

LUIZA DAURA FRAGOSO DE BARROS

**INFECÇÃO GENITAL PELO HPV EM ADOLESCENTES
DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR.**

**MACEIÓ
2006**

LUIZA DAURA FRAGOSO DE BARROS

**INFECÇÃO GENITAL PELO HPV EM ADOLESCENTES
DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Mestrado da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do Título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Saúde da Criança, do Departamento de Toco-Ginecologia e Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. José Elias Soares da Rocha.

Maceió

2006

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mestranda: LUIZA DAURA FRAGOSO DE BARROS

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ELIAS SOARES DA ROCHA

Membros:

1. Profa. Dra. Terezinha Tenório da Silva

2. Profa. Dra. Carmen Ramos Pereira

3. Prof. Dr. José Elias Soares da Rocha

**Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança do
Departamento de Tocoginecologia e Pediatria da
Universidade Federal de Alagoas**

Data: 13/07/2006

Dedicatória

Para a *Profa. Maria das Vitórias Pontes de Miranda* (*in memoriam*), meu primeiro referencial na prevenção do câncer ginecológico, a que me conduziu à Docência e apresentou-me às Sociedades Médicas da Especialidade.

Para os meus pais, *Luiz Fragoso e Daura*, pelas lições de dignidade, perseverança e fé no porvir.

Para o meu esposo, *Sálvio Tadeu*, cuja resistência devolveu-me o vôo e cuja presença viabilizou a realização deste projeto.

Para meus filhos, *Ana Luiza, Janine, Sálvio Luiz, Luívia, Tales e Anderson*, pelos laços de sangue e de afeto, que muito contribuíram para a minha superação de limites.

Para minha estimada amiga, *Luzia Magdadena* (*in memoriam*), pela fortaleza em que se transformou ao defender seus mais elevados valores humanos.

Agradecimentos Especiais

foi

Ao Prof. Doutor José Elias Soares da Rocha,
cuja orientação segura e laboriosa,
com profissionalismo e bom senso,

fundamental para a concretização desta
conquista gratificante.

Agradecimientos

A **Deus**, por todos os privilégios em me conceder a oportunidade dessa experiência, confirmando a cada dia ser Ele o meu porto seguro.

Ao **Prof. Doutor Carlos Eduardo Ramalho Neto**, pela orientação desta pesquisa laboratorial e valiosa contribuição na área de Biotecnologia.

À **Profa. Dra. Denise Wanderlei Silva**, pelo acompanhamento deste trabalho, aulas de Bioinformática, pelo estímulo e colaboração efetiva para alcançarmos este objetivo.

À **Carmem Regina Nogueira de Carvalho**, por compartilhar dessa trilha e fidelidade aos princípios éticos da amizade.

À **Angelina Maia, Ana Katherine, Ana Brito, Isabel do Val, Ana Claire, Sílvio Chagas, Maria Almeida e Antonio Carlos**, pela cortesia e espontânea colaboração.

À **Marilúcia, Helenice, Suely, Mary, Edson Ataíde, Hélvio Auto Filho, Maria José Costa**, enfermeiras, assistente social e médicos dos Postos Municipais de Saúde – Bebedouro, Salgadinho, Virgem dos Pobres e do Programa de Saúde da Família, meu reconhecimento pelo companheirismo

À **Rosa Gonzaga, Lusia, Luciana, Flávia e Jane**, as mestras, e **Velber e Marília, Pablo e Luiza**, alunos de Genética e de Medicina, pela colaboração indispensável no meu caminhar neste espaço biotecnológico.

Aos **Colegas do Mestrado**, por cada estímulo, por cada troca sincera, meu respeito e reconhecimento.

Aos **Colegas de Profissão, alunos e pacientes**, que tanto incentivaram a continuidade deste trabalho, alento maior nos momentos de aridez.

A todo **Corpo Docente do Mestrado de Saúde da Criança da UFAL**, que constituem exemplos particulares de construção do ser.

A **cada menina-mulher**, por me creditar confiança de penetrar na sua realidade, desafiar-me a participar da sua luta e, antecipadamente, retribuir-me com significantes aprendizados.

"O pássaro só voa graças à resistência do ar".
Nguyen van Nghi.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi para diagnosticar e classificar o papilomavírus humano (HPV) em adolescentes grávidas e não grávidas, bem como estudar os fatores de risco para a infecção, identificar os diversos tipos oncogênicos presentes na população estudada e associar os diferentes tipos de HPV com achados da citologia e colposcopia. Desenho metodológico: o tipo de estudo foi prospectivo, descritivo e de coorte transversal. Foram estudadas 111 adolescentes sexualmente ativas, entre 10 e 19 anos, atendidas no Serviço de Ginecologia do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL). Utilizou-se a reação de polimerase em cadeia/polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição - sequenciamento (PCR/RFLPs), para a identificação do vírus. Resultados: o percentual do vírus no trato genital inferior foi de 27%. A genotipagem molecular revelou material genético viral de alto risco - HPV 16, 33, 51, 58, 66, 1S39, CP8304 e LVX100, em 28.5% dos casos, enquanto que os de baixo risco oncogênico - HPV 6b, 11, 53, 61 e CP141, em 40%. Os demais 31,4%, foram do tipo considerado indeterminado, que incluem vírus de alto e baixo risco. Esse tipo mais incidente encontra-se isolado ou associado a outros tipos virais e aparece em 40% do total dos casos positivos. A taxa de infecção viral entre as gestantes foi de 11,7%. A infecção genital pelo HPV teve associação com o passado de doenças sexualmente transmissíveis e com o consumo de álcool pela adolescente. A frequência de adolescentes infectadas pelo HPV, associada à lesão intra-epitelial de baixo grau foi de 5,0%. Não foram observadas associações tipo-específicas do HPV com os achados da citologia e da colposcopia entre as adolescentes estudadas.

Abstract

The present study was to diagnose and classify the Human Papilloma Virus (HPV) in pregnant and non-pregnant adolescents, as study the risk factors related to the infection, identify the multiples oncogenics types presents in the study people and associate the differents types of HPV with cytology and colposcopy findings. Methodologic design: the type of study was prospective, descriptive and transversal coorte. Was study 111 sexually active adolescents, between 10 and 19 years old, patients of the Gynecology Service of the Professor Alberto Antunes University Hospital of the Federal University of Alagoas (HUPAA-UFAL). Was utilized the polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphism - sequencing (PCR/RFLPs) to identification of the virus. Results: the viral percentual in the inferior genital tract was 27% of the cases. The molecular genotyping revealed high risk viral genetic material - HPV 16, 33, 51, 58, 66, 1S39, CP8304 and LVX100, in 28,5% of the cases, low oncogenic risk - HPV 6, 11, 53, 61 e CP141, in 40% and, the other 31,4%, considered the indeterminate type, include high and low risk virus. This more incident type is found isolated or associated to other viral types and appears in 40% of the positive cases. The viral infection rate among the pregnant adolescents was 11,7%. The HPV genital infection was associated with a past of sexually transmitted diseases and the consumption of alcohol by the adolescent. The frequency of adolescents infected by HPV, associated to low grade intraepithelial lesion, was 5,0%. No associations were observed between the specific types of HPV and the cytology and colposcopy findings among the studied adolescents.

Resumé

L'objectif de cette étude a été, premièrement, de diagnostiquer et de classer le papillomavirus humain (HPV) en adolescentes enceintes et non enceintes ; deuxièmement, d'étudier les facteurs de risque d'infection ; troisièmement, d'identifier les multiples types oncogéniques présents dans la population étudiée et, quatrième, d'associer les différents types d'HPV avec les trousses de la cytologie et de la colposcopie. Dessin méthodologique : le type de l'étude a été prospectif, descriptif et de courte transversal. Ont été étudiées 111 adolescentes sexuellement actives, âgées entre 10 et 19 ans, qu'ont été examinées dans le Service de Gynécologie de l'Hôpital Universitaire Prof. Alberto Antunes de l'Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL). A été employée la Polymerase Chain Reaction (PCR) et le Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) – sequencing (s), pour identifier le virus. Résultats : la présence de l'HPV ont été observées en 27% des patientes. La génotypage moléculaire a accusé la présence du matériel génétique viral de haut risque d'oncogenèse – HPV 16, 33, 51, 58, 66, 1S39, CP8304 et LVX100 en 28,5% des patientes et celui de bas risque - HPV 6, 11, 53, 61 e CP141 en 40% des patientes. Environ 30,6% des cas ont été des virus indéterminés y incluses ceux d'haute et de bas risque. Ce dernier type, plus fréquent, on le trouve isolé ou associé à d'autres types viraux et on le constate dans 40% des cas positifs. Le taux d'infection viral parmi les enceintes a été de 11,7%. L'infection viral par l'HPV est associée avec l'histoire des maladies sexuellement transmissibles et avec la consommation d'alcool par les jeunes filles. L'association entre lésion intra-épithéliale de bas degré et l'infection par l'HPV a été trouvée en 5,0%. On n'a pas constatée l'association entre les différents types d'HPV avec les trousses de la cytologie et la colposcopie parmi les adolescentes étudiées.

Sumário

	Pág.
LISTA DE TABELAS _____	xx
LISTA DE GRÁFICOS _____	xxi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES _____	xxii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS _____	xxiv
I - INTRODUÇÃO _____	2
II - OBJETIVOS _____	12
III - CASUÍSTICA E MÉTODO _____	14
TIPO DE ESTUDO _____	14
CASUÍSTICA _____	14
METODOLOGIA _____	14
PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS _____	22
IV - RESULTADOS _____	24
V - DISCUSSÃO _____	40
VI - CONCLUSÕES _____	50
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	53
APÊNDICES _____	70
ANEXOS _____	87

Listas

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Distribuição de frequência relativa das adolescentes testadas para HPV com história de DST prévia.	29
Tabela 2 - Distribuição da frequência dos casos DNA-HPV positivos X DST prévia	30
Tabela 3 - Distribuição da frequência das pacientes testadas para HPV , segundo o meio contraceptivo utilizado.	31
Tabela 4 - Distribuição da frequência das pacientes testadas para DNA-HPV, conforme o uso de drogas lícitas e ilícitas	32
Tabela 5 - Distribuição dos achados citológicos detectados nas adolescentes submetidas ao teste de DNA-HPV	33
Tabela 6 - Distribuição dos achados citológicos por tipo de HPV	34
Tabela 7 - Distribuição dos achados colposcópicos nas pacientes testadas para DNA-HPV	36
Tabela 8 - Distribuição dos achados colposcópicos anormais por tipo de HPV	38
Tabela 9 - Reagentes utilizados no isolamento de DNA e suas especificações	74
Tabela 10 - Composição das soluções utilizadas no procedimento de eletroforese	75
Tabela 11 - Reagentes utilizados nas reações de sequenciamento	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de frequência relativa das adolescentes testadas para HPV	25
Gráfico 2 - Distribuição de frequência relativa das adolescentes testadas para HPV, segundo o estado civil.	25
Gráfico 3 - Distribuição de frequência relativa das adolescentes Testadas para HPV, segundo o número de estado gestacional.	27
Gráfico 4 - Distribuição de frequência relativa das adolescentes testadas para HPV, segundo o grau de escolaridade.	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 - Fotografia Eletrônica do Papilomavírus Humano.	4
Figura 2 - Mapa Genético do HPV Tipo 16.	4
Figura 3 - Colpofotografia de formação polipóide endocervical e condilomas de paciente do HU- UFAL.	15
Figura 4 - Colpofotografia apresentando condiloma acuminado vaginal.	15
Figura 5 - Colpofotografia com condiloma acuminado gigante vulvar.	16
Figura 6 - Mapa do Município de Maceió - Distritos Sanitários.	17
Figura 7 - Esfregaço cervical depositado em microtubo contendo sol. extratora de DNA.	20
Figura 8 - Distribuição de freqüência das adolescentes testadas para HPV, segundo a faixa etária.	24
Figura 9 - Distribuição de freqüência das adolescentes testadas para HPV, segundo o número de parceiros.	26
Figura 10 - Distribuição de freqüência das adolescentes testadas para HPV, segundo número de gestações.	27
Figura 11 - Aplicação das amostras de DNA genômico em gel de agarose a 0,8 % em tampão de corrida TBE 1X para eletroforese.	73
Figura 12 - Gel de poliacrilamida, corado c/nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 16.	77
Figura 13 - Gel de poliacrilamida, corado c/nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 33.	77
Figura 14 - Gel de poliacrilamida, corado c/nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 6b.	77

- Figura 15** - Gel de poliacrilamida, corado c/nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 53. 77
- Figura 16** - Gel de poliacrilamida, corado c/nitrato de prata mostrando um mapa físico do tipo indeterminado. 78
- Figura 17** - Eletroferograma produzido pelo seqüenciador automático MegaBace 1000 durante a leitura dos nucleotídeos marcados com cromóforos. 81
- Figura 18** - Página principal do NCBI, Banco de Informações Genéticas utilizado para análise das seqüências de DNA, com acesso ao Programa Blast. 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACO** - anticoncepcional oral
- AG-US** - atypical glandular cells undetermined significat (células glandulares atípicas de significado indeterminado).
- ASC-US** - atypical scamous cells undetermined significat (células escamosas atípicas de significado indeterminado).
- CIS** - carcinoma *in situ*
- DST** - doença sexualmente transmissível
- DNA** - desoxyribonucleic Acid (ácido desoxiribonucléico)
- dATP** - desoxiadenosina trifosfato
- dCTP** - desoxicitosina trifosfato
- dGTP** - desoxiguanina trifosfato
- dTTP** - desoxitimina trifosfato
- EtBr** - brometo de etídio
- GEMPRO** - Laboratório de Genética Molecular Genômica e Proteômica.
- GFX™** - Kit de purificação de DNA Genômico (Amersham Pharmacia Biotech).
- HPV** - human papillomavirus (Vírus do papiloma humano).
- HSIL** - lesão intra-epitelial de alto grau.
- HUPAA** - Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
- LCR** - região longa de controle.
- LIEs** - lesões epiteliais escamosas.
- LPA** - gel de poliacrilamida linear.
- LSIL** - lesão intra-epitelial de baixo grau.
- L1** - gene estrutural do Papilomavírus Humano.

- MY09** - oligonucleotídeo (primer).
- MY11** - oligonucleotídeo (primer).
- NCBI** - national center for biotechnology information.
- NIA** - neoplasia intraepitelial anal.
- NIC** - neoplasia intraepitelial cervical.
- NIP** - neoplasia intraepitelial peniana.
- NIPA** - neoplasia intraepitelial perianal.
- NIV** - neoplasia intraepitelial vulvar.
- NIVA** - neoplasia intraepitelial vaginal.
- OMS** - Organização Mundial de Saúde.
- ONGs** - organizações não governamentais
- ORFs** - região aberta de leitura.
- PCR-RFLPs** - Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição -
sequenciamento.
- Primer** - seqüência de nucleotídeos complementar a determinado fragmento
do DNA.
- PTGI** - Patologia do Trato Genital Inferior.
- p53** - gene supressor do tumor
- Taq** - termus aquaticus
- TBE** - solução Tris-EDTA-ácido bórico
- TE** - solução Tris-EDTA
- UFAL** - Universidade Federal de Alagoas

1.Introdução

Fortes e específicas associações do papiloma vírus humano (HPV) com o câncer da cérvix uterina marcaram as investigações científicas das últimas três décadas sobre a etiologia dessa neoplasia cervical (Zur HAUSEN, 1996; BOSCH *et al.*, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002), passando a centralizar as atenções dos que pesquisavam sobre o assunto. E o avanço do conhecimento, advindo de estudos sobre doenças relacionadas ao Papiloma Vírus Humano (HPV), resultou da interação entre clínicos, patologistas, epidemiologistas e pesquisadores em ciências básicas (ORTZ & RICHART, 1999), culminando com aprimoramento do diagnóstico da infecção pelo HPV.

As verrugas genitais em humanos são conhecidas desde o período greco-romano, entretanto, a vinculação entre a presença do carcinoma da cérvix uterina e a atividade sexual foi promovida no século XIX por Rigoni-Stern (Apud SALVÁ *et al.*, 1999; DE FRANCESCO *et al.*, 2005) e comprovada por estudos epidemiológicos como doença sexualmente transmissível (DST) (MEISELS & FORTIN, 1976 e 1977; PUROLA & SAVIA, 1977; Zur HAUSEN, 1977; VILLA & FRANCO, 1989; PFISTER, 1997; CHANG *et al.*, 1999; FOCCHI *et al.*, 1999; ALVARENGA *et al.*, 2000; KAHN *et al.*, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), no início dos anos setenta, patrocinou pesquisa para avaliar o papel do vírus herpes simples (HSV) na gênese do câncer do colo uterino. Entretanto o vírus identificado como carcinogênico tratava-se do HPV, aspecto que reorienta o estudo para esse vírus (Zur HAUSEN, 1986). Diante da confirmação acima referida, passou-se a admitir que o desenvolvimento de câncer cervical sem o envolvimento de certos tipos de HPV é excepcional ou até mesmo impossível (WALBOOMERS *et al.*, 1999; RABELO-SANTOS, 1999; MUÑOZ, 2000; SCHIFFMAN &

CASTLE *et al.*, 2003; CLIFFORD *et al.* 2003). A clonagem molecular do HPV tipo 16 e 18 sugere seu papel central na carcinogênese, onde cerca de 100% dos cânceres cervicais são induzidos pelo DNA do HPV (WALBOOMERS *et al.*, 1999); achado também ratificado em estudos recentes de Tyring, 2000; Riethmuller *et al.*, 2001; Bosch & Munoz, 2002; Jastreboff & Cymet, 2002.

Portanto, foi o protocolo da reação da polimerase em cadeia (PCR) que, aumentando a sensibilidade e especificidade da detecção do DNA-HPV (FRANCO, 1997), fez evoluir estudos sobre a função dos genes do HPV e despertar investigações sobre mecanismos moleculares de transformação celular, controle do ciclo celular e regulação da transcrição gênica (TUREK & SMITH, 1997; Zur HAUSEN, 2000). O câncer cervical é claramente o primeiro tumor sólido viral, de tipo induzido, descrito na espécie humana, representando uma causa de morte para a mulher, em idade relativamente precoce, que pode ser evitada (RIETHMULLER *et al.*, 2001; BOSCH & MUNOZ, 2002).

Para a adolescente são reconhecidos numerosos fatores de risco: mudanças da moral e da conduta na sociedade (MOREIRA, 1998; NUNEZ *et al.*, 2004), atividade sexual precoce e resposta imunitária imatura (CHIRGWIN *et al.*, 1995; VILLA, 2000; SHEW & FORTYBERRY, 2005), ausência de prevenção à gravidez e às doenças sexualmente transmissíveis (PINTO E SILVA & SURITA, 2003; MUNOZ *et al.*, 2003; KANATO & SARANRITTICHAJ, 2006) e número de parceiros, hábito de fumar, uso de anticoncepcionais orais, coexistência de outras infecções genitais e características virais (SHEW & FORTYBERRY, 2005).

