinton LA, Barnes WA, Kornegay JR, Greenberg MD, et al. Evaluation of self-collected cervicovaginal cell samples for human papillomavirus testing by polymerase chain reaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Feb; 10(2): 95-100.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan; 38(1): 357-61.

Green M, Brackmann KH, Sanders PR, et al. Isolation of a human papillomavirus from a patient with epidermodysplasia verruciformis: Presence of related viral DNA genomes in human urogenital tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 1982 Jul; 79(14): 4437-41.

Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol.* 2007 Feb; 20(2): 256-66.

Haws ALF, He Q, Rady PL, et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*. 2004 Dec; 122(1): 87-93.

Heck DV, Yee CL, Howley PM, Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 May; 89(10): 4442-6.

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998 Feb; 338(7): 423-428.

Igidbashian S, Boveri S, Spolti N, Radice D, Sandri MT, Sideri M. Self-collected human papillomavirus testing acceptability: comparison of two self-sampling modalities. *J Womens Health*. 2011 Mar; 20(3): 397-402.

Isenberg HD. *Essential procedures for clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 1998.

Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa/2012 – Incidências de Câncer no Brasil*. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2011. [acesso em 16 de outubro de 2012]. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2012/

International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon: IARC; 2007: vol. 90

International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon: IARC; 1995: vol. 64.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr; 61(2): 69-90.

Jo H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy*. 2005 Oct; 3: 419-434.

Karwalajtys T, Howard M, Sellors JW, Kaczorowski J. Vaginal self sampling versus physician cervical sampling for HPV among younger and older women. *Sex Transm Infect.* 2006 Aug; 82 (4): 337-9.

Kahn JA, Bernstein DI, Rosenthal SL, Hung B, Kollar LM, Colyer JL, et al. Acceptability of human papillomavirus self testing in female adolescents. *Sex Transm Infect.* 2005 Oct; 81(5): 408-14.

Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul; 97(14): 1072-9.

Khanna N, Mishra SI, Tian G, Tan MT, Arnold S, Lee C, et al. Human papillomavirus detection in self-collected vaginal specimens and matched clinician-collected cervical specimens. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 May-Jun; 17(3): 615-22.

King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011; 2011: 319460.

Kinney W, Sung HY, Kearney KA, Miller M, Sawaya G, Hiatt RA. Missed opportunities for cervical cancer screening of HMO members developing invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1998; 71(3): 428-30.

Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine.* 2006 Aug; 24 Suppl 3: S3/63-70.

Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med.* 1992 Oct 29; 327(18): 1272-1278.

Lindell M, Sanner K, Wikström I, Wilander E. Self-sampling of vaginal fluid and high-risk human papillomavirus testing in women aged 50 years or older not attending Papanicolaou smear screening. *BJOG*. 2012 Jan; 119(2): 245-8.

Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol* 2009 Winter; 2(1): 28-37.

Lorenzato FR, Singer A, Ho L, Santos LC, Batista RdeL, Lubambo TM, et al. Human papillomavirus detection for cervical cancer prevention with polymerase chain reaction in self-collected samples. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 May; 186(5): 962-8.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 2006 May; 116(5): 1167-73.

Manhart A, Koutsky LA. Do condoms prevent HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? *Sex Trans Dis*. 2002 Nov; 9(11): 725-35.

Mantovani F, Banks L. The interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin Cancer Biol*. 1999 Dec; 9(6): 387-95.

Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, et al. Combined oral contraceptive use increases HPV persistence but not new HPV detection in a cohort of women from Thailand. *J Infect Dis*. 2011 Nov; 204(10): 1505-13.

Motoyama S, Ladines Llavies CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004 Jan; 50(1): 9-19.

Münger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989 Oct; 63(10): 4417-21.

Muñoz N, Bosh FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated. *N Engl J Med*. 2003 Feb; 348(6): 518-527.

Nakagawa M, Stites DP, Farhat S, Sisler JR, Moss B, Kong F, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis*. 1997 Apr; 175(4): 927-31.

Nakagawa M, Stites DP, Palefsky JM, Kneass Z, Moscicki AB. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Jul; 6(4): 494-8.