O HPV é DNA - vírus não cultivável, da família *Papovaviridae*, gênero papiloma vírus, espécie-específico, podendo causar lesões proliferativas na

pele e mucosas (os papilomas). A partícula viral é um capsídeo protéico de simetria icosaédrica com 72 capsômeros e 54 nm de diâmetro (TUREK, 1994), sem membrana exterior (Figura 1), que pode justificar o baixo nível de antigenicidade das infecções pelo HPV.

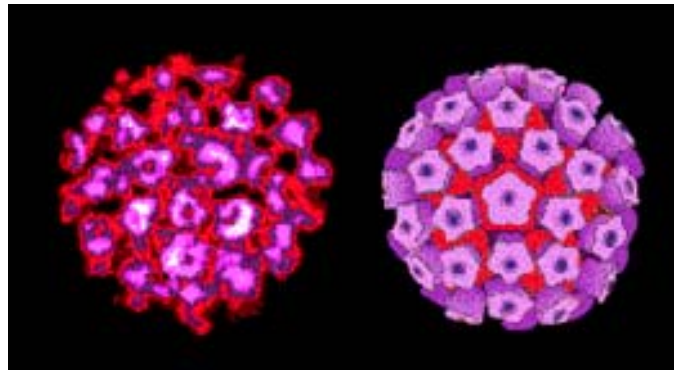


Figura 1 - Fotografia Eletrônica do Papilomavírus Humano.

Seu genoma, central, corresponde à molécula de DNA de duplo filamento, circular, de peso molecular de $5,2 \times 10^6$ daltons (PASSOS *et al.*, 1989; CRUM & NUOVO, 1991), apresenta três segmentos principais (Figura 2), cada um com uma série de regiões abertas de leitura que codificam as proteínas virais. As regiões “E” precoces de transcrição (E1, E2 e E4 a E7) regulam: a replicação viral, o controle da transcrição e a transformação da célula hospedeira. As duas regiões tardias de transcrição - L1 e L2 - são responsáveis pela codificação (L1 é gênero-específica e medidor indireto da infectividade, L2 é altamente tipo-específica). O segmento LCR, entre E e L, contém a origem da replicação do DNA viral (VILLA, 1997; LORINCZY, 1997; SILVA *et al.*, 2004).

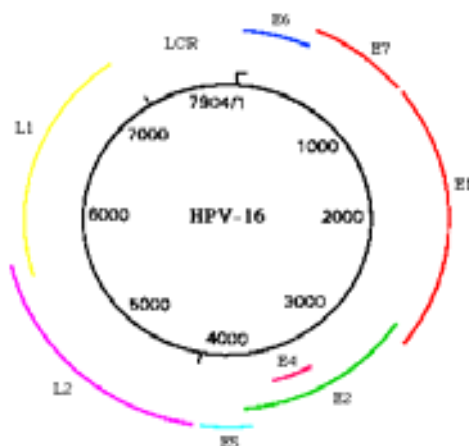


Fig. 2. Mapa Genético HPV Tipo 16

90% da homologia de E6, E7 e L1 definem o genoma de mais de 100 tipos virais humanos já identificados, onde um terço dessas infecções são do trato genital masculino e feminino (CARR & GYORFI, 2000; CASON & MANT, 2005; SHEW & FORTENBERRY, 2005). Novo tipo de HPV se define por apresentar homologia menor que 90% com outros tipos virais relativos a essas regiões. Subtipo viral é quando há similaridade de 90 a 98% para essas regiões. E, variante viral é aquele vírus que possui homologia maior que 98% de E6, E7 e L1 (VAN RANST *et al.*, 1992; BERNARD *et al.*, 1994).

Os diferentes genótipos de HPV contêm genomas únicos, demonstram variabilidade nos diversos epitélios acometidos e o aspecto das lesões que induzem vai desde verrugas ano-genitais às lesões pré-malignas e câncer invasor (ZUR HAUSEN & De VILLERS, 1994), resumidos no Anexo 1. Há dois grupos identificados: os de baixo risco oncogênico, que produzem verrugas genitais, lesões de baixo grau e papilomatose respiratória recorrente - HPV 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73, (PEREYRA, *et al.*, 1993; BERNARD *et al.*, 1994; DE VILLIERS, 1994; IARC, 1995; VILLA, 1997; SEONG-BAE *et al.*, 2003; MUNHOZ *et al.*, 2003; SHEW & FORTENBERRY, 2005). As verrugas, em geral, são multicêntricas, de distribuição uniforme, freqüentemente únicas nos homens e múltiplas nas mulheres. Os locais de acometimento são: fúrcula/intróito vaginal, lábios menores e maiores. A cérvix está comprometida em 6% a 8% dos casos e a região anal é área extragenital mais freqüentemente envolvida (OKADA *et al.*, 2000). E os outros vírus, de alto risco oncogênico, estão estritamente correlacionados com as lesões de alto grau e neoplasia cervical, são eles: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68 (PEREYRA, *et al.*, 1993; BERNARD *et al.*, 1994; IARC, 1995; VILLA, 1997;

SEONG-BAE *et al.*, 2003; MUNHOZ *et al.*, 2003; CLIFFORD *et al.*, 2003; SHEW & FORTENBERRY, 2005).

Técnicas biomoleculares acessam a variabilidade genética, dentre elas a PCR associado ao Polimorfismo de Fragmentos de DNA, obtidos por enzimas de Restrição (PCR-RFLPs - Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Assim, estudos epidemiológicos moleculares podem ser realizados por este método, para determinar a prevalência do vírus e reconhecer os fatores de risco associados à infecção (BAUER *et al.*, 1993). Ele demonstra grande poder discriminatório, capaz de detectar o DNA mesmo na ausência de lesão, com baixo número de cópias de DNA-HPV presente (WIELAND & PFISTER, 1999) e determinar o potencial de até quatro tipos concomitantes de HPV presentes em uma única amostra cervical (KANESHIMA *et al.*, 2001). E é fundamental para pesquisar variantes moleculares do HPV não conhecidas e mais oncogênicas do que as atuais (VILLA, 2000). Contudo, não impossibilita, na totalidade das avaliações, a ocorrência de falsos-negativos (WALBOOMERS *et al.*, 1999, MUÑOZ *et al.*, 2003).

O vírus inicia os eventos da infecção com a transcrição e replicação do DNA viral, coordenados por uma porção do genoma. Microtraumas nos epitélios pavimentosos facilitam a entrada do vírus favorecendo sua instalação nas células basais ou metaplásicas do organismo hospedeiro. A metaplasia é processo fisiológico no colo uterino, que acontece durante a vida fetal, puberdade e gestação que, por imaturidade funcional, pode tornar-se alvo para a infecção pelo HPV (MOSCICKI, 1997). Outros prováveis sítios metaplásicos são: laringe e junção anorretal, (RICHART *et al.*, 1997; KASHIMA, *et al.*,

1997). O HPV exclusivamente intracelular infecta células mitoticamente ativas, nas zonas de transformação e na junção escamo-colunar, para se estabelecer no epitélio (PEREYRA *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2001).

Ao infectar a célula, o vírus pode produzir infecção latente, ser eliminado, manifestar infecção clínica ou subclínica ativa (com seu DNA episomal, não integrado) ou integrar seu DNA viral ao núcleo celular (SYRJANEM, 1989). A replicação viral fica ligada ao ciclo das células infectadas, mas a integração do genoma viral ao da célula deve-se à ação de co-carcinógenos iniciantes ou promotores que são: genéticos, químicos, imunológicos e infecciosos (Zur HAUSEN, 2002). De início, a infecção é assintomática e não transmissível, induzindo imunidade efetiva ou a cura da infecção (MOSCICKI *et al.*, 2004). Mas a imunodepressão fisiológica (gravidez) ou patológica (HIV) pode levar a infecção latente a converter-se em ativa (BEZNOS *et al.*, 2000). A lesão sub-clínica tem maior importância epidemiológica pelo risco de transmissão por essas lesões clinicamente insuspeitas, de alta infectividade e de persistência do vírus (PEREYRA *et al.*, 2000) e pode ser responsável por uma neoplasia intraepitelial ou evoluir para o câncer (RIETHMULLER *et al.*, 2001). Por isso, se aceita que essa infecção deve ser diagnosticada precocemente (BARRASSO & GUILLEMOTONIA, 1999).

Há evidências de que a epidemia do HPV aumenta progressivamente durante as duas últimas décadas e infecções pelo HPV são agora estimadas como a DST mais freqüente em todo o mundo (SYRJANEM, 1989; RIETHMULLER *et al.*, 2001; FRANCESCHI *et al.*, 2003; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003; LEUNG *et al.*, 2005), com prevalência variável de DNA-HPV,

de acordo com a população estudada (CHAN *et al.*, 2002). Nesse estudo, 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (BOSCH *et al.*, 1995; CHAOUKI *et al.*, 1998; ALMEIDA, 2001). Principalmente nestes centros populacionais, isso se constitui importante problema de saúde pública, por caracterizar sua transmissão como sexual e por ser um fator crítico na patogênese de vários cânceres (JASTREBOFF & CYMET, 2002; LEUNG *et al.*, 2005; KAHN *et al.*, 2005; SHEW & FORTYBERRY, 2005).

Em virtude de crianças e adolescentes infectados pelo HPV serem considerados de risco para o desenvolvimento de neoplasias ano-genitais, especialidades médicas como a Pediatria voltam-se para esses estudos (Zur HAUSEN, 1996; RISSER *et al.*, 2005). A papilomavirose também é DST materna, que pode ser transmitida verticalmente à criança no parto (TSENG *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 1999) e, pode levar ao aparecimento de papiloma oral ou ano-genital, ampliando assim o interesse pela prevenção dessas infecções na faixa etária que antecede os 20 anos (SHEW & FORTYBERRY, 2005; CASON & MANT, 2005).

O diagnóstico clínico de uma infecção pelo HPV pode ser estabelecido pela observação de verrugas genitais ou condilomas planos pigmentados ou não. A colposcopia identifica as lesões sub-clínicas nos diversos sítios humanos, diferencia as condições fisiológicas das patológicas, orienta a biópsia para esclarecer dúvidas na informação citológica e no diagnóstico diferencial (infecção viral, NIC de alto ou baixo grau, carcinoma invasor) e delimita a extensão da enfermidade (TATTI *et al.*, 2001). O exame colpocitológico (Papanicolaou) é basicamente o método de *screening* e deve ser encarado como indicador de probabilidade da existência de determinada lesão da cérvix

(ABREU-E-LIMA, 2001; NETTO *et al.*, 2006) e pela razão de estarem as anormalidades citológicas correlacionadas geralmente com a persistência da lesão (SANTOS *et al.*, 2006). Na adolescente, após o primeiro intercuro sexual, esse *screening* citológico cervical deve ser anual por três anos; nas lesões de baixo grau, a cada seis ou doze meses, mas associado à colposcopia nas lesões persistentes; e, nas lesões de alto grau, impõe-se a colposcopia seguida de biópsia (LEUNG *et al.*, 2005). Compete à histopatologia estudar as alterações morfológicas, confirmar a suspeita diagnóstica e graduar a severidade do processo, sem identificar o tipo viral envolvido e não predizer com certeza o comportamento biológico das lesões (ALVARENGA *et al.*, 2000; RIOS, 2004).

Com o advento de técnicas de detecção dos genomas virais, o método morfológico (Citologia, Colposcopia e Histopatologia) revelou-se de baixa sensibilidade no diagnóstico da infecção (VILLA, 2004). Exames subsidiários usados para identificar a infecção, a partir da Citologia: Microscopia Eletrônica, Imunohistoquímica e Sorologia, não são satisfatórios e torna necessário o emprego de outras técnicas para detecção da infecção viral, que completem o diagnóstico biomolecular: Hibridização *Blot*, Hibridização *in situ*, Captura de híbridos de DNA-RNA e PCR (WIELAND & PFISTER, 1999, VILLA, 2004).

Percentuais em torno de 20 a 30% de resultados falso-negativos nos *screening* citológicos mantêm índices inaceitáveis de câncer de colo, mesmo em países com programas de rastreamento bem organizados e alta percentagem de cobertura populacional (FERENCZY, 1999). Os Testes DNA-HPV são precisos, mais sensíveis e objetivos do que a citologia oncótica, além de ter alto valor preditivo de positividade (LORINCZ *et al.*, 1999; FERENCZY,

1999). Assim, credenciam-se além da pesquisa para o rastreamento, como ferramenta primária na detecção do HPV. Propõe-se atualmente que os testes DNA-HPV se destinem rotineiramente às pacientes com resultado de exame citológico inconclusivo (ASC-US e AG-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado e células glandulares atípicas de significado indeterminado e Insatisfatório) (ZEFERINO *et al.*, 2000; BOARDMAN *et al.*; 2005; MONSONEGO *et al.*, 2005).

Ao admitir risco para o desenvolvimento de neoplasias ano-genitais nas adolescentes infectadas pelo HPV e a possibilidade da transmissão vertical, através da gestante infectada, revela-se a importância do diagnóstico precoce dessa infecção genital em momentos que antecedem a concepção e durante o acompanhamento pré-natal. Considerando, ainda, que os estudos envolvendo a infecção genital pelo HPV em adolescentes são raros, além da inexistência de trabalhos sobre o assunto com casuística própria do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas, evidencia-se a necessidade de conhecer as características da infecção pelo HPV que acometem o trato genital inferior desse grupo especial de pacientes em nosso meio. Contribuindo, assim, para uma melhor assistência à saúde sexual e reprodutiva da mulher nessa fase ímpar de sua vida.

2. Objetivos

2.1 - GERAL

O presente estudo teve como objetivo diagnosticar e classificar o papilomavírus humano (HPV) na mucosa do colo uterino em adolescentes grávidas e não grávidas, através da reação de polimerase em cadeia.

2.2 - ESPECÍFICOS

2.2.1 - Determinar os fatores de risco, como idade, cor, escolaridade, menarca, sexarca, número de parceiros, uso de drogas lícitas e ilícitas, métodos contraceptivos, número de gestações, ocorrência de DSTs prévias) na infecção pelo HPV.

2.2.2 - Estabelecer o diagnóstico biomolecular do HPV pela tipagem do vírus presente nas diversas formas de infecção cervical: clínica, sub-clínica e latente.

2.2.3 - Identificar os diversos tipos oncogênicos presentes na população estudada.

2.2.4 – Verificar possíveis associações entre os diferentes tipos de DNA-HPV com os achados citológicos e colposcópicos.

3. Casuística e Método

3.1 - TIPO DE ESTUDO

Descritivo, prospectivo, de coorte transversal.

3.2 - CASUÍSTICA

Foram estudadas prospectivamente 111 adolescentes atendidas no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI), do Serviço de Ginecologia do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (HUPAA-UFAL), no período de julho de 2002 a fevereiro de 2004.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do HUPAA-UFAL (Anexo 2) e pela Comissão de Normas Éticas da Universidade Federal de Alagoas (Anexo 3) e respeitou as normas preconizadas pela Resolução 196/99 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996).

3.3 - METODOLOGIA

3.3.1 - Seleção de Pacientes

Foi convidado a participar do estudo um grupo de adolescentes sexualmente ativas, grávidas e não grávidas, encaminhadas ao Ambulatório de PTGI do Serviço de Ginecologia do HUPAA-UFAL, portadoras de lesões HPV induzidas no trato genital inferior - condilomas na vulva, vagina, colo uterino, períneo, região anal (Figuras 3, 4 e 5) e outro também de sexualmente ativas, grávidas e não grávidas, porém sem lesões clínicas ou sub-clínicas, induzidas pelo HPV. Nesse ambulatório, as adolescentes foram atendidas de forma

seqüencial. Todas foram submetidas a exame ginecológico, colposcopia, coleta de material para citologia oncótica e para teste DNA-HPV.

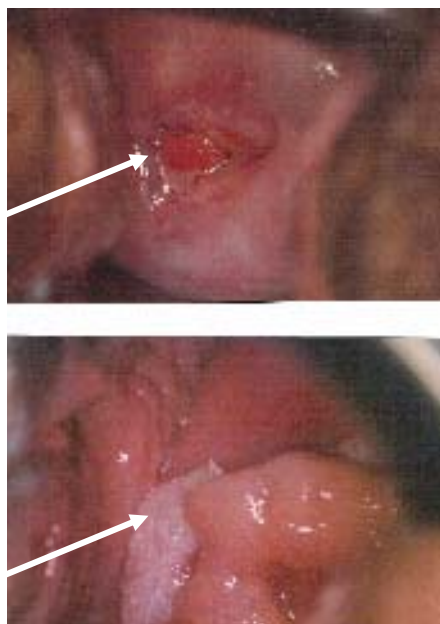


Figura 3 - Colpofotografia de formação polipóide endocervical (acima) e condilomas cervico-vaginais (abaixo) de paciente do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes, da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL), ao exame para coleta de material para teste diagnóstico para DNA-HPV .



Figura 4 - Foto de paciente gestante, apresentando condiloma acuminado vaginal, na avaliação inicial sendo submetida ao teste diagnóstico e genotipagem para HPV, no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes, da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL).



Figura 5 - Foto de paciente apresentando volumoso condiloma vulvar, por ocasião do exame para coleta de matéria, para o teste diagnóstico para DNA-HPV, no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL).

As adolescentes foram oriundas de todos os Setores do Serviço de Ginecologia e do Serviço de Obstetrícia do HUPAA-UFAL, localizado no 7º. Distrito Sanitário da Cidade de Maceió (Figura 6), e outras advindas de Postos de Saúde de mais três Distritos Sanitários (Salgadinho, CAIC - Virgem dos Pobres e Bebedouro – 1º. 2º. e 3º.), além de Organizações não Governamentais (ONGs) que assistem meninas de rua (Projetos: Erê - no Centro de Maceió e Thalita - no Bairro de Bebedouro) e encaminham adolescentes para atendimento no HUPAA-UFAL, através da rede do Sistema Único de Saúde.

PREFEITURA DE MACEIÓ
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
REGIÕES ADMINISTRATIVAS / DISTRITOS SANITÁRIOS

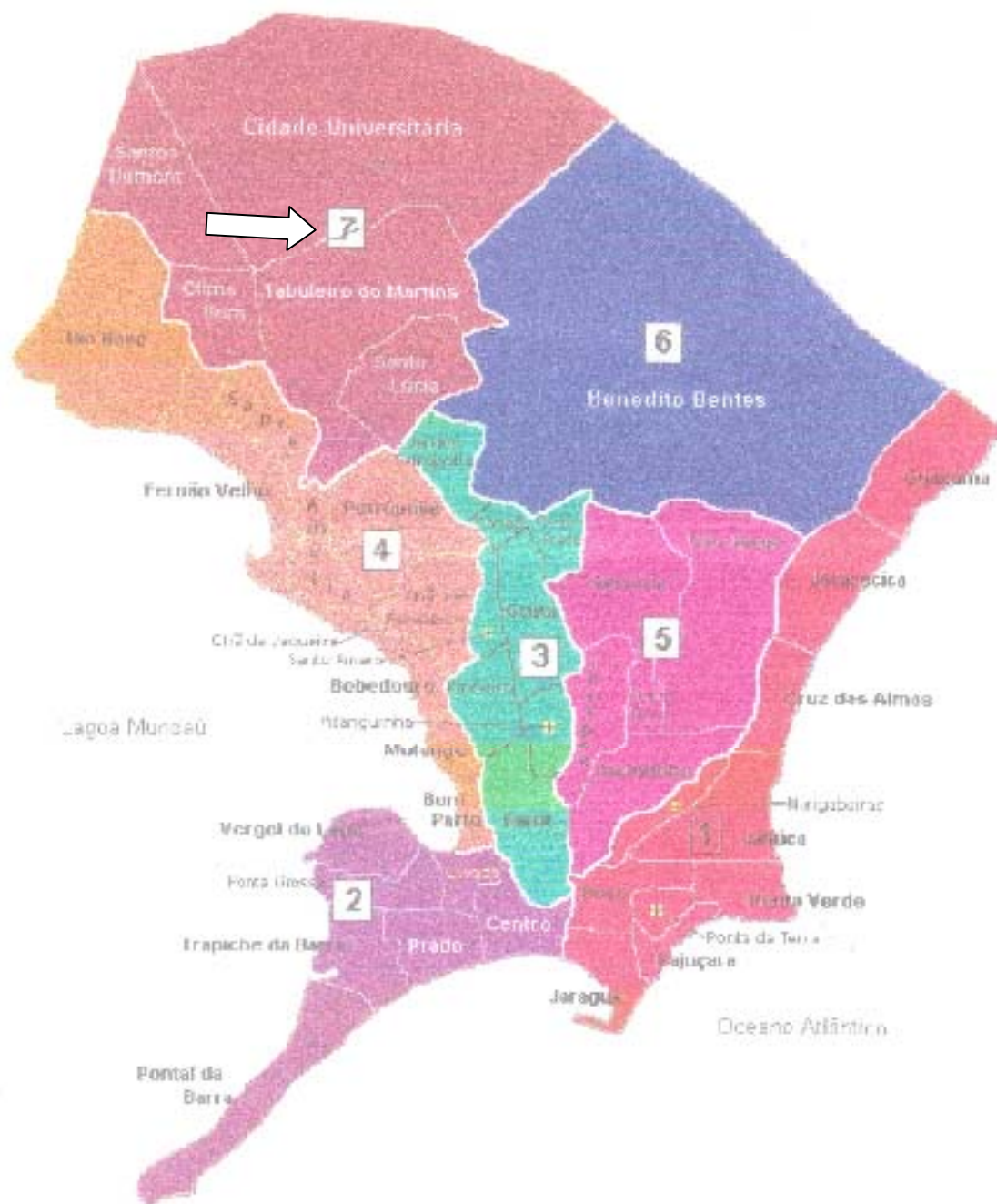


Figura 6 - Distritos Sanitários do Município de Maceió.

3.3.2 - Critérios de inclusão

Ser do sexo feminino; idade entre 10 e 19 anos; com atividade sexual vaginal há mais de seis meses; quando grávida, estar com idade gestacional entre 6 e 40 semanas; paciente que consentiu participar do estudo.

3.3.3 - Critérios de exclusão

Adolescente não grávida; portadora de sangramentos transvaginais, como: hemorragia uterina disfuncional, pólipos endometriais ou endocervicais e outras ginecopatias; adolescente grávida com sangramentos relacionados a: ameaça de abortamento tardio, prenhez molar, inserção baixa da placenta, descolamento prematuro da placenta normalmente inserida, vasa prévia e demais patologias do ciclo gravídico; adolescente em tratamento anti-viral ou imunoterápico, nos últimos 90 dias; paciente que não concordar em participar do estudo.

3.3.4 - Coleta de dados

À primeira consulta, após verificar os critérios de inclusão e exclusão, as pacientes foram informadas sobre o objetivo e a dinâmica do presente estudo. Houve a concordância firmada por escrito, utilizando o Termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 4), previamente aprovado pela Comissão de Normas Éticas da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), contendo todos os esclarecimentos sobre a metodologia, a finalidade do estudo e garantias de sigilo sobre as informações prestadas pertinentes à pesquisa. No caso das menores de 16 anos, os pais ou responsáveis foram contatados e,

após receberem todas as informações, assinaram esse termo. Em seguida, responderam ao protocolo de pesquisa (Anexo 5).

Pacientes que, por razões sociais (falta de condições financeiras, transporte, dificuldades familiares e outras), foram impedidas de se deslocarem até o HUPAA-UFAL, a primeira consulta foi realizada no seu posto de origem e as subseqüentes no Ambulatório de PTGI, no HUPAA. No dia da primeira consulta, aquelas que não reuniam condições técnicas para coleta do material biológico do trato genital inferior (menstruada, com leucorréia intensa, em uso de medicação vaginal ou atividade sexual recente) tiveram seus exames e coletas agendadas para uma nova data.

3.3.5 - Coleta de Material do Trato Genital Inferior:

As adolescentes que preencheram os pré-requisitos citados foram à sala de coleta de material no Ambulatório de PTGI para seguir rotina propedêutica específica:

- > ECTOSCOPIA - em posição ginecológica, foi feita avaliação macroscópica dos genitais externos e registro de condilomas detectados na vulva, ânus e períneo ou outros processos patológicos detectados.
- > EXAME ESPECULAR - para inspeção da vagina e colo, sem uso de soluções reagentes, foi feito o registro das lesões vaginais e cervicais (condiloma e queratose), se existentes; presença de fluxo vaginal e cervical anormais e observação da forma, volume e orifício externo do colo uterino.
- > COLETA DO MATERIAL ECTOCERVICAL E ENDOCERVICAL- para Colpocitologia Oncótica, foram utilizadas espátula de Ayre e escova endocervical uterina. Esse material foi estendido em lâmina de vidro, fixado em álcool absoluto e encaminhado ao Serviço de Anatomia Patológica do HUPAA-UFAL. O método de coloração utilizado foi o de Papanicolaou e Traut, 1943 (Apud KOSS & GOMPEL, 1999) cujos achados citológicos foram descritos de acordo com a classificação de Bethesda 2001 (Apêndice 1).

> COLETA DAS AMOSTRAS CERVICAIS PARA A PCR-RFLPS - foi realizada através da introdução de uma escova ginecológica através do orifício cervical, com giro de 360 graus no endocérvice das pacientes selecionadas. Após a coleta do esfregaço cervical, cada escova foi agitada em um microtubo contendo 1,0 ml de solução extratora de DNA. As escovas foram descartadas e cada tubo identificado (Figura 7) foi encaminhado ao Laboratório de Genética Molecular Genômica e Proteômica - GEMPRO/CECA/UFAL e incubado por um período de 3 a 5 dias, para posterior extração do DNA genômico celular e viral.



A partir da obtenção das amostras cervicais, as demais etapas do diagnóstico laboratorial estão posteriormente descritas no Apêndice 2.

Figura 7. Esfregaço cervical depositado em microtubo contendo solução extratora de DNA.

> COLPOSCOPIA - foi realizada com a utilização de Colposcópico DF Vasconcelos, modelo CP-M7, que amplifica imagens de 6 a 40 vezes, com a técnica clássica, após inspeção do colo sem soluções reativas:

1. Aplicação do ácido acético a 5% - realizou-se a avaliação da ectocérvice, zona de transformação, terço distal da endocérvice, fundos de saco e paredes vaginais. O ácido acético permitirá identificar áreas com alterações epiteliais, aceto-reativas, que se manifestará como imagens colposcópicas anormais. Esse efeito de coagulação das proteínas poderá ser observado no epitélio da ectocérvice como no da endocérvice.

2. Teste de Schiller - aplicação de Lugol no epitélio ectocervical e vaginal, cujas células intermediárias ricas em glicogênio se coram de marrom - teste negativo e, nas áreas que não se coram, considera-se teste positivo (CARTIER, 1994).

3. Biópsia orientada pela Colposcopia, realizada com pinça de Gaylor-Medina, nos casos de imagens colposcópicas anormais, para obtenção de espécimes para o estudo histopatológico. A biópsia foi evitada na evidência clínica de infecção pelo papilomavírus nos genitais (presença de condilomas) e nas pacientes grávidas.

4. Hemostasia - foi utilizada a solução de policresuleno ou tampão vaginal de gaze esterilizada, quando necessária.

5. Fragmentos de tecido do colo uterino - foram colocados em vidro contendo solução de formol a 10% e encaminhados ao encaminhados para o Serviço de Anatomia Patológica do HUPAA-UFAL.

Observe-se que o exame ginecológico, colposcopia, biópsia e a coleta do material foram feitos exclusivamente pelo médico pesquisador. A leitura dos achados colposcópicos obedeceu à classificação de Roma, 1990 (Apêndice 3). As lesões pré-neoplásicas foram descritas segundo a nomenclatura proposta por Richart & Barron (1969) de neoplasia intra-epitelial cervical, nos seus diferentes graus, conforme classificação de Drake (1984): NIC I, NIC II e NIC III.

3.3.6 - Instrumentos de Investigação:

Constituíram instrumentos utilizados na investigação o protocolo específico (Anexo 5) e testes biomoleculares para DNA-HPV, a partir da subtipagem que foi executada em esfregaços cervicais, objetivando identificar os tipos de alto risco oncogênico. A diagnose envolveu a utilização de oligonucleotídeos específicos (MY09 E MY11) para amplificar e diagnosticar por PCR/RFLP o material genético do HPV, cujos resultados foram encaminhados em listagem advindas do GEMPRO-CECA-UFAL (Anexo 6 e 7) e registrados no Banco de Dados da Pesquisa.

3.3.7 - Variáveis do Estudo e Conceitos:

As **variáveis dependentes** reconhecidas são: PCR/RLFPs, colpocitologia, colposcopia.

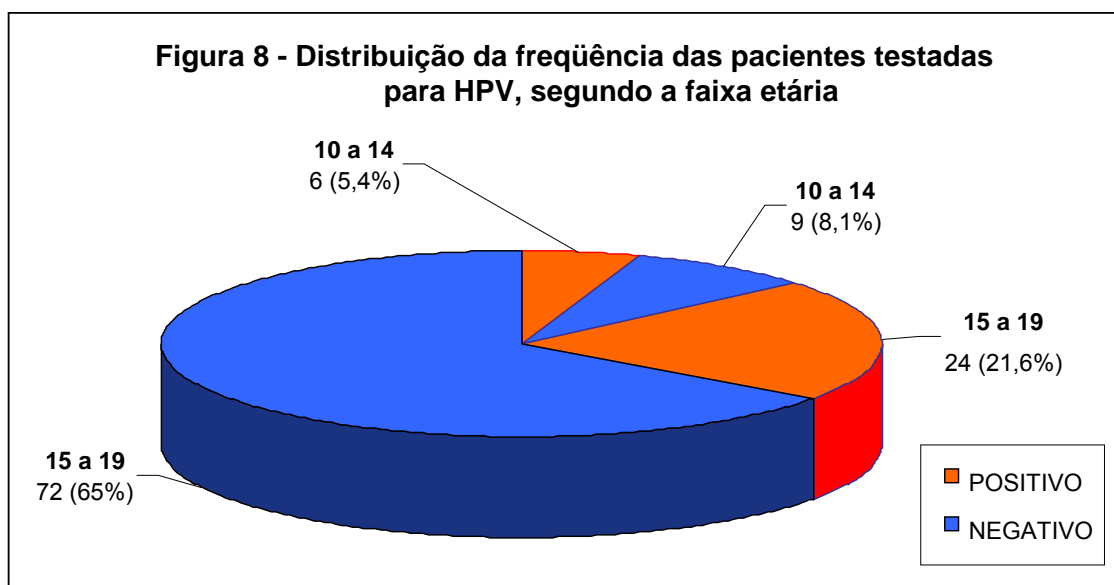
As **variáveis independentes** são idade, cor da pele, escolaridade, estado civil, sexarca, número de parceiros, DST prévia, anticoncepção, número de gestações, gestação atual e uso de drogas lícitas e ilícitas.

3.4 - PROCESSAMENTO DOS DADOS

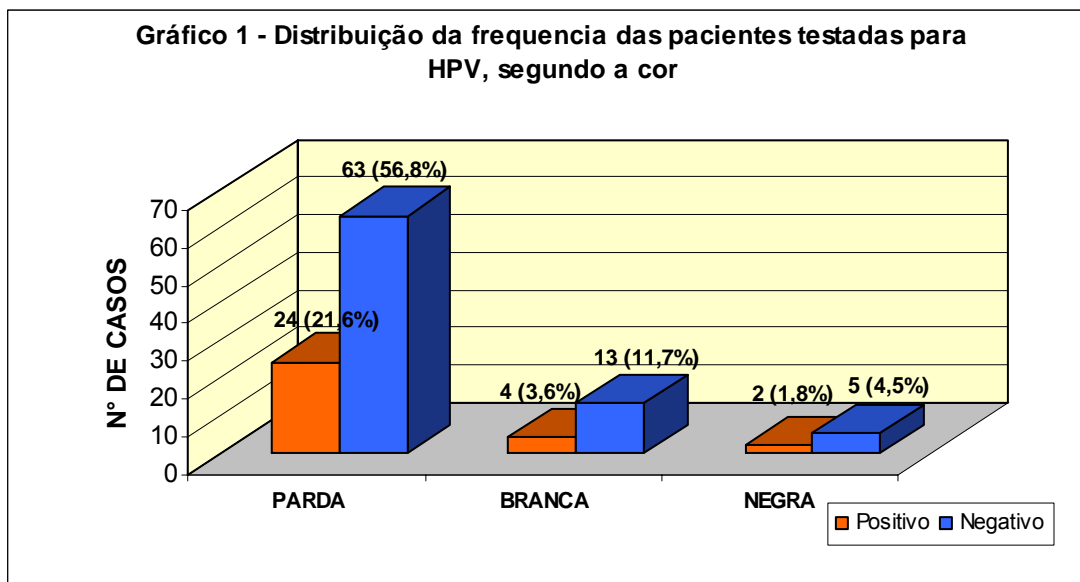
Criou-se o banco de dados em planilha de *software: Excel/Office 2000* com todas as variáveis descritas em item anterior. As mulheres foram relacionadas, cronologicamente, segundo as datas de coleta de material, atribuindo a cada uma delas um número de identificação. O banco de dados foi exportado para o GRAPH Pad Instat (DATESET1. ISD). Foi feita consistência inicial da digitação dos dados, através da conferência manual da listagem e subsequente consistência lógica final. Em seguida, houve análise comparativa, utilizando tabelas de contingência para medir a associação e risco entre as variáveis categóricas. Foi usado o teste do Qui quadrado e o teste exato de Fisher, considerando-se como significativos valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

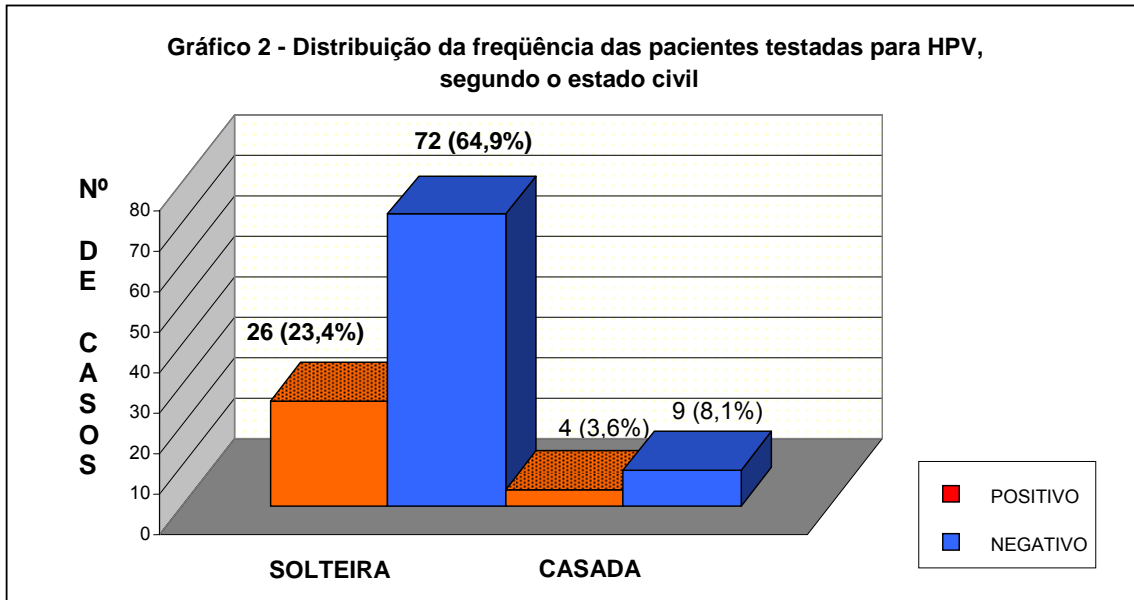
Foi estudado um total de 111 mulheres que constituíram efetivamente a casuística do presente estudo. A média de idade das pacientes foi de $16,5 \pm 1,7$ anos, traduzindo assim a condição específica de adolescente desta amostra. Em relação à faixa etária e o diagnóstico do papilomavírus (Figura 8), verificou-se que, entre as pacientes com diagnóstico positivo, a faixa etária compreendida entre 15 e 19 anos foi a mais freqüente (24=21,6%) em relação à faixa de 10 a 14 anos, sem, no entanto, apresentar diferença significativa ($p>0,05$).



O Gráfico 1 mostra a distribuição das pacientes em função do diagnóstico do papilomavírus e da cor. Observa-se que a cor parda incidu em 24 (21,6%) casos positivos, taxa superior em relação à cor branca (4=3,6%) e à negra (2=1,8%), sem mostrar significância estatística ($p>0,05$).