Naucner P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct; 357(16): 1589-97.

Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev. Saúde Pública*. 2002 Fev; 36(1): 95-100.

Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, et al. Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol*. 2012 Jul; 84(7): 1128-34.

Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis*. 1971 Feb; 47(1): 1-13.

Petignat P, Faltin DL, Bruchim I, Tramèr MR, Franco EL, Coutlée F. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? *Gynecol Oncol*. 2007 May; 105(2): 530-5.

Rama CH, Martins CM, Derchain SFM, Longato-Filho A, Gontijo RC, Sarian LO, et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev Saúde Pública*. 2008 Fev; 42(1): 123-130.

Roteli-Martins CM, Longatto Filho A, Hammes LS, Derchain SFM, Naud P, Matos JC, et al. Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. *Rev Bras Ginecol Obstet, Brasil*. 2007 Nov; 29(11): 578-587.

Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med*. 2009 Apr; 360(14): 1385-94.

Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Sep; 6(5): 751-55.

Sellers JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*. 2003 Feb; 168(4): 421-5.

Shope RE, Hurst EW. Infectious Papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *J Exp Med*. 1933 Oct; 58(5): 607-24.

Sikström B, Hellberg D, Nilsson S, Mårdh PA. Smoking, alcohol, sexual behaviour and drug use in women with cervical human papillomavirus infection. *Arch Gynecol Obstet*. 1995; 256(3): 131-7.

Silva AM, Cruz AD, Silva CC, Borges FR, Curado MP. Genotipagem de papiloma vírus humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. *Rev Bras Cancerol*. 2003; 49(3): 167-74.

Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb; 93(4): 293-9.

Souto R, Falhari JPB, Cruz AD. O Papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Rev Bras Cancerol*. 2005; 51(2): 155-160.

Sowjanya AP, Paul P, Vedantham H, Ramakrishna G, Vidyadhari D, Vijayaraghavan K, et al. Suitability of self-collected vaginal samples for cervical cancer screening in peri-urban villages in Andhra Pradesh, India. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 May; 18(5): 1373-78.

Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer.* 2010 Oct; 5(19): 1-6.

Stanley MA. Immune response to human papilloma viruses. *Indian J Med Res.* 2009 Sep; 130(3): 266-76.

Strauss MJ, Shaw EV, Bunting H, Melnick JL. "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949 Oct; 72(2): 46-52.

Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 1999 Dec; 9(6): 379-86.

Tozetti IA, Scapulatempo IDL, Kawski VL, Ferreira AW, Levi JE. Multiple types of human papillomavirus in women in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2006 Oct; 10(5): 309-10.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jul; 15(7): 1274-80.

Veldman T, Horikawa I, Barrett C, Schlegel R. Transcription activation of telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.* 2001 May; 75(9): 4467-72.

Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer.* 2006 Dec; 95(11): 1459-66.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX; Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999 Sep; 189(1): 12-19.

Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, Glesby M, et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis.* 2005 Apr; 191(7): 1129-39. Errata em: *J Infect Dis.* 2005 Sep; 192(5): 943.

Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.* 2006 Mar; 106(3 Suppl 1): S2-8.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990 Apr; 248(4951): 76-9.

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV information centre). Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Summary Report 2010. [acessado em 3 de setembro de 2012]. Disponível em: www.who.int/hpvcentre/en/

Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 2006 Jun; 354(25): 2645-54.

Wolschick NM, Consolaro MEL, Suzuki LE, Boer CG. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *Rev Bras Anal Clin.* 2007 abr-jun; 39(2): 123-9.

Yamamoto LSU, Alves VAF. Histórico. In: Bibbo, M.; Moraes Filho, A. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. *Revinter.* 1998. p. 1-2.

Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976 Feb; 36(2 pt 2): 794.