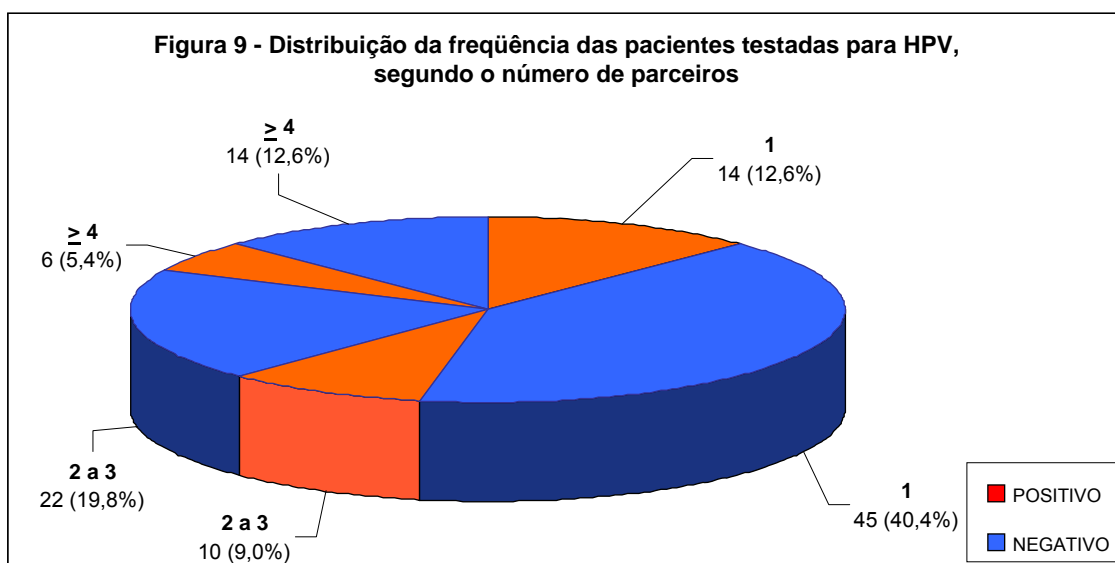


Considerando o Estado Civil (Gráfico 2), a maior frequência do papilomavírus ficou entre as solteiras (26 =23,4%) contra 4 (3,6 %) casadas, sem apresentar diferença estatística significativa, quando comparadas entre si ($p>0,05$).



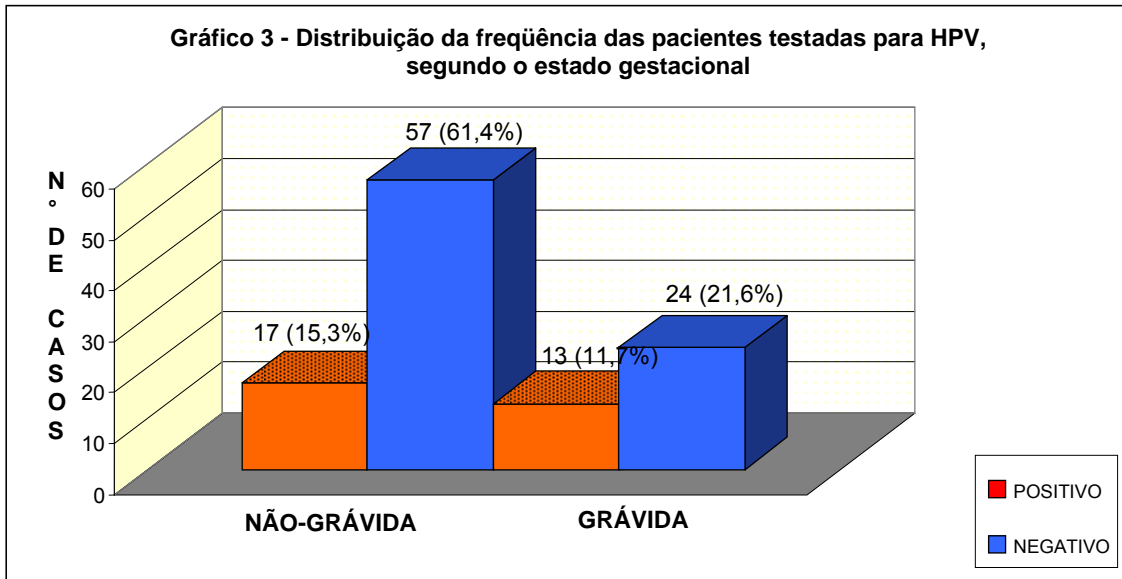
A distribuição das adolescentes associando o diagnóstico do papilomavírus com o número de parceiros está na Figura 9. O diagnóstico positivo com parceiro único apresenta maior frequência (14=12,6%), seguido de dois a três parceiros com 10 (9,0%) casos, enquanto que, com \geq quatro, 6

(5,4%) casos. A comparação entre essas freqüências não mostrou significância estatística ($p > 0,05$).

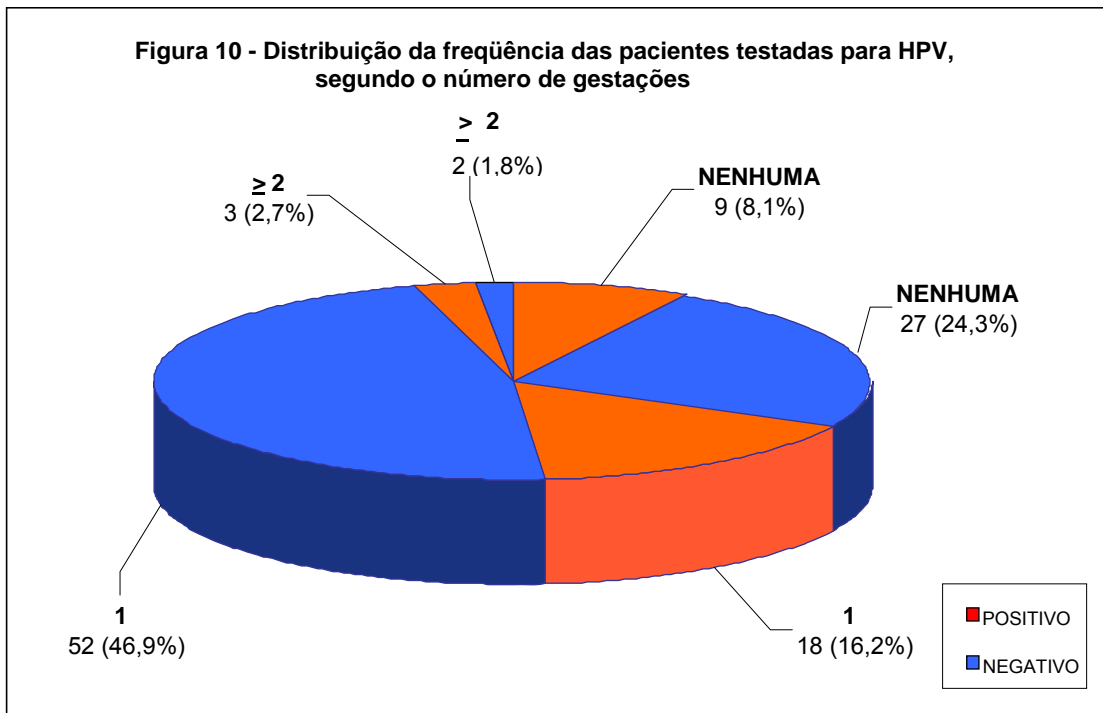


Convém ressaltar que, na população de adolescentes investigadas, a média de idade da sexarca foi de $14,2 \pm 1,9$ anos, superior à média de idade da menarca, que foi de $11,9 \pm 1,3$ anos. Observou-se ainda que o total das pacientes com sexarca no intervalo de idade, compreendido entre 11-15 anos ($88=79,3\%$), foi estatisticamente significativo em relação aos intervalos 6-10 ($3=2,7\%$) e 16-19 ($20=18\%$) anos ($p < 0,05$).

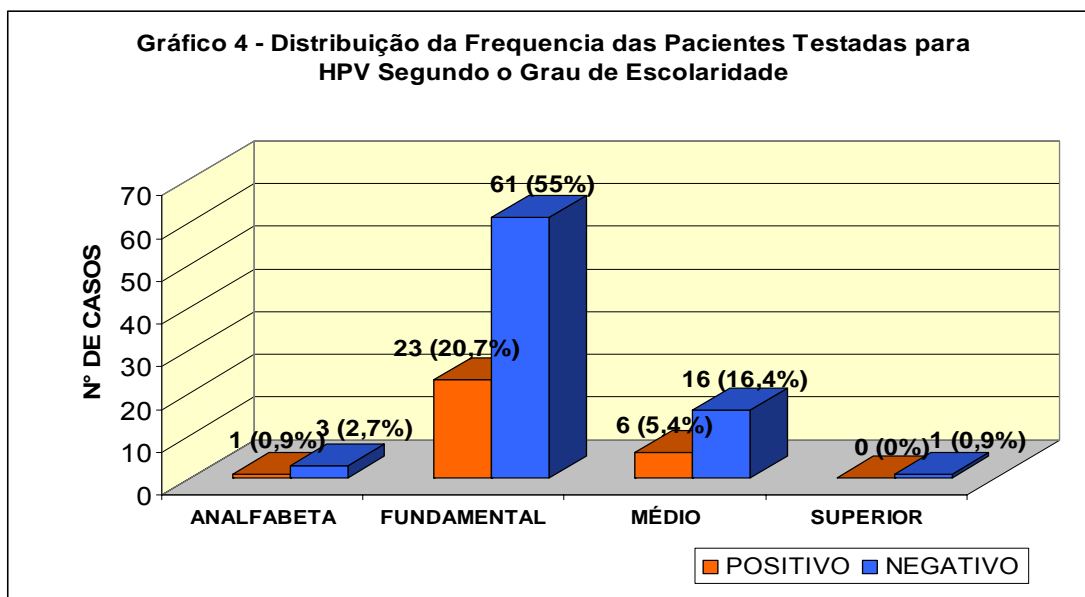
A associação entre a presença de gravidez e o diagnóstico positivo do papilomavírus (Gráfico 3) mostra uma maior taxa entre as não grávidas ($17=15,3\%$) em relação às grávidas ($13=11,7\%$), entretanto quando comparadas não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Ressalte-se que, dentre as que se encontravam grávidas 37 ($33,3\%$), no momento da coleta de material para a investigação do papilomavírus, 34 ($92,3\%$) destas estavam nos dois últimos trimestres da gravidez.



O diagnóstico do papilomavírus humano associado ao número de gestações (Figura 10) mostra que aquelas pacientes com uma gestação anterior constituíram maioria (18 = 16,2%) em relação às nuligestas (9 = 8,1%) e aquelas com ≥ 2 gestações 3 (2,7%), não obstante, sem significância estatística quando comparadas ($p > 0,05$).



O Gráfico 4 se refere ao diagnóstico do papilomavírus, segundo o grau de escolaridade. O maior número de casos (23=20,7%) encontra-se entre as adolescentes que referiram ter o curso fundamental, mas sem diferença estatística significativa ($p>0,05$), quando comparado aos demais graus de escolaridade.



Considerando as pacientes positivas com história de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) prévias e a faixa etária (Tabela 1), verificou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando se compararam as faixas etárias de 10 a 14 anos com as de 15 a 19 anos, entre esses grupos. Entretanto, quando se considerou a presença de DSTs, independentemente da faixa etária e levando em conta todos os casos da amostra (12/25 com DSTs prévias; 18/86 sem DSTs prévias), foi observada diferença significativa ($p<0,05$) quando comparados.

Tabela 1 - Distribuição da frequência das pacientes com diagnóstico positivo para HPV com história de DSTs prévias

DSTs PRÉVIAS	IDADE (Anos)				Total	
	10 - 14		15 - 19		N	%
	N	%	N	%		
SIM	3	10,0	9	30,0	12	40,0
NÃO	3	10,0	15	50,0	18	60,0
Total	6	20,0	24	80,0	30	100

DSTs : Doenças Sexualmente Transmissíveis

Por sua vez, a análise da tipagem molecular do vírus de acordo com a história de DST prévia (Tabela 2) revela que o tipo indeterminado incidiu em 11 (31,4%) casos, mostrando significância estatística em relação à frequência de todos os tipos de papilomavírus, exceto ao 6b, 11 e 53, que apresentaram 6 (17,1%), 3 (8,6%) e 3 (8,6%) casos respectivamente. No entanto, a comparação entre o tipo indeterminado com todos tipos moleculares de papilomavírus identificados não mostrou significância estatística ($p > 0,05$) mesmo quando essa análise levou em consideração apenas os casos positivos com história de DSTs prévias.

Tabela 2 – Distribuição da frequência dos casos DNA – HPV positivos X DSTs prévias

Diagnóstico do Papilomavírus (PCR-RFLPs)	Sim		DST Prévias Não		Total	
	N	%	N	%	N	%
6b	3	8,6	3	8,6	6	17,2
11	3	8,6	0	0,0	3	8,6
53	1	2,8	2	5,8	3	8,6
61	0	0,0	1	2,8	1	2,8
CP141	0	0,0	1	2,8	1	2,8
CP8304	0	0,0	1	2,8	1	2,8
Indeterminado	5	14,3	6	17,1	11	31,4
16	0	0,0	2	5,8	2	5,8
33	0	0,0	2	5,8	2	5,8
51	1	2,8	0	0,0	1	2,8
58	0	0,0	1	2,8	1	2,8
66	0	0,0	1	2,8	1	2,8
IS39	1	2,8	0	0,0	1	2,8
LVX100	0	0,0	1	2,8	1	2,8
Total	14	39,9	21	59,9	35	100

DSTs – Doenças Sexualmente Transmissíveis.

PCR-RFLPs : Polimerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia) – Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).

Analisando o uso de métodos contraceptivos e o diagnóstico do papilomavírus (Tabela 3), observa-se que, entre os casos positivos, um terço (10=33,3%) não utilizou nenhum meio contraceptivo, seguido pelo método hormonal (8=26,7%), de barreira (7=23,3%) e, em menores frequências, os demais métodos sem mostrar diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), quando comparados.

Tabela 3 - Distribuição da frequência das pacientes testadas para HPV, segundo o meio contraceptivo utilizado

CONTRACEPTIVOS	Diagnóstico do Papilomavírus (PCR-RFLP)				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
	N	%	N	%		
Nenhum	10	33,3	34	41,9	44	39,6
Hormonal	8	26,7	10	12,3	18	16,2
Barreira	7	23,3	20	24,7	27	24,3
Natural	0	0,0	2	2,5	2	1,8
Outros Métodos	5	16,7	15	18,6	20	18,0
Total	30	100	81	100	111	100

Hormonal - Anticoncepção oral, injetável e implante

Barreira - Condon, Diafragma, Camisinha Feminina

Natural - Ritmo, Coito interrompido e Muco Cervical

Outros Métodos – Cirúrgico ou associações de meios

Nenhum - Não utiliza nenhum meio contraceptivo.

PCR-RFLPs : Polimerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia) - Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).

Em relação à utilização de drogas lícitas e ilícitas e ao diagnóstico do papilomavírus (Tabela 4), o consumo de álcool foi o mais freqüente entre as pacientes com diagnóstico positivo, incidindo em 6 (11,5%) casos, contra 4 (7,7%) casos de fumantes e 3 (5,8%) casos de drogas ilícitas, mas sem mostrar diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Distribuição da frequência das pacientes testadas para DNA-HPV, conforme o uso de drogas lícitas e ilícitas

USO DE DROGAS LÍCITAS E ILÍCITAS	Diagnóstico do Papilomavírus (PCR-RFLPs)					
	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
FUMO	4	7,7	14	26,9	18	34,6
ÁLCOOL	6	11,5	18	34,6	24	46,1
DROGAS ILÍCITAS	3	5,8	7	13,5	10	19,2
Total	13	25,0	39	75,0	52	100

PCR-RFLPs : Polimerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia) - Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).

O estudo dos achados citológicos em relação ao diagnóstico positivo para o papilomavírus (Tabela 5) revela que o achado mais freqüente foi o benigno com 97(40,4%) casos, seguido pelo normal 94 (39,2%), HPV 20 (8,3%), NIC I 14 (5,8%), ASC-US 11 (4,6%), AG-US 3 (1,2%) e NICIII com 1 (0,4%) caso. A análise estatística mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o achado citológico benigno e todos os outros achados, exceto em relação ao normal. Por sua vez, o total do achado de HPV foi estatisticamente significativo em relação ao total de achados de NIC III e AG-US ($p < 0,05$). Estudando somente os casos positivos para papilomavírus, verifica-se que não ocorreu significância estatística entre os achados citológicos quando comparados entre si ($p > 0,05$). Outrossim, saliente-se o fato de diferentes achados citológicos estarem presentes em uma mesma paciente.

Comparando as faixas etárias (entre 10-14 e 15-19 anos) em relação aos diferentes achados da citologia, não se observou significância estatística ($p > 0,05$). Entretanto, quando foram comparados os diferentes achados, independente da idade, foram mais freqüentes o benigno e o achado normal que os demais achados, mostrando significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Distribuição dos achados citológicos detectados nas adolescentes submetidas ao teste de DNA-HPV

ACHADOS CITOLÓGICOS	Teste de DNA-Papilomavírus - (PCR-RFLPs)					
	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Normal	23	9,6	71	29,6	94	39,2
Benigno	26	10,8	71	29,6	97	40,4
ASC-US	6	2,5	5	2,1	11	4,6
AG-US	1	0,4	2	0,8	3	1,2
Padrão HPV	8	3,3	12	5,0	20	8,3
NIC I	4	1,7	10	4,2	14	5,8
NIC III	0	0,0	1	0,4	1	0,4
Total	68	28,3	172	71,7	240	100

ASC-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado

AG-US - células glandulares atípicas de significado indeterminado

Padrão HPV - alterações celulares do papilomavírus humano

NIC - neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, II e III).

PCR-RFLPs : Polimerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia) – Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).

Os achados citológicos e os tipos moleculares do papilomavírus estão na Tabela 6, onde se pode verificar que o tipo indeterminado apresenta maior frequência (20=29,4%) em relação a todos os tipos de vírus, inclusive com significância estatística ($p < 0,05$), exceto em relação ao tipo 6B, o qual apresentou uma frequência de 11 (16,1%) casos. Por sua vez, considerado um determinado tipo molecular do vírus e comparando os diferentes achados citológicos, não se observou associação significativa entre o tipo viral e o achado da citologia ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Distribuição dos achados citológicos por tipo de HPV

Tipos de Papilomavírus PCR-RFLPs	Achados Citológicos													
	Normal		Benigno		ASC-US		AG-US		Padrão HPV		NIC 1		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
6B	4	5,8	5	7,3	1	1,5	1	1,5	0	0,0	0	0,0	11	16,1
11	1	1,5	3	4,4	0	0,0	0	0,0	1	1,5	1	1,5	6	8,9
53	3	4,4	2	2,9	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	6	8,9
CP8304	0	0,0	1	1,5	1	1,5	0	0,0	1	1,5	0	0,0	3	4,4
CP141	0	0,0	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,5
Indeterminado	8	11,7	9	13,2	0	0,0	0	0,0	2	2,9	1	1,5	20	29,4
16	2	2,9	1	1,5	0	0,0	0	0,0	1	1,5	0	0,0	4	5,9
33	1	1,5	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2,9
51	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	1	1,5	1	1,5	3	4,4
58	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,5	1	1,5	3	4,4
61	0	0,0	1	1,5	1	1,5	0	0,0	1	1,5	0	0,0	3	4,4
66	1	1,5	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2,9
IS39	1	1,5	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2,9
71 (LVX100)	1	1,5	1	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2,9
Total	23	33,8	26	38,3	6	9,0	1	1,5	8	11,9	4	6,0	68	100

ASC-US - células escamosas atípicas de significado indeterminado

AG-US - células glandulares atípicas de significado indeterminado

Padrão HPV - alterações celulares do papilomavírus humano

NIC - neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, II e III)

PCR-RFLPs: Polimerase Chain Reaction (R. de Polimerase em Cadeia) Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorf. de comprim. de fragm. de restrição).

Os achados colposcópicos anormais, associados ao diagnóstico molecular do papilomavírus, estão distribuídos na Tabela 7. Considerando apenas os casos positivos, evidencia-se que o achado de condiloma foi o mais freqüente (30=10,4%), entretanto, quando comparado com os demais achados, mostrou diferença significativa ($p<0,05$) somente em relação ao achado colposcópico anormal ausente (5=1,7%). O achado de zona iodo-negativa foi o segundo mais freqüente com 29 (10,1%) casos, seguido do epitélio branco 23 (8,0%) e micropapilas 18 (6,2%) casos, entretanto esses achados não mostraram diferença estatística significante ($p>0,05$) em relação aos demais achados colposcópicos. Envolvendo o total de achados colposcópicos entre pacientes com diagnóstico positivo e negativo, o achado mais freqüente foi a zona iodo-negativa (83=27,3%), mostrando significância estatística em relação a todos os achados da Colposcopia ($p<0,05$), exceto em relação ao epitélio branco ($p>0,05$). Em ordem decrescente de freqüência, a segunda maior incidência no total dos achados foi o epitélio branco com 70 (23,2%) casos, seguido do condiloma com 53 (17,3%) casos, micropapilas com 43 (14,2%) casos e os demais achados com freqüências inferiores a 3%.

Considerando o total de achados anormais, apenas entre as adolescentes HPV positivas, e comparando as faixas etárias (entre 10-14 e 15-19anos), observa-se que o grupo com idade compreendida entre 15 e 19 anos apresentou uma maior freqüência de achados colposcópicos anormais com significância estatística ($p<0,05$).

Tabela 7 - Distribuição dos achados colposcópicos nas pacientes testadas para DNA-HPV

Achados Colposcópicos Anormais	PCR/ Tipo HPV - (PCR-RFLPs)					
	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Ausente	5	1,7	27	9,3	32	11,0
Epit. branco	23	8,0	44	15,2	70	23,2
Micropapila	18	6,2	23	8,0	43	14,2
Condiloma	30	10,4	20	6,9	53	17,3
Zona Iodo Neg	29	10,1	51	17,6	83	27,7
Mosaico	3	1,0	3	1,0	6	2,0
Pontilhado	1	0,3	7	2,4	8	2,7
Queratose	2	0,7	1	0,3	3	1,0
Orif. Espess.	1	0,3	1	0,3	2	0,6
Total	112	38,7	177	61,2	289	100

Zona Iodo Neg. – Zona Iodo Negativa

Orif. Espess. – Orifícios Glandulares Espessados.

PCR-RFLPs : Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia) – Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).

A tabela 8 mostra a distribuição dos achados colposcópicos anormais segundo o tipo molecular do papilomavírus. O vírus classificado como “indeterminado” foi o mais freqüente com 31(27,7%) casos, seguido do 6B com 25 (22,3%), do 53 com 13 (11,6%), do 11 com 10 (8,9%) e os demais atingiram freqüências inferiores a 10 casos. Esse tipo mais freqüente foi estatisticamente significativo em relação a todos os tipos moleculares ($p < 0,05$), exceto ao 6B ($p > 0,05$). Por sua vez, o achado de condiloma com 9 (8,0%) casos e sua associação com o tipo molecular 6B não mostrou significância estatística ($p > 0,05$) em relação aos demais achados, apesar de ter somado uma maior taxa. A segunda maior freqüência de achado colposcópico foi a zona iodo

negativa com 6 (5,3%) casos, seguido do epitélio branco com 4 (3,6%) casos, mas a exemplo do condiloma não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) em relação aos achados restantes. Quanto ao tipo molecular indeterminado, as maiores freqüências de achados colposcópicos anormais foram epitélio branco e zona iodo negativa, ambos com 7 (6,2%) casos, seguido do condiloma com 6 (5,3%) casos e micropapilas com 5 (4,5%) casos. A comparação entre esses achados não mostrou diferença estatística significativa ($p>0,05$). Levando em consideração os tipos moleculares: indeterminado e o 6B e suas presenças em achados colposcópicos anormais mais freqüentes (condiloma, zona iodo negativa e epitélio branco), não se verificou significância estatística ($p>0,05$) com essas associações.

Tabela 8 – Distribuição dos achados colposcópicos anormais por tipo de HPV

Tipos de Papilomavírus PCR-RFLPs	Achados Colposcópicos Anormais																				
	Ausente		Epitélio Branco		Micropapila		Condiloma		Zona Iodo Negativa		Mosaico		Pontilhado		Querato se		Orif. Gland. Espessados		Total		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
6B	0	0,0	4	3,6	3	2,7	9	8,0	6	5,3	1	0,9	0	0,0	1	0,9	1	0,9	25	22,3	
11	0	0,0	3	2,7	1	0,9	3	2,7	3	2,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	8,9	
53	0	0,0	2	1,8	2	1,8	4	3,6	3	2,7	1	0,9	0	0,0	1	0,9	0	0,0	13	11,6	
CP8304	0	0,0	1	0,9	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	2,7	
CP141	0	0,0	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	3,6	
Indeterminado	4	3,6	7	6,2	5	4,5	6	5,3	7	6,2	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0	31	27,6	
16	0	0,0	2	1,8	1	0,9	3	2,7	2	1,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	7,1	
33	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	2	1,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	3,6	
51	0	0,0	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	3,6	
58	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,9	
61	0	0,0	1	0,9	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	2,7	
66	0	0,0	0	0,0	1	0,9	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	2,7	
IS39	0	0,0	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,9	
71 (LVX100)	0	0,0	0	0,0	1	0,9	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,8	
Total	5	4,5	23	20,5	18	16,1	30	26,8	29	25,9	3	2,7	1	0,9	2	1,8	1	0,9	112	100	

PCR-RFLPs: Polimerase Chain Reaction (R.de Polimerase em Cadeia) -Restriction Fragment Polymorphisms (Polimorf. de comprim.de fragm. de restrição)

5. Discussão

A infecção genital pelo HPV, detectada prospectivamente através da reação de polimerase em cadeia (PCR) entre as cento e onze adolescentes no presente estudo, atingiu uma taxa de 27%. Encontra-se entre o intervalo de 13% a 38% citado por Moscicki (1997), representando a análise de estudos de diversos autores em população de adolescentes e é inferior à taxa de 45,3% descrita por Brown *et al.*, 2005, em estudo com mulheres adolescentes americanas, utilizando a técnica de PCR. Fica evidente, portanto, que a taxa de vinte e sete por cento aqui encontrada é considerada elevada, e, coloca esse tipo de infecção virótica como uma das mais prevalentes doenças sexualmente transmissíveis, aspecto que está de acordo com a literatura vigente (SHEW & FORTENBERRY, 2005; BROWN *et al.*, 2005).

A frequência de infecção pelo HPV de 21,6%, observada na faixa etária compreendida entre 15 e 19 anos, no presente estudo, é próxima daquela descrita por Melkert *et al.* (1993) que é de 18% e, segundo Schiffman & Brinton (1995), esse achado sugere que a infecção ocorre mais frequentemente logo após o início da atividade sexual. E, para Collins *et al.* (2005), essa proximidade do primeiro intercurso sexual com a menarca (intervalo de tempo inferior a três anos) oferece risco maior para a infecção pelo HPV. Também deve ser levado em consideração o período de incubação do vírus, a partir do contato, que é de dois a seis meses, podendo se prolongar a vinte e quatro meses (MOSCICKI, 1997). O fato de 18% das pacientes desse estudo apresentar sexarca no intervalo entre 16 e 19 anos, vem reforçar o achado da maior frequência de mulheres adolescentes infectadas na faixa etária acima citada (KOUTSKY, 1997; MAUAD & TRAITMAN, 2001).

Mulheres de cor parda foram maioria entre as infectadas pelo HPV, fato

que revela um maior contingente de mulheres com essa característica demográfica na área de abrangência desse estudo, é resultante da miscigenação de raças durante a formação da população do Nordeste brasileiro (RIBEIRO, 1995; PENA, 2000).

Considerando que a maioria das pacientes com diagnóstico positivo para o HPV era solteira, perfazendo um índice de 23,4%, mesmo assim esse achado não traduziu significância nesse estudo. O fato de ser solteira, obviamente, pode favorecer a oportunidade de múltiplos parceiros e, portanto, a possibilidade de múltiplas infecções, fato que não ocorreu nessa casuística. Pois, a maioria das pacientes com diagnóstico positivo tinha parceiro único, resultado semelhante ao citado por Moscicki (1997), sobre a tendência de as mulheres mais jovens terem relacionamentos monogâmicos. No entanto, refere o mesmo autor a tendência de seus parceiros masculinos ter múltiplas parceiras, um fato frequentemente desconhecido por elas e que amplia o risco de adquirir a infecção pelo HPV e outras DSTs.

A gestação não se constituiu, isoladamente, um fator de risco para a infecção pelo HPV. Entretanto, os 11,7% de grávidas com diagnóstico positivo devem ser levados em consideração, visto que a gestação, em muitos casos, torna-se a oportunidade única para o acesso da mulher ao exame preventivo do câncer do colo uterino e para a identificação através da citologia e colposcopia dos casos assintomáticos dessa infecção (CUZICK *et al.*, 1998; FERRIS, 2001; JASTREBOFF & CYMET, 2002). Outro aspecto relevante é que a gravidez é uma condição propícia para a recrudescência de condilomas genitais, onde há uma resposta imunológica diminuída para o HPV (FRANCO, 1997). A associação do HPV à gravidez propicia risco de transmissão do vírus

ao feto (denominada transmissão transplacentária) (XU *et al.*, 1998; KENG - LING, 2002; PENG *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2005), ao recém-nascido, mais comumente os tipos 6 e 11, de localização nas vias aéreas superiores, caracterizando o quadro de papilomatose laríngea (SHAH *et al.*, 1986; De PALLO *et al.*, 1996; OBCHINNIKOV *et al.*, 2004).

No total das investigadas, o vírus dos tipos 6 e 11 apresentaram frequências de 22,3 e 8,9 %, respectivamente, e associados aos diversos achados colposcópicos anormais. No entanto, por não se constituir em objetivo desse estudo a abordagem dos recém-nascidos das gestantes infectadas por esses vírus (16,6 %, sendo 3,3% do tipo 11 e 13,3 % do tipo 6), não foi realizada.

O nível de escolaridade no presente estudo foi considerado baixo entre aquelas com diagnóstico positivo, o maior grau observado foi do nível superior, sendo que o maior percentual (20,7%) foi do nível fundamental, resultado semelhante foi obtido na Colômbia por Molano *et al.* (2002) que revela o nível educacional das pacientes jovens infectadas pelo HPV como secundário e que, associado a outros fatores, representa risco determinado para essa infecção.

No presente estudo, a infecção genital pelo HPV mostrou uma significativa associação com outras modalidades de doenças sexualmente transmissíveis (DST) prévias. É um achado que encontra suporte no estudo de Ford *et al.* (2003) que encontraram uma associação entre *Neisseria Gonorrhoeae* e HPV. Em estudo mais recente, Rose *et al.* (2005) na Nova Zelândia encontraram associações do HPV com várias DSTs como: *Chlamydia*, *Gonorréia*, *Sífilis* e *Trichomoníase*. E as adolescentes com comportamento sexual de alto risco são mais susceptíveis a múltiplas infecções (BRABIN *et al.*,

2005). Apesar da transmissão do HPV ser possível através da via não sexual, é através do coito o seu principal modo de contágio, fato que o caracteriza também como DST (KJAER *et al.*, 2001; MOSCICKI *et al.*, 2000), como se registrou, em rastreamento citológico anual, a presença da infecção viral pelo HPV aproximadamente três anos após o primeiro intercuro sexual (LEUNG *et al.*, 2005; MOSCICKI, 2005). Admitem, ainda, McCOOK, (2002) e Samoff *et al.* (2005) a associação entre a infecção por chlamydia e o câncer cervical, devido a um efeito dessa infecção na persistência do HPV de alto risco. A ausência de significância entre DSTs prévias e os diferentes tipos moleculares de vírus observados nesse estudo teve como fator limitante o pequeno número de pacientes (quatorze) que referiram esse passado mórbido. Igualmente, concorda-se que a ampliação da amostra em estudos futuros possa proporcionar análises mais consistentes em relação a esse parâmetro.

O uso de contraceptivos não influenciou significativamente a presença de infecções pelo HPV entre as adolescentes desse estudo. O percentual de 23,3% entre aquelas que utilizaram método de barreira (Condom, Camisinha feminina) ficou próximo dos 33,3% daquelas que não se utilizaram de nenhum método, bem como dos 26,7% que utilizaram somente o anticoncepcional oral (ACO). Analisando o princípio que rege o mecanismo de ação do método de barreira, vê-se que teoricamente seria esperada uma redução na taxa de infecção entre as utilizadoras desse método, visto que há o impedimento do contato direto entre as mucosas dos genitais durante o ato sexual. Entretanto, convém considerar as falhas inerentes ao método além da sua utilização irregular e inadequada que, inclusive, pode ser negado pela própria paciente ou apenas utilizado com o fim contraceptivo, no final do ato sexual. Por sua vez,

aquelas que utilizaram apenas para a contracepção o método de barreira ficaram mais bem desprotegidas, permitindo o contato direto entre a mulher e os parceiros infectados pelo HPV, facilitando o contágio. Entretanto, deve ser salientado que o processo de instalação da infecção de qualquer natureza no colo uterino de mulheres adolescentes sofre influência de fatores inerentes à fase da vida dessas mulheres, como os seguintes: há um predomínio de epitélio colunar na ectocérvice (SINGER, 1975); ocorre substituição do epitélio colunar dando origem à zona de transformação que se reconhece como metaplasia escamosa (TUBAKI, 2000); surgem alterações imunológicas no colo representadas pela redução do padrão imunológico celular local com queda dos linfócitos T (CD4 e CD8) e dos macrófagos na região do ectrópico (De LUCA BRUNIRI *et al.*, 1994). Igualmente, considerando os conhecimentos atuais do papel que desempenham as citocinas na defesa contra a infecção pelo HPV, modulando a replicação viral, bem como, polarizando a resposta imune com padrões Th1 e Th2 (Zur HAUSEN, 2002; FERNANDES *et al.*, 2005). Fato que demonstra ser a instalação da infecção pelo HPV no colo de mulheres adolescentes algo mais complexo, envolvendo possivelmente maior interação multifatorial. Apesar da literatura relatar que a utilização em longo prazo de ACO aumenta o risco de verrugas genitais causadas pelo HPV, (DALING *et al.*, 1986; FRANCESCHI *et al.*, 2003) e, segundo Franco (1997), esse achado seria provavelmente mediado através de reduzida resposta imune ao vírus, pelas pacientes consumidoras de ACO. Saliente-se que, nesse estudo não se constatou o predomínio de adolescentes infectadas pelo HPV, utilizárias de ACO em relação aos outros métodos contraceptivos.

Nesse estudo, o álcool foi a droga que mostrou maior associação com pacientes HPV positivas, todavia sem significância em relação ao tabagismo e às drogas ilícitas. No entanto, a literatura mostra uma associação significativa, entre a quantidade de ingestão de álcool e o risco de verrugas genitais (BAIRATI *et al.*, 1994).

O total da taxa de lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL = NIC I + Padrão HPV), encontrada no presente estudo (14,1%) foi superior àquela do Colégio Americano de Patologistas que foi de 2,2%, mesmo quando se consideraram apenas as pacientes com teste DNA-HPV positivo, onde essa taxa caiu para 5,0%. Esse maior percentual do nosso estudo pode estar associado à condição imunológica da adolescente que, ao contrário da mulher adulta e com muitos parceiros, não desenvolve uma imunidade adequada frente a esse vírus (MOSCICKI, 1997; MOSCICKI, 2001). Um estudo de sequenciamento das variantes genômicas dos HPVs demonstrou que essas infecções poderão seguir três cursos: as transitórias, em 50% dos casos; as com aparecimento de lesões que podem regredir espontaneamente, em 30 a 50% dos casos; e as que evoluirão para lesões persistentes, mesmo após tratamento. São essas últimas que persistem e resistem aos tratamentos convencionais, que passam a ser consideradas de alto risco para desenvolvimento de câncer (CAVALCANTI *et al.*, 2000). No estudo em foco, os quatorze tipos de HPV isolados e associados aos diferentes achados citológicos mostraram um perfil de vírus de baixo e alto risco oncogênico, sendo os de alto risco representados pelos tipos: 16, 33, 51, 58, 61, 66, IS39 e LVX100 e os de baixo risco para carcinogênese estão representados pelos tipos: 6B, CP141, 11, CP8304 e 53. Esses achados do nosso estudo foram

similares aos de Câmara *et al.* (2003), diferindo em alguns tipos presentes naquele estudo e ausentes no apresentado. Os tipos: 51, 61, IS39, LVX100, CP141 e indeterminado foram identificados apenas nesse trabalho. O tipo de HPV LVX100 encontrado no presente estudo foi reconhecido por Terai & Burk (2002) como HPV 71 e refere-se a um tipo de risco intermediário. Descrevem Chan *et al.* (2002) a presença de genótipos incomuns de HPV e prevalentes nas pacientes chinesas atendidas em clínicas de DSTs, em Hong Kong, dentre eles, o LVX1000 (HPV71). Este genótipo foi identificado também entre as índias da Amazônia (ONG *et al.*, 1996). Outro tipo relatado por Chan *et al.*, (2002) é o CP8304 num percentual de 2,2% em seu estudo e, paralelamente, obtivemos uma cifra de 4,4% desse genótipo, dentre as HPV-positivas. No entanto, nessa população estudada, o maior percentual foi o tipo indeterminado, cuja determinação molecular encontra-se assim referida em estudos de Rosenfeld *et al.*, 1989, Lungu *et al.*, 1992, e Weleer *et al.*, 1993, que demonstraram que a maioria dos tipos de HPV-DNA cai sob as categorias não tipáveis ou incapaz de especificar o tipo e pode incluir uma associação de vírus de alto e baixo risco. O que catalogamos como indeterminado, Frederiksson *et al.*, 1996, também obteve nos seus dados por PCR e considera em seu estudo a denominação de “UNI” (HPV positivo, mas não testado pelo tipo específico). E, mesmo submetendo suas amostras de fragmentos de tecido, com diagnóstico de NIC e neoplasia invasora incluídas em parafina, ao *Dot Blot* após o PCR, Rabelo-Santos, 1999, obteve um percentual de 7,2% de casos positivos, porém ainda não identificados os tipos virais com as sondas utilizadas e que denominou de HPV “X”. Resultando em novas propostas estratégicas para efetivação de exames realizáveis e rápidos, a partir do uso de

múltiplos *Primers* de Sequenciamento Tipo-Específicos (GHARIZADEH *et. al.*, 2005). Esse tipo rotulado como indeterminado no presente estudo, além de mais incidente, mostrou significância em relação à maioria dos vírus tipados, exceto ao 6B. Por sua vez não houve nenhum achado citológico que apresentasse uma associação significativa com esse tipo de vírus mais prevalente: indeterminado. Igualmente, deve-se salientar que a literatura tem reportado algumas associações entre o tipo de vírus e achados citológicos como os tipos: 6B, 11, 16, 33, 51 e 58 com a NIC (De VILLIERS, 1994), aspecto aqui também observado em relação aos tipos: 11, 51 e 58, mas sem significância.