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO LABCEN**Declaração da Autorização**

O Projeto de pesquisa “Eficiência dos métodos convencional e de autocoleta, de células da cérvix uterina e canal vaginal, para a detecção de DNA de Papilomavírus humano”, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste da UFMS, tem como ênfase o estudo da concordância entre os diferentes tipos de coleta para o diagnóstico do vírus HPV. A coordenadoria do Laboratório Central Municipal de Campo Grande autoriza a realização da coleta de células da cérvix uterina e do canal vaginal com escova endocervical nas pacientes encaminhadas para a coleta de secreção vaginal no LABCEN, e o acesso dos resultados da Bacterioscopia da secreção vaginal realizada no setor de Microbiologia.

Beatriz A. O. Santini
Farmacêutica - Bioquímica
CRF - MS 1.342
Coordenadora do Laboratório de Laboratório
Secretaria Municipal de Saúde Pública

Coordenadoria do LABCEN

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO nº 2172



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa / CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 2172 CAAE 0223.0.049.000-11 da Pesquisadora Karla Lopes Mandu de Campos intitulado "Eficiência dos métodos de coleta convencional e de autocoleta, de células da cérvix uterina e canal vaginal para detecção do DNA de Papilomavírus Humano", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 25 de agosto de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Ernesto Antônio Figueiró Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 29 de agosto de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS CONVENCIONAL E DE AUTO-COLETA, DE CÉLULAS DA CÉRVIX UTERINA E CANAL VAGINAL, PARA A DETECÇÃO DE DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO”

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado, com o objetivo de melhorar o diagnóstico e tratamento da infecção por Papilomavírus humano. Todos os dados obtidos neste estudo, inclusive o resultado, serão sigilosos, sendo utilizados apenas para fins de pesquisa jamais associados a sua identidade, e necessários para compreensão dos mecanismos de transmissão do vírus. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____ (somente iniciais do nome) concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário do estudo “Eficiência dos métodos convencional e de autocoleta, de células da cérvix uterina e canal vaginal, para a detecção de DNA de Papilomavírus humano”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- 1) O estudo se faz necessário para que se possa melhorar o diagnóstico da infecção por Papilomavírus humano, bem como prevenir de forma mais eficaz o câncer de colo do útero.
- 2) Após meu consentimento será realizada a coleta da secreção vaginal com utilização de espéculo pelo método tradicional e através da autocoleta com escova cervical, seguros e necessários para identificar o vírus e tratamento sem nenhum risco e com mínimo de desconforto possível.
- 3) A participação neste projeto não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêutico efetuados, e estou ciente que não receberei nenhuma forma de pagamento pela minha participação neste estudo.
- 4) O preenchimento de um questionário com dados subsidiários ao estudo;
- 5) O seu consentimento para utilizarmos o resultado do exame bacterioscópico feito no LABCEN.
- 6) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação,
- 7) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final da pesquisa;
- 8) O benefício por mim recebido se resumirá na obtenção de diagnóstico preciso da infecção por Papilomavírus humano, resultando em tratamento mais adequado;
- 9) Se houver dúvida por sua parte sobre seus direitos como participante da pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo telefone 3345-7187.
- 10) Posso deixar de responder um ou mais quesitos do Questionário, devido constrangimento ou por livre vontade.

Este documento será confeccionado em 2 vias, uma via ficará com o participante e a outra sob a guarda do pesquisador.

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa

Campo Grande, ____ de _____ de ____

Paciente: _____

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____

Laboratório de Imunologia da UFMS DPA/CCBS: (67) 3385-7388

APÊNDICE B – FOLHETO EXPLICATIVO

A infecção:

❖ Estima-se que 50 a 75% das pessoas sexualmente ativas podem entrar em contato com um ou mais tipos do vírus em algum momento de sua vida. Geralmente o sistema imunológico, através de nossos mecanismos de defesa, elimina o vírus, e a infecção não progride.

Formas de transmissão:

❖ O vírus é sexualmente transmitido e acomete tanto homens como mulheres. Objetos com a presença do vírus, tais como toalhas, roupas íntimas também são meios de transmissão.

Formas de prevenção:

❖ Usar preservativos;
❖ Não compartilhar roupas íntimas, toalhas e outros objetos pessoais.
❖ Consultar regularmente o ginecologista fazendo exames preventivos.
❖ Vacinar contra HPV, antes da primeira relação sexual.

O que é o HPV?