O achado de condiloma mostrou uma associação significativa com a presença do HPV no colo uterino apenas quando foi comparado com o achado colposcópico anormal ausente. No entanto, ao se considerar o tipo de HPV-DNA e a sua associação com os achados da Colposcopia não se obteve nenhuma significância que relacionasse os tipos virais mais freqüentes como o 6B e o indeterminado. Resultado semelhante foi obtido por Perovic *et al.*, 2002, onde referem que a despeito de certas divergências, não tem sido provado que a relação entre achados colposcópicos e o tipo de HPV-DNA tenha qualquer importância estatística.

Contudo, ressalte-se que os testes de DNA-HPV podem ser realizados rotineiramente para identificação do vírus, utilizando a técnica de PCR-RFLP, nas pacientes atendidas no Laboratório da UFAL e noutros centros de análises clínicas. A presença de vírus de alto risco oncogênico na população estudada e a associação entre o vírus aqui reconhecido como tipo indeterminado, demonstram a importância de aperfeiçoar e associar outras técnicas de

Biologia Molecular conjuntamente, para a obtenção de um diagnóstico mais específico. Utilizar apenas uma técnica pode significar em resultado falso-positivo ou negativo; e, se complementadas as informações, melhor se contribuirá com o arsenal propedêutico para a prevenção do câncer do colo uterino, diante dessas mulheres infectadas pelo HPV e que constituem um grupo de alto risco, as adolescentes.

A ausência do câncer invasivo cervical associado à infecção pelo HPV, constatada nesse estudo, ratifica ser previsível o controle epidemiológico da doença, dentre outros, através da inclusão do método biomolecular para identificação do vírus e seu potencial oncogênico. Permitindo assim sua utilização em programas de saúde pública que visam a redução da mortalidade entre essas mulheres (SHEW et al., 2006). Em virtude da elevada taxa de infecção genital pelo HPV detectada entre as mais jovens sexualmente ativas no presente estudo, evidencia-se a necessidade de uma melhor assistência medico-ginecológica e laboratorial a essa população e reafirmar como um grupo prioritário para promoção da saúde das adolescentes no nosso meio.

6. Conclusões

A análise dos resultados obtidos no presente estudo nos permite concluir que:

- A taxa de infecção genital pelo HPV entre as adolescentes foi de 27%.
- Foram isolados os seguintes vírus de alto risco oncogênico: 16, 33, 51, 58, 66, IS39, CP8304 e 71(LVX100) e os seguintes de baixo risco: 6b, 11, 53 e CP141.
- O vírus representado pelo genótipo indeterminado (31,4%) corresponde ao grupo não especificado pelo método biomolecular utilizado, podendo-se tratar de um vírus de alto ou baixo risco oncogênico.
- A frequência de infecção genital pelo HPV entre as gestantes foi de 11,7%, sendo que a maioria encontrava-se no 2º. e 3º. trimestres da gravidez.
- A infecção genital pelo HPV foi mais freqüente entre as adolescentes com passado de doenças sexualmente transmissíveis.
- O uso de contraceptivos entre as adolescentes não mostrou associação com a infecção pelo HPV.
- O álcool foi a droga mais consumida entre as adolescentes infectadas pelo HPV.
- A taxa de lesão intra-epitelial de baixo grau entre as adolescentes infectadas pelo HPV foi de 5,0%.
- Não houve associação entre o tipo molecular do HPV e os diferentes achados citológicos entre as adolescentes infectadas.

- Não houve associação entre os achados colposcópicos e as infecções tipo-específicas do vírus.

7. Referências Bibliográficas

ABREU-E-LIMA, M.C.C. O Sistema Bethesda - Versão 2001 para o Diagnóstico Citológico Cervico-Vaginal:Grandes acertos e pontos polêmicos. Câncer - Hoje. **J Soc Bras Cancerol.** 39:4-5. 2001.

ALMEIDA, N.C. Brazilian cervical cancer control program. **19th Intern. Papillomavirus Conference.** p. 102. 2001.

ALVARENGA, G. C.; PASSOS, M. R. L.; PINHEIRO, M. S. Papilomavírus humano e carcinogênese no colo do útero. **J Bras Doenças Sex Transm.** 12:28-38. 2000.

BAIRATI, I.; SHERMAN, K.J.; McKNICHI, B., et al. Diet and genital warts: a case-control study. **Sex Transm Dis.** 21: 149-154. 1994.

BARRASSO, R.; GUILLEMOTONIA, A. Cérvix e Vagina Diagnóstico da Infecção pelo HPV. In GROSS, G. E., BARRASSO, R (eds). **Infecções por papilomavírus humano. Atlas Clínico de HPV.** Porto Alegre, ArtMed. p. 277-286. 1999.

BAUER, H.M.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.H.; GLASS, A.G.; RUSH, B.B.; SCOTT, D.R.; CADELL, D.M.; KURMAN, R.J.; MANOS, M.M. – Determination of genital human papillomavirus infection in low risk women in Portland, Oregon. **Sex Transmiss Dis.** 20:274-278. 1993.

BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M.; ONG, C. K.; VILLA, L. L.; DELIUS, H.; PEYTON, C.L.; BAUER, H.M. & WHEELER, C.M. Identification and Assessment of Known and Novel Human Papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction Fragment Length Polymorphisms, Nucleotide Sequence and Phylogenetic Algorithms. **J Infect Dis.** 170:1077-1085. 1994.

BEZNOS, G. W.; ALONSO, F. J. F.; CARVALHO, M. Z. M. HPV em Outras Especialidades - Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. In CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (eds). **I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano.** São Paulo, BG Cultural, p. 74-86. 2000.

BOARDMAN, L.A.; SATNKO, C.; WEITZEN, S.; SUNG, C.J., Atypical squamous cells of undertermined significance: human papillomavirus testing in adolescents. **Obstet Gynecol.** 105:741-6. 2005.

BOSCH, F.X.; MANOS, M.M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M.H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K.V.; Internacional Biological Study On Cervical Cancer Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst.** 87:796-802. 1995.

BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.M.; SHAH, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol.** 55:244-265. 2002.

BOSCH, F.X.; MUNOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res.** 89:183-190. 2002.

BRABIN, L.; FAIRBROTHER, E.; MANDAL, D.; ROBERTS, S.A.; HIGGINS, S.P.; CHANDIOK, S.; WOOD, P.; BARNARD, G.; KITCHENER, H.C. Biological and hormonal markers of chlamydia, human papillomavirus and bacterial vaginosis among adolescents attending genitourinary medicine clinics. **Sex Transm Infect.** 81:128-32. 2005.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196/96 Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. **Inf Epidem do SUS – Brasil.** 5:2. 1996.

BROWN, D.R.; SHEW, M.L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; JULIAR, B.E.; BREEN, T.E.; FORTYBERRY, J.D. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **J Infect Dis.** 15:182-92. 2005.

CAMARA, G.N.N.L.; CERQUEIRA, D.M.; OLIVEIRA, A.P.G.; SILVA, E.O.; BONFIM, P.R.; CARVALHO, L.G.S.; MARTINS, C.R.F. Prevalence of Human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Memórias do Instituto**

Oswaldo Cruz. 98:879-883. 2003.

CARR, J.; GYORFI, T. Human Papillomavirus – Epidemiology, Transmission and pathogenesis. **Clinics in Laboratory Medicine.** 20:235-255. 2000.

CARTIER, R. **Colposcopia prática.** São Paulo, Rocca, p.15-26, 1994.

CASON, J.; MANT, C.A. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. **J Clin Virol.** Mar. 32 Suppl 1:S52-8. 2005.

CAVALCANTI, S.M.; ZARDO, L.G.; PASSOS, M.R.; OLIVEIRA, L.H. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **J Infect.** 40:80-87. 2000.

CHANG, C.J.; SCHNEIDER, A.; SMITH, E.; BLETTNER, M.; WAHRENDORF, J.; TUREK, L. Longitudinal study of pregnancy and other factors on detection of HPV. **Gynecol Oncol.** 60:355-62. 1999.

CHANG, A.R. & KENG, L.W. Human papillomavirus (HPV) infection is sexually transmitted disease (STD). **I Hsueh Tsa Chih.** 22:409-15. 1999.

CHAN, P.K.; MAK, K.H.; CHEUNG, J.L.; TANG, N.L.; CHAN, D.P.; LO, K.K.; CHENG, A.F. Genotype spectrum of cervical human papillomavirus infection among sexually transmitted disease clinic patients in Hong Kong. **J Med Virol.** 68:273-7. 2002.

CHAOUKI, N.; BOSCHM F.X.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.L.M.; GUEDDARI, B.E.; GHAZI, A. E.; DEACON, J.; CASTELLSAGUÉ, X.; WALBOOMERS, J.M.M. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Marrocco. **Int J Cancer.** 75:546-554. 1998.

CHIRGWIN, K.D.; FELDMAN, J.; AUGENBRAUN, M.; LANDESMAN, S.; MINKOFF, H. Incidence of venereal warts in human immunodeficiency virus-infected and uninfected women. **J Infect Dis.** 172:235-8. 1995.

CLIFFORD, G.; SMITH, J.S.; PLUMMER, M.; MUNHOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human Papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **British J Cancer**. 88:63-73. 2003.

COLLINS, S.I.; MAZLOOMZADEH, S.; WINTER, H.; ROLLASON, T.P.; BLOMFIELD, P.; YUNG, L.S.; WOODMAN, C.B. Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study. **Int J Cancer**. 10;114:498-500. 2005.

CRUM, C.P.; NUOVO, G.J. Biology of Papillomaviruses. Genital Papillomaviruses and related neoplasms. New York, **Raven Press**. p.10-35. 1991.

CUZICK, J.; MEIJER, C.J.L.; WALBOOMERS, J.M.M. Screening for cervical cancer. **Lancet**. 351:1439-40. 1998.

De LUCA BRUNIRI, I.D.L.; FACHINI, V.; FILIPPESCHI, M.; BATTINI, L.; GIUSTI, G.; ROMANI, L.; SCIDA, P.; URBANO, M. Cell-mediated immunity in the course of cervical ectropion. **Clin Ex Obstet Gynecol**. 21:105-7. 1994.

DALING, J.R.; SHERMAN, K.J.; WEISS, N.S. Risk factors for condyloma acuminatum in women. **Sex Transm Dis**. 13:16-18. 1986.

De FRANCESCO, M.A.; GARGIULO F.; SCHREIBER C., CIRAVOLO G.; SALINARO F.; MANCA N. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. **J Med Virol**. 75:588-92. 2005.

DENG, D.; WEN, L.; WANG, Z.; ZENG, W.; LING, X. A study of human papillomavirus infection during pregnancy and transmission of virus to fetus. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue za Zhi**. 11:369-71. 2005.

De PALO, G.; STEFANAN, B.; PILOTTI, S. Infecção pelo papilomavírus. In De Palo, G. (ed). **Colposcopia e patologia do trato genital inferior**. Rio de Janeiro, Medsi. p.125-89. 1996.

DE VILLIERS, E.M. Human Papillomaviruses: an update. **Curr Top Microbiol Immunol.** 186:1-12. 1994.

DRAKE, M. Nomenclature of precancerous lesions of uterine cervix. **Acta Cytol.** 28:527-34. 1984.

FERENCZY, A. Clinician's perspectives on HPV testing. **17th International Papillomavirus Conference.** 43. 1999.

FERNANDES, A.P.M.; GONÇALVES, M.A.G.; DUARTE, G.; CUNHA, F.Q.; SIMÕES, R.T.; DONADI, E.A. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. **Virology.** 334:294-298. 2005.

FERRIS, D.G. Management of LSIL in Pregnant Women. **19TH Intern. Papillomavirus Conference.** 66-67. 2001.

FOCCHI, J.; BOVO, A.C.; SILVA, I.D.C.G. Papillomavírus Humano (HPV) **J SOGESP.** 10:61-2. 1999.

FORD, K.; REED, B.D.; WIRAWAN, D.N.; MULIANWAN, P.; SUTARGA, M.; GREGOIRE, L. The Bali STD/AIDS study human papillomavirus infection among female sex workers. **Int J STD AIDS.** 14:681-7. 2003.

FRANCESCHI, S.; CLIFFORD, G.; PLUMMER, M. Prospects for primary prevention of cervical cancer in developing countries. **Salud Publica Méx.** 45:430-436. 2003.

FRANCO, E.L.F. Epidemiologia das Verrugas Anogenitais e do Câncer. In LORINCZ, A.T.; REID, R. (eds). **HPV.** Rio de Janeiro, Interlivros. p.19-44. 1997.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; RICHARDSON, H.; ROHAN, T.; FERENCZY, A. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In FRANCO, E.L.; MONSONEGO, J. (eds). **New developments in cervical cancer screening and prevention.** London (U.K.). Blackwell. p. 14-22. 1997.

FRANCO, E.L.F.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Can Med Assoc J.** 164:1017-32. 2001.

FREDERIKSSON, A.; LARSON, B.; PERSSON, E. HPV-Types, cytological and histopathological findings in three groups of woman with possible HPV-related disease. **Acta Obstet Gynecol Scand.** 75:556-562. 1996.

GHARIZADEH, B.; OGGIONNI, M.; ZHENG, B.; AKON, E.; POURMAND, N.; AHMADIAN, A.; WALLIN, K.; NYRÉN, P. I.Type-Specific Multiple Sequencing Primers: A Novel Strategy for Reliable and Rapid. **J Mol Diagn.** 7:198-205. 2005.

IARC WORKING GROUP. Human papillomaviruses. **IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic risks to humans.** 64. Lyon: IARC, 1995.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso jan. 2005.

JASTREBOFF, A.M.; CYMET, T. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. **Postgrad Med J.** 78:225-228. 2002.

KAHN, J.A.; BERNSTEIN, D.I.; ROSENTHAL, S.L.; HUANG, B.; KOLLAR, L.M.; COLVER, J.L.; TISSOT, A.M.; HILLARD, P.A.; WITTE, D.; GROEN, P.; SLAP, G.B. Acceptability of human papillomavirus self testing in female adolescents. **Sex transm Infect.** 81:408-14. 2005.

KANATO, M.; SARANRITTICHAJ, K. Early experience of sexual intercourse – a risk factor for cervical cancer requiring specific intervention for teenagers. **Asian Pac J Cancer Prev.** 7:151-153. 2006.

KANESHIMA, E.N.; BIDOIA, C.C.G.; GABRIEL, M.; SUZUKI, L.E.; CONSOLARO, M.E.L. Aplicação do método PCR-FRLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum Maringá.** 23:731-737. 2001.

KASHIMA, H.K.; MOUNTS, P.; SHAH, K. Papilomatose Respiratória Recorrente. In LORINCZ, A.T; REID, R. (eds). **HPV**. Rio de Janeiro, Interlivros. p.113-19. 1997.

KJAER, S.K.; CHACKERIAN, B.; Van den BRULE, A.J.C., et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgin starting sexual activity (intercourse). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 10:101-106. 2001.

KENG-LING, W. HPV infection linked to oncogene amplifications in cervical tumors. **Int J Cancer.** 101:427-433. 2002.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am J Med.** 102:3-8. 1997.

LEUNG, A.K.; KELLNER, J.D.; DAVIES, H.D. Genital Infection With Papillomavirus in Adolescents. **Adv Ther.** 22:187-197. 2005.

LORINCZ, A.T. Métodos Moleculares para a detecção da Infecção pelo Papilomavírus humano. In LORINCZ, A.T; REID, R. (eds). **HPV**. Rio de Janeiro, Interlivros. p. 121-143. 1997.

LORINCZ, A. T., LORINCZ, A. T., HILDESHEIM, A., HERRERO, R. *et al.* Comparison of hibrid capture II HPV DNA detection and convencional PAP smear for cervical cancer screening in Costa Rica. **17th Internacional Papillomavirus Conference.** 26, 1999.

LUNGU, O.; WRITH Jr., T.C.; SILVERSTEIN, S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. **Molecular and Cellular Probes.** 6: 145-152. 1992.

MAUAD, L.M.Q.; TRAITMAN, P. Estudo do Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero no Município de Jaú - SP. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 23:609-610. 2001.

McCOOK, A. Chlamydia infection may boost cervical cancer risk. **Int J Cancer**. 101:371-374. 2002.

MEISELS, A.; FORTIN, R., Condylomatous lesions of the cervix and vagina: I. Cytologic patterns. **Acta Cytol**. 20:505-9. 1976.

MEISELS, A. FORTIN, R., Condylomatous lesions of the cervix and vagina: II: Cytologic, Colposcopic and histologic study. **Acta Cytol**. 21:379-83. 1977.

MELKERT, D.J.W.; HOPMAN, E.; Van Den BRULE, A.J.C. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. **J Cancer**. 53:919-923. 1993.

MOLANO, M.; POSSO, H.; WEIDERPASS, E.; VAN DEN BRULE, A.J.; RONDEROS, M.; FRANCESCHI, S.; MEIJER, C.J.; ARSLAN, A.; MUNOZ, N. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. **Br J Cancer**. 87:324-33. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde do jovem e adolescente. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso dez. 2004.

MONSONEGO, J.; BOHBOT, J.M.; POLLINI, G.; KRAWEE, C.; VINCENT, C.; MERINGARGUES, I.; HAROUN, F.; SEDNAOUI, P.; MONFORT, L.; DACHEZ, R.; SYRJANEN, K. Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. **Gynecol Oncol**. 99:160-8. 2005.

MOREIRA, A.J. Doenças Sexualmente Transmissíveis na Infância e Adolescência. In PASSOS, M.R.L. (ed). **DST**. Rio de Janeiro, Cultura Médica. p. 423-443. 1998.

MOSCICKI, A.B. Infecções HPV genitais em crianças e adolescentes. In LORINCZ, A.T; REID, R. (eds). **HPV**. Rio de Janeiro, Interlivros. p. 91-112. 1997.