O **Papilomavírus humano (HPV)** é um vírus com cerca de 230 tipos diferentes que podem causar:

❖ Verrugas em mãos, pés, e região genital, causadas por tipos virais conhecidos como "baixo risco" oncogênico - raramente levarão ao surgimento de câncer.
❖ Câncer do colo do útero, vulva, ânus e pênis, causados por tipos de "alto risco" oncogênico.

O câncer de colo de útero:

❖ É a segunda causa mais comum de câncer em mulheres. A maioria das infecções por HPV são assintomáticas e curam sem tratamento. Porém, em alguns casos a infecção persiste por muitos anos, causando anormalidade celular, aumentando o risco de mulheres desenvolverem o câncer.

APOIO



Projeto de pesquisa:

"Eficiência dos métodos de coleta convencional e de autocoleta da cérvix uterina e canal vaginal para detecção do DNA de Papilomavírus humano"

OBJETIVO

❖ Avaliar a eficiência do método de coleta convencional e de auto coleta para secreção vaginal.

Este estudo é inédito em nosso estado.

Permitirá que estratégias de diagnóstico e prevenção, já estabelecidas pelos órgãos de saúde, sejam adequadas a nossa região.

Sua participação é fundamental para a realização deste estudo.

Muito Obrigada !!!

Instruções para a coleta de material para pesquisa de HPV

1) A COLETA DE AMOSTRA DEVE SER FEITA ANTES OU APÓS O PERÍODO MENSTRUAL



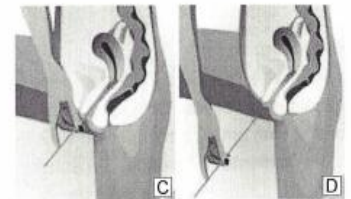
2) Escolha uma posição confortável para você que pode ser sentada, em pé ou deitada.



3) a) Posicione a escova entre os dedos como indicado na figura, com as cerdas para cima.

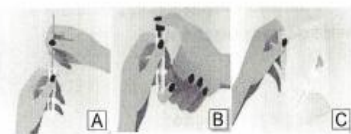


b) Com a outra mão afaste as dobras de pele dos grandes e pequenos lábios, para abrir o canal vaginal.



C) Alinhe a escova com o canal vaginal, para evitar desconforto, e a introduza gentilmente no canal. Gire a escova, no mesmo sentido, pelo menos cinco vezes.

d) Retire a escova gentilmente, evitando tocas nas paredes da vagina. Não toque na escova e nem permita que ela encoste em outros objetos como as roupas e etc.



4) a) Coloque a escova dentro do tubo de transporte. Quebre a haste no ponto pré indicado (não quebre a haste fora do tubo).

b) Tampe o frasco e (c) coloque na embalagem plástica.

d) Entregue no local combinado.

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO Nº _____

1- Qual sua idade? _____

2- Informações sobre seu nível de escolaridade:

- ☐ Ensino Fundamental completo ☐ Ensino Fundamental Incompleto
☐ Ensino Médio Completo ☐ Ensino Médio Incompleto
☐ Ensino Superior Completo ☐ Ensino Superior Incompleto

3- Você já iniciou sua vida sexual?

- ☐ Sim ☐ Não

4- Com que idade iniciou a vida sexual? _____

5- Qual o número de parceiros nos últimos 2 anos? _____

6- Qual o número de parceiros anteriormente aos 2 anos? _____

7- Usa preservativo durante a relação sexual?

- ☐ sim, com frequência ☐ não ☐ às vezes

8- Têm ou teve histórico de doença sexualmente transmissível?

- ☐ sim Qual? _____
☐ não

9- Você faz uso contraceptivo hormonal?

- ☐ Sim ☐ Não

10- Você faz uso de tabaco?

- ☐ sim ☐ não

11- Você faz uso de álcool

- ☐ sim ☐ não ☐ às vezes

12- Você já realizou exame citológico? (Preventivo ou Papanicolau)

- ☐ Sim ☐ Não

13- Com que Frequência você realiza o exame citológico:

- ☐ 01 X ao ano
☐ menos de 01 X ao ano
☐ mais de 01 X ao ano