MOSCICKI, A.B.; ELLENBERG, J.H.; VERMUND, S.H.; HOLLAND, C.A.; DARRAGH, T.; CROWLEY-NOWICK, P.A.; LEWIN, L.; WILSON, C.M.

Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls. **Arch Pediatr Adolesc Med.** 154:127-34. 2000.

MOSCICKI, A.B.; HILLS, N.; SHIBOSKI, S.; POWELL, K.; JAY, N.; DARRAGH, T.; PALEFSKY, J. Risks for incidence human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. **JAMA.** 285:2995-3002. 2001.

MOSCICKI, A.B.; SHIBOSKI, S.; HILLS, N.; POWELL, K.; JAY, N.; HANSON, E.N.; MILLER, S.; CANJURA-CLAYTON, K.L.; FARHAT, S.; BROERING, J.M.; DARRAGH, T. Regression of low-grade squamous intraepithelial lesions in young women. **Lancet.** 6; 364:1642-4. 2004.

MOSCICKI, A.B. Cervical cytology testing in teens. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 17:471-5. 2005.

MUNÓZ, N. Papillomavirus and Cancer: The epidemiological evidence. **J Clin Virol.** 19:1-5. 2000.

MUNOZ, N.; MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J.S.; SHAH, K.V.; MEIJER, C.J.; BOSCH, F.X.; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet.** 30; 359:1093-101. 2002.

MUNÓZ, N.; BOSCH, F.X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M. The International Agency For Reserarch on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papilomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **N Engl J Med.** 348: 518-27. 2003.

NETTO, A.R.; RIBALTA, J.C.L.; FOCCHI, J. A Dimensão da Prevenção e o Câncer do Colo Uterino. **Femina.** 34:87-9. 2006.

NUNEZ, J.T.; DELGADO, M.; GIRON, H.; PINO, G. Prostitution and other cofactors in preinvasive and invasive lesions of the cervix. **Aust N Z J Obstet Gynecol.** 44:239-43. 2004.

OBCHINNIKOV, Iu.M.; KISELEV, V.I.; SOLDATSKII, Iu.L.; ARTEM'ÉV, M.I.; ONUFRIEVA, E.K.; BARANOVSKII, P.M.; SHCHEPIN, N.V.; SMETANINA, S.E.; GASPARIAN, S.F.; STEKLOV, A.M. Prevalence of Human Papilomavirus types and their influence on the course of the disease in children suffering from recurrent respiratory papillomatosis. **Vestn. Otorinolaringol.** 3:29-33. 2004.

OKADA, M.M.K., GONÇALVES, M.A.G., GIRALDO, P.C. Epidemiologia e patogênese do papilomavírus humano (HPV). In CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (eds). **I Consenso Brasileiro de HPV - Papilomavírus Humano.** São Paulo, BG Cultural. p. 1-6. 2000.

ONG, C.K.; BERNARD, H.U.; VILLA, L.L. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. **J Infect Dis.** 173:516. 1996.

ORTH, G.; RICHART, R.M. In: GROSS, G. E.; BARRASSO, R. (eds). **Infecção por Papilomavírus Humano.** Porto Alegre, Artmed. p.1-16. 1999.

PAPANICOLAOU, G.N.; TRAUT, H.F. Diagnoses of uterine cancer by the Vaginal smear. New York: Commonwealth Fund, 1943 apud KOSS, L.G.; GOMPEL, C. **Introduction to gynecologic cytopathology with histologic and clinical correlations.** Baltimore, Willams & Wilkins. 1999.

PASSOS, M.R.L.; ALMEIDA FILHO, G.L.; LOPES, P.C. Papilomavírose Humana. **J Bras Doenças Sex Transm.** 1:27-35. 1989.

PENA, S. Retrato molecular do Brasil. In: SEMINÁRIO DE TROPICOLOGIA: O Brasil no limiar do século XXI. 2000. Recife-Pe. **Anais.** [prelo].

PENG, P.; WENG, X.; GU, Z. Detection of the asymptomatic infection by human papillomavirus in pregnant women and neonates. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.** 35:523-6. 2000.

PEREYRA, E.A.G.; TACLA, M. HPV na mulher – Colposcopia. In: **I Consenso Brasileiro de HPV.** São Paulo, BG Cultural, p. 17-33, 2000.

PEROVIC, M.; BERISAVAC, M.; KULJIC-KAPULICA, N.; JOVANOVIC, T. Correlation between atypical colposcopy findings and detection of human papillomavirus (HPV) infection of the uterine cervix. **Eur J Gynecol Oncol** 23:42-44. 2002.

PFISTER, H. Papel do Papilomavírus Humano no Câncer Anogenital. In LORINCZ, A.T.; REID, R. (eds). **HPV.** Rio de Janeiro, Interlivros. p. 3-18. 1997.

PINTO E SILVA, J.L.; SURITA, F.G.C. A Necessidade de Serviços de Saúde Reprodutiva Específicos para Adolescentes. **Femina.** 31:309-11. 2003.

PUROLA, E.; SAVIA, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. **Acta Cytol.** 21:26-31. 1977.

RABELO-SANTOS, S.H. **Prevalência de DNA-HPV em Neoplasias Cervicais Intraepiteliais e Invasoras em pacientes do Estado de Goiás.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. p. 91. 1999.

RAMALHO NETO, C.E. **Genome variability and population analysis in *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*.** Thesis presented in partial fulfilment towards the degree of Ph.D of the University of London-School of Life, Basic Medical & Health Sciences, Division of Life Sciences, London. p. 231. 1995.

RIBEIRO, D. **O Povo Brasileiro.** São Paulo. Companhia das Letras. p. 460. 1995.

RICHART, R.M.; BARRON, B.A. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. **Am J Obstet Gynecol.** 105:386-93. 1969.

RICHART, R.M.; PATTEN JR, S.F.; LEE, J.S.J. Perspectivas para a citologia automatizada. In LORINCZ, A.T; REID, R. (eds). **HPV.** Rio de Janeiro, Interlivros. p. 91-112. 1997.

RIETHMULLER, D.; SCHAAL, J.P.; MOUGIN, C. Epidemiology and history of genital infection by human papillomavirus. **J Cutan Med Surg.** 5:323-328. 2001.

RIOS, S.S. **Lesão intra-epitelial cervical: Abordagem Diagnóstica com Uso da Colpocitologia Oncótica e Colposcopia com Biópsia Dirigida.**

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. p. 74. 2004.

RISSER, W.L.; BORTOT, A.T.; BENJAMINS, L.J.; FELDMANN, J.M.; BARRATT, M.S.; EISSA, M.A.; RISSER, J.M. The epidemiology of sexually transmitted infections in adolescents. **Semin Pediatr Infect Dis.** 16:160-7. 2005.

ROSE, S.; LAWTON, B.; BROWN, S.; GOODYEAR-SMITH, F.; ARROLL, B. High rates of Chlamydia in referred for termination of pregnancy: treatment, contact tracing and implications for screening. **N Z Med J.** 118:1348. 2005.

ROSENFELD, W.D.; VERMUND, S.H.; WENTS, S.J. et. al. High prevalence of the human papillomavirus infection and association with abnormal Papanicolaou smears in sexually active adolescents. **Am J Dis Child.** 143: 1443-1447. 1989.

SALVÁ, A.R., ANGEL, A.E.A., ALONSO, P.M. GONZALEZ, C.V. Factors de riesgo del cancer de cervix en el municipio Cerro. **Rev Cubana Hig Epidemiol.** 37:40-6. 1999.

SAMOFF, E.; KOUMANS, E.H.; MARKOWITZ, L.E.; STERNBERG, M.; SAWYER, M.K.; SWAN, D.; PAPP, J.R.; BLACK, C.M.; UNGER, E.R.

Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in cohort of female adolescents. **Am J Epidemiol.** 1;162:668-75. 2005.

SANGUINETT, C.J. Rapid Silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques.** 17:915-19. 1994.

SANTOS, A.L.; DERCHAIN, S.F.; SARIAN, L.O.; MARTINS, M.R.; MORAIS, S.S.; SYRJANEN, K.J. Performance of Pap smear and human papillomavirus testing in the follow-up of women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 managed conservatively. **Acta Obstet Gynecol Scand.** 85(4):444-50. 2006.

SCHIFFMAN, M.H.; BRINTON, L.A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer.** 76:1888-901. 1995.

SCHIFFMAN, M.H.; CASTLE, P.E. Human Papillomavirus - Epidemiology and Health. **Arch Pathol Lab Med.** 127:930-934. 2003.

SEONG-BAE, P.; HWANG, S.; ZHANG, B.T. Classification of Human Papillomavirus (HPV) Risk Type via Text Mining. **Genomics & Informatics.** 1:80-86. 2003.

SHAH, K.V.; KASHIMA, H.; POL, B.F.; SHAH, F.; ABBEY, H.; ABRAMSON, A. Rarity of cesarean delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis. **Obstet Gynecol.** 68:795-9. 1986.

SHEW, M.L.; FORTENBERRY, J.D. HPV infection in adolescents: natural history, complications, and indications for viral typing. **Semin Pdiatr Infect Dis.** 16:168-74. 2005.

SHEW, M.L.; FORTENBERRY, J.D.; TU, W.; JULIAR, B.E.; BATTEIGER, B.E.; QADADRI, B.; BROW, D.R. Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. **Arch Pediatr Adolesc Med.** 160:151-6. 2006.

SILVA, C.S.; ADAD, S.J.; SOUZA, M.A.H.; BARCELOS, A.C.M.; TERRA, A.P.S.; MURTA, E.F.C. O Aumento da Frequência de Vaginose Bacteriana e *Chlamydia trachomatis* em Gestantes com Infecção pelo HPV. **Gynecol Obstet Investig.** 58:189-193. 2004.

SILVA, T.T. Papilomavírus: Testes Moleculares e Rastreamento do Câncer Cervical. **Femina.** 34:115-21. 2006.

SINGER, A. The uterine cervix from adolescence to from menopause. **Br J Obstet.** 82:81-99. 1975.

SYRJANEN, K.J. Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their association with genital squamous cell cancer. **APMIS.** 97:957-970. 1989.

TATTI, S.A.; BELARDI, G.; NARINI, M.A.; EIRIZ, A.; CHASE, C.A.; OJEDA, J.; GONZALEZ, S.; SALAS, C.; MORALES, E.; VILLA, L.L. Grupo Latino-Americano del HPV. Consenso en la metodología diagnóstica terapêutica para las verrugas anogenitais. **Rev Obstet Ginecol Latino-Americanas.** 59:117-131. 2001.

TERAI, M.; BURK, R.D. Identification and characterization of 3 novel genital human papillomaviruses by overlapping polymerase chain reaction: candHPV89, candHPV90 and candHPV91. **J Infect.Dis.** 15;185:1794-7. 2002.

TSENG, C.J.; LIANG, C.C.; SOONG, Y.K.; PAO, C.C. Perinatal Transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. **Obstet Gynecol Academic Press Inc.** 91:92-96. 1998.

TUBAKI, M.E. **Correlação colpo-cito-histológica da infecção pelo papilomavírus humano em adolescentes com atividade sexual.**

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 131. 2000.

TUREK, L.P. The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. **Advances in Virus Research.** Iowa. 44. p. 305-

355. 1994.

TUREK, L.P., SMITH, E.M. Programação genética dos papilomavírus humanos genitais na Infecção e no câncer. In: LORINCZ, A. T; REID, R. (eds). **HPV**. 3:147-170, Interlivros, 1997.

TYRING, S. K.. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis and host immune response. **J Am Acad Dermatol**. 43:S18-26. 2000.

Van RANST, M.; KAPLAN, J.B.; BURK, R.D. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. **J Gen Virol**. 73:2653-60. 1992.

VILLA, L.L.; Franco, E.L.F. Epidemiologic correlatos of cervical neoplasia and risk of human papillomaviruses infection in asymptomatic woman in Brazil. **Journal of the National Cancer Institute**. 81:332-340. 1989.

VILLA, L.L. Human papillomaviruses and Cervical. In: Advances in Cancer Research, **Ludwig Institute for Cancer Research, Academic Press**. p. 321-341. 1997.

VILLA, L.L. **Evolução do Diagnóstico Biomolecular - Testes DNA-HPV na prática** . Conferência no Campus Universitário. Universidade Federal de Alagoas (UFAL), promovida pelo GEMPRO – UFAL. Maceió, Alagoas, Brasil. 2000.

VILLA, L.L. **Papillomavírus humano e câncer do colo do útero**. Instituto Ludwig de Pesquisas sobre câncer. 2004. Site: <<http://hcan.org.br/outrasinfs/>> Acesso em: jan. 2005.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**. 189:12-9. 1999.

WEELER, C.B.; PARMENTER, B.S.; HUNT, W.C. *et. al.* Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal woman attending the University of New Mexico Student Health Center. **Sex Transm Dis.** 20:286-289. 1993.

WIELAND, U.; PFISTER, H. Papilomavírus em patologia humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In GROSS, G.E.; BARRASSO, R. (eds). **Infecção por Papilomavírus Humano**. Porto Alegre, Artmed. p. 1-18. 1999.

XU, S.; LIU, L.; LU, S.; REN, S. Clinical observation on vertical transmission of human papilomavirus. **Chin Med Sci.** 13:29-31. 1998.

ZEFERINO, L.C.; DORES, G.B.; NETO, J.E.; MAURO, R.L.P. Prevenção. In CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (eds). **I Consenso Brasileiro de HPV - Papilomavírus Humano**. São Paulo, BG Cultural. p. 135-140. 2000.

Zur HAUSEN, H. Papillomavirus Infections – a major course of human cancers. **Biochemical et Biophysical Acta.** 1288: 55-78. 1977.

Zur HAUSEN, H. Papillomaviruses in human genital cancer. **Med Oncol Tumor.** 4:187-92. 1986.

Zur HAUSEN, H.; De VILLERS, E.M. Papillomaviruses. **Annu Rev Microbiol.** 48:427-447. 1994.

Zur HAUSEN, H. Papillomavirus Infections – a major course of human cancers. **Biochemical et Biophysical Acta.** 1288: 55-78. 1996.

Zur HAUSEN, H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion from Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. **J. Nat. Cancer Inst.** 2:690-698, 2000.

Zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer.** 2:342-50. 2002.

Apêndices

APÊNDICE 1

SISTEMA DE BETHESDA 2001

TIPO DE ESPÉCIME: Indicar se a amostra foi obtida por método convencional ou em meio líquido.

ADEQUAÇÃO DO ESPÉCIME:

- Satisfatória para efeitos de avaliação (descreve a presença ou ausência do componente endocervical/zona de transformação/endocervical ou qualquer outro fator que limite a qualidade).
- Insatisfatório para avaliação (especificar a razão)
 - ◊ Espécime rejeitado/não processado (especificar a razão)
 - ◊ Espécime processado e examinado, mas insatisfatório para a avaliação da anormalidade epitelial devido a (especificar a razão)

CLASSIFICAÇÃO GERAL (opcional):

- Negativo para lesões intra-epiteliais ou malignidade
- Anormalidade de célula epitelial: ver interpretação/resultado (especificando se escamosas ou glandulares)
- Outra: ver interpretação/resultado (por exemplo, células endometriais em mulheres com mais de 40 anos de idade)

INTERPRETAÇÃO/RESULTADO:

Negativo para lesão intra-epitelial ou malignidade

Microorganismos:

- Trichomonas vaginalis
- Microorganismos fúngicos morfológicamente sugestivos de Cándida spp
- Alterações na flora sugestivas de vaginose bacteriana
- Bactérias morfológicamente de Actinomyces spp
- Alterações celulares consistentes com Herpes simplex vírus

Outros resultados não-neoplásicos (Opcional):

- Mudanças celulares reativas associadas com inflamação (incluindo reparo típico), radiação, dispositivo intra-uterino, células glandulares pós-histerectomia, atrofia

OUTROS: Células endometriais (em mulheres > 40 anos de idade)

ANORMALIDADES DE CÉLULAS EPITELIAIS:

CÉLULA ESCAMOSA

- Células escamosas atípicas
 - de significado indeterminado (ASC-US)
 - não se pode excluir HSIL (ASC-H)
- Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (inclui HPV/displasia leve/NIC1)
- Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (inclui displasia moderada e severa, carcinoma *in situ*/NIC 2 e NIC 3)
- Com características sus peitas de invasão (se houver suspeita de invasão)
- Carcinoma escamoso

CÉLULA GLANDULAR

- Atípica
 - células endocervicais (SOE ou especificar nas observações)
 - células endometriais (SOE ou especificar nas observações)
 - células glandulares (SOE ou especificar nas observações)
- Atípica
 - células endocervicais ou glandulares, favorecendo neoplasia
- Adenocarcinoma endocervical *in situ*
- Adenocarcinoma
 - endocervical
 - endometrial
 - extra-uterino
 - SOE

OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS (especificar):

APÊNDICE 2

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Obtenção das Amostras cervicais

(Procedimento descrito no Texto).

Isolamento do DNA

A extração do DNA das amostras de esfregaços foi realizada utilizando o protocolo do GFX™ Kit de purificação de DNA Genômico (Amersham Pharmacia Biotech). Os reagentes utilizados para este procedimento estão demonstrados na Tabela 9. No microtubo contendo a solução extratora de DNA e o esfregaço cervical da paciente, foram adicionados 500µL da solução extratora. Os tubos foram agitados por 3 vezes em vórtice e incubados por 10 min. Durante o período de incubação uma coluna de GFX (MicroSpin™ com matriz de fibra de vidro) foi colocada em um tubo de coleta (tubo de centrífuga sem tampa de 2 mL). Aproximadamente 500µL de solução contendo DNA total foram transferidos para a coluna GFX e o volume excedente colocado em freezer. A amostra foi centrifugada por 1 min a 8.000xg, restando o DNA na coluna, sendo o volume filtrado desprezado. A coluna foi colocada novamente no tubo de coleta. Foram adicionados 500µL da solução de extração e centrifugou-se por 1 min a 8.000xg, desprezando o volume restante que passou pela coluna. Em seguida, a coluna foi recolocada no tubo de coleta e foram adicionados 500µL da solução de lavagem. A amostra foi centrifugada por 3 min a 14.000xg, sendo desprezado o tubo de coleta. A coluna foi então transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 60 µL de TE a 70°C, ficando a

coluna em repouso por 1 min para possibilitar a passagem do DNA. Após centrifugação por 1 min a 8.000xg, a coluna foi desprezada, sendo obtido DNA puro.

Tabela 9 – Reagentes utilizados no isolamento de DNA e suas especificações.

<i>Reagentes</i>	<i>Especificação</i>
Tampão TE	Tris-EDTA
Solução de Extração	solução tamponada contendo detergente
Solução de lavagem	10mM Tris-HCl (pH 7,7) / 1mM EDTA
Etanol 100%	adicionado de acordo com protocolo do fabricante

Eletoforese do DNA em gel de agarose

Para constatar a presença de DNA na amostra foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (EtBr), utilizando o tampão de corrida TBE 1X, sendo aplicada uma corrente de 4v.cm^{-1} durante 1 hora (Fig. 11). Foram aplicados no gel 9 μL de DNA de cada amostra em um $1\mu\text{L}$ de tampão de corrida e um marcador de 1 kb (Life Technologies) foi utilizado para estimar o peso molecular da amostra. Os componentes das soluções empregadas nesta etapa estão apresentados na Tabela 10. A visualização das bandas de DNA foi realizada em transluminador de UV e o registro fotográfico utilizando o sistema digital kodak.

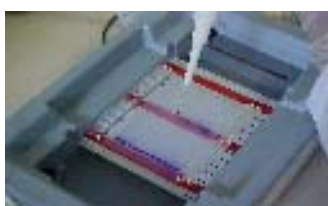


Figura 11. Aplicação das amostras de DNA genômico em gel de agarose a 0,8 % em tampão de corrida TBE 1X para posterior eletroforese.

Tabela 10 - Composição das soluções utilizadas no procedimento de eletroforese.

Soluções	Composição
Agarose 1,2%	1,2 g de agarose / 100 mL de tampão TBE 1X
Tampão TBE 1X	10,8g de Tris base / 5,5g de ácido bórico / 4 mL de EDTA a 0,5M / q.s.p 1000 mL de água destilada
Brometo de etídio (EtBr)	2 µL (10µg/µL)
Tampão de corrida	0,25% azul de bromofenol / 0,25% xileno cianol/ 40% de sacarose em água

Genotipagem do HPV através de PCR/RFLP

A técnica de PCR foi empregada para amplificar um fragmento de aproximadamente 450pb do gene L1 do DNA de HPV, utilizando os iniciadores MY09 e MY11, além dos iniciadores GH20 e PC04, controle interno da reação, os quais foram utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 268 pb do gene β -globina humano. Cada reação com volume final de 50µL continha tampão da Taq 1X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 2mM de MgCl₂ (Cenbiot, RS, Brasil), 200µM de cada dNTP's (Life Technologies), 5U Taq DNA polimerase (Cenbiot, RS, Brasil), 0,5µM de cada primer e 2µL (20-50 ng/50 µL) do DNA molde. A solução tampão utilizada na reação foi fornecida juntamente com a Taq DNA polimerase e contém os íons que otimizam as condições de reação.

A amplificação foi conduzida em termociclador (Mastercycler eppendorf) a uma temperatura inicial de desnaturação de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos que compreenderam o pareamento dos oligonucleotídeos a 55° C por 1 minuto, a polimerização das novas fitas de DNA viral a 72°C por 1 minuto e

desnaturação das fitas duplas a 94°C por 30 segundos, e logo após, extensão final durante 10 minutos a 72°C.

As amostras amplificadas foram visualizadas em gel de agarose 1,2%, após eletroforese a 56V durante 50 minutos, utilizando o cromógeno brometo de etídio que permitiu a visualização dos fragmentos amplificados. Para registrar o resultado obtido, cada gel foi fotografado utilizando uma máquina Kodac Digital Science™ DC40 (Camera for Windows and Macintosh Systems).

As amostras HPV positivas foram genotipadas através da comparação do padrão de bandas geradas a partir da análise do RFLP, onde foi realizada a digestão do produto de PCR utilizando as endonucleases de restrição *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*FI, *Pst*I, *Rsa*I, e *Sau*3AI. Cerca de 4,5 µL do produto de PCR foram adicionadas a sete microtubos de 0,6 mL, previamente identificados na seguinte seqüência: o primeiro, sem digerir (s/d), e outros seis com as seis primeiras enzimas, respectivamente. No oitavo tubo, correspondente à enzima *Sau*3AI, foram adicionados 4,0 µL do produto PCR, e 0,5 µL do tampão específico da enzima, React 4 (10mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 500 µg/mL BSA e 50% (v/v) glicerol). A todos os tubos foi adicionado 0,5 µL de cada uma das enzimas. As amostras foram incubadas durante um período de 12 horas a 37°C. Após digestão a reação foi interrompida pela adição de 0,5 µL de loading buffer.

Os fragmentos obtidos a partir das digestões enzimáticas foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Foi utilizada, para fins comparativos, uma amostra do DNA viral não digerida e padrão de peso molecular (100 pb). Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata seguindo etapas de fixação, coloração e revelação de acordo com o

protocolo descrito por Sanguinetti *et al.* (1994), a fim de revelar os diferentes padrões genéticos referentes a cada tipo de HPV.

O padrão genético de cada gel foi documentado utilizando o sistema fotográfico digital Kodak, na forma de arquivos JPG e comparados com os mapas de restrição dos diferentes tipos de HPV descritos por Bernard *et al.* (1994). As comparações foram realizadas em função do tamanho dos fragmentos de DNA polimórfico gerados pelos RFLPs. Em seguida, o gel foi envolvido em 2 folhas de papel celofane incolor e as bordas laterais no lado inferior da placa foram dobradas, eliminando eventuais bolhas. Em seguida o gel foi desidratado à temperatura ambiente por 24 horas. Após secagem, o material foi anexado ao livro de registros para consultas posteriores (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16).



Figura 12: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 16.

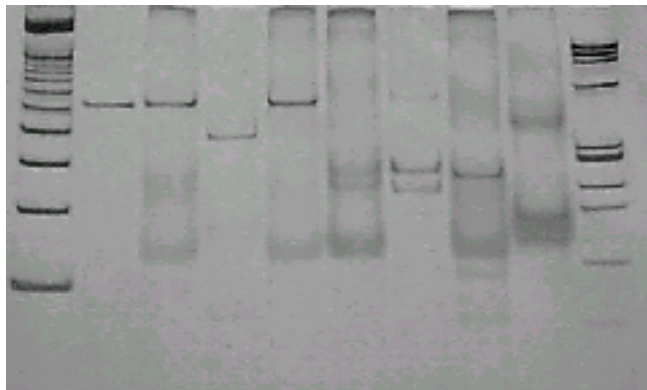


Figura 13: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 33.



Figura 14: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata mostrando um mapa físico do HPV 6b.

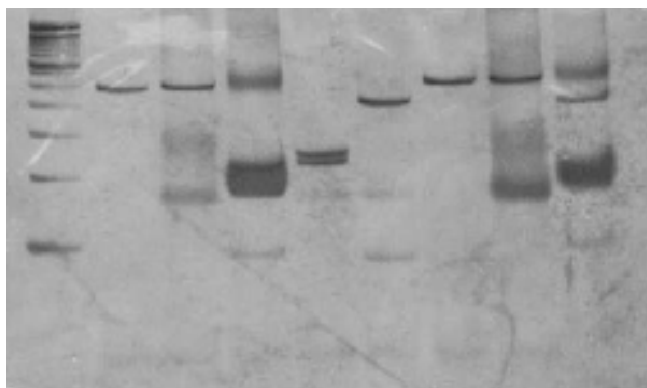


Figura 15: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata - HPV 53.



Figura 16: Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata mostrando um mapa físico de um tipo indeterminado.

Sequenciamento Automático do DNA viral

O sequenciamento automático do fragmento da região L1 do HPV de algumas amostras foi conduzido em um seqüenciador automático MegaBACE™ 1000 e as etapas para o sequenciamento foram realizadas em placa com 96 poços, com o objetivo de caracterizar o tipo de vírus identificado como indeterminado.

PCR para Incorporação dos cromóforos

Em cada poço da placa contendo o produto de PCR da amostra a ser seqüenciada foi preparada reação de PCR com volume final de 10,8 μ L utilizando o DNA viral amplificado, um dos oligonucleotídeos (MY11 ou MY09), DYEnamic ET kit e água milli-Q em quantidades apresentadas na Tabela 11. O DYEnamic ET kit possui os didesoxinucleotídeos terminadores corados com fluoresceína (substância fluorescente) e a termo sequenase II DNA polimerase, enzima especificamente construída para o sequenciamento de DNA.

Tabela 11 - Reagentes utilizados nas reações de sequenciamento.

<i>Reagente</i>	<i>Volume (μL)</i>	<i>Concentração Final</i>
Água Milli-Q	4,0	---
DYEnamic ET kit	4,0	---
Oligonucleotídeo (MY11 ou MY09)	0,8	1,8 μM
DNA viral amplificado	2,0	50-80 ng/10,8 μL
Volume Total	10,8	---

A PCR para o sequenciamento foi realizada em termociclador (PTC 100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.) utilizando a seguinte programação:

1 ciclo: 95°C por 2 segundos.

35 ciclos: a) 95°C por 10 segundos;

b) 50°C por 15 segundos;

c) 60°C por 1 minuto.

O DNA viral amplificado com os cromóforos incorporados foi precipitado de acordo com o protocolo descrito no manual do MegaBace1000, que seguiu os seguintes passos:

- a- Adicionou-se acetato de amônio (1 μL em cada poço) e centrifugou-se rapidamente a placa;
- b- Colocou-se 2,5 volumes de etanol absoluto e agitando-se 3 vezes em vórtice por 1 min;
- c- Cobriu-se a placa com papel alumínio e incubou-se por 15 min a temperatura ambiente;

- d- Centrifugou-se durante 45 min a 4000 rpm, a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante por inversão da placa, mantendo-a invertida;
- e- Adicionou-se 150 μ L de etanol 70% e centrifugou-se por 10 min a 4000 rpm, a temperatura ambiente;
- f- Descartou-se o sobrenadante por inversão da placa, mantendo-a invertida;
- g- Centrifugou-se rapidamente a placa invertida (900 rpm);
- h- Adicionou-se 10 μ L de tampão de formamida;
- i- Agitou-se vigorosamente em vórtice durante 3 minutos para dissolver o precipitado de DNA, seguido, de centrifugação rápida e conservação a -20°C .

Após a precipitação do produto de PCR foi realizado o sequenciamento de nucleotídeos. O MegaBACE™ 1000 realiza a eletroforese em capilares utilizando gel de poliacrilamida linear (LPA) sendo capaz de sequenciar 96 amostras em 2 horas. Durante o sequenciamento a máquina utiliza a excitação de um laser e um sistema de detecção óptica que excita e detecta fragmentos de DNA marcados com os cromóforos que migram durante a corrida eletroforética. Cada um dos quatro terminadores (ddG, ddT, ddA, ddC) têm aceptores diferentes corados ligados ao doador fluoresceína. Os aceptores emitem luz e seus comprimentos de ondas característicos são detectados pelo sistema de leitura do instrumento que transforma as informações obtidas em gráficos denominados eletroferograma (Figura 17). Detectores de fluorescência presentes nas máquinas de sequenciamento são controladas pelo computador, sendo a aquisição dos dados automatizada. O

MegaBACE funciona utilizando dois softwares importantes: *Instrument Control Manager (ICM)* e *Sequence Analyser*. O primeiro controla e otimiza todos os parâmetros da corrida, incluindo injeção da amostra, eletroforese, temperatura e reposição de matrix, edição dos parâmetros da corrida entre outras funções. O segundo, analisa os dados obtidos no sequenciamento ou exporta os dados para arquivos em outros formatos (Manual MegaBace, 2000).

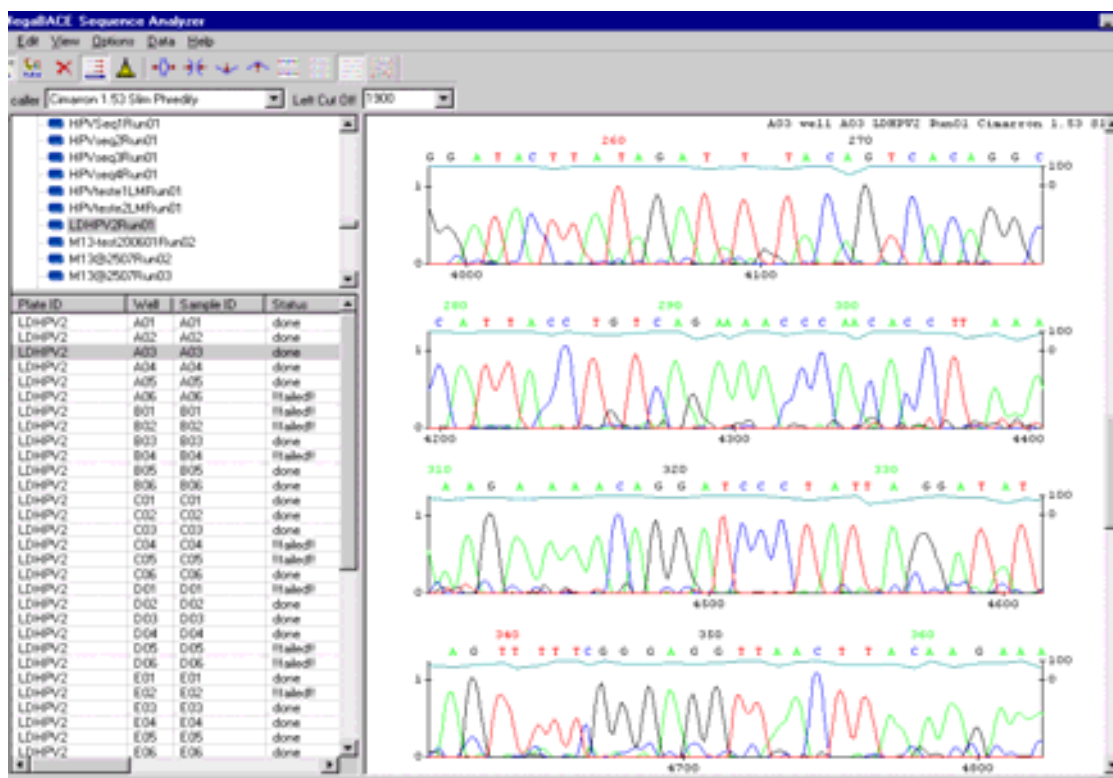


Figura 17 - Eletroferograma produzido pelo seqüenciador automático MegaBace 1000 durante a leitura dos nucleotídeos marcados com cromóforos.

Preparação do MegaBace para o Sequenciamento

Inicialmente, o seqüenciador foi preparado realizando-se uma pré-corrída, que consistiu em lavar as pontas dos capilares com água Milli-Q para retirar os resíduos de matriz LPA (poliacrilamida linear) de procedimentos anteriores. Após

a limpeza foi realizada a injeção da amostra. Para isso foi selecionada a opção injeção da amostra para que a placa contendo as amostras fosse colocada na gaveta do cátodo. Após a injeção, a placa foi retirada da gaveta e substituída por outra placa contendo tampão LPA.

Utilizando o software ICM do MegaBace1000, a placa de sequenciamento foi identificada e em seguida, foram selecionados os parâmetros para corrida eletroforética, voltagem de injeção das amostras 2 KV, voltagem de corrida 9 KV, temperatura de corrida 44°C, tempo de injeção das amostras 80 segundos, tempo de corrida 80 minutos, além dos parâmetros *ET termination* (opção padrão para o *Kit DYEnamic ET Terminator*), *Photomultiplier tube* (PMT1) 750 V, *Photomultiplier tube* (PMT2) 750 V e *Base Collor Cimarron 1.53 Slim Phredify*.

Análise das Seqüências no Programa BLAST

As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos da região L1 de HPVs obtidos por sequenciamento foram submetidas ao programa de busca de similaridade BLAST (ALTSCHUL *et al.*,1997) que realizou o alinhamento local de nucleotídeos das seqüências obtidas (Blastn), com seqüências similares do Banco de Dados Genético Internacional (GenBank), disponível na home page do National Center for Biotechnology Information (NCBI) – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Figura 18).



Figura 18 – Página principal do NCBI, Banco de Informações Genéticas utilizado para análise das seqüências de DNA, com acesso ao programa Blast .

pesquisadores, no entanto o mapa completo cita apenas os tipos que foram registrados no Banco Internacional de Dados. Acessando esses dados, obteve-se um resultado final registrado nos laudos do GEMPRO (Anexo 6). Das dezenove amostras cujo DNA não foi tipado, consideradas do tipo indeterminado, dezesseis delas foram submetidas ao Sequenciamento Automático e das quais apenas cinco tiveram seu tipo revelado junto ao Banco Internacional de Dados (Anexo 7), perfazendo uma cifra de 31,2% tipados após o Sequenciamento, enquanto as demais permaneceram como tipo indeterminado.

APÊNDICE 3

CLASSIFICAÇÃO COLPOSCÓPICA INTERNACIONAL (IFCPC, Roma, 1990)

1. ACHADOS COLPOSCÓPICOS NORMAIS

- Epitélio pavimentoso original
- Epitélio cilíndrico
- Zona de Transformação Normal

2. ACHA DOS COLPOSCÓPICOS ANORMAIS

1. Dentro da zona de transformação
 - Epitélio acetobranco*
 - Epitélioplano
 - Epitélio micropapilar ou microconvoluto
 - Pontilhado*
 - Mosaico*
 - Leucoplasia*
 - Área iodonegativa
 - Vasos atípicos
2. Fora da zona de transformação (ectocérvice, vagina)
 - Epitélio acetobranco*
 - Epitélioplano
 - Epitélio micropapilar ou microconvoluto
 - Pontilhado*
 - Mosaico*
 - Leucoplasia*
 - Área iodonegativa
 - Vasos atípicos

3. SUSPEITA DE CARCINOMA INVASOR

4. COLPOSCOPIA INSATISFATÓRIA:

Junção escamocolunar não visualizada
Inflamação grave ou atrofia grave
Colo não visível

5. ACHADOS VÁRIOS:

Micropapilas não-acetoreativas
Condiloma exofítico
Inflamação
Atrofia
Ulceração
Outros

* Indicar alterações maiores ou menores

Alterações menores

- Epitélio acetobranco fino
- Mosaico regular
- Pontilhado regular
- Leucoplasia tênue

Alterações maiores

- Epitélio acetobranco denso
- Mosaico irregular
- Pontilhado irregular
- Leucoplasia espessa
- Vasos atípicos

Anexos

ANEXO 1

DOENÇAS HPV-Induzidas x TIPOS VIRAIS Presentes.

DOENÇAS	TIPOS VIRAIS	
	+ Frequentes	- Frequentes
LESÕES ANOGENITAIS:		
Condiloma Acuminado	6 e 11	2, 16, 26, 30, 34, 40, 41, 42, 44, 45, 54, 55, 57, 61, 68 e 70.
Condiloma Plano	6 e 11	16, 18, 31 e outros.
NIC, NIV, NIVA, NIPA, PIN e NIA	6, 11, 16, 18 e 31	26, 30, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 69.
DOENÇAS MALIGNAS:		
Doença de BOWEN Cutânea	16	2, e 24.
Câncer Cervical	16, 18, 31, 33 e 45	6, 10, 11, 26, 35, 39, 42, 43, 44, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66, 68 e outros tipos não classificados.
Câncer Anogenital (não Cervical)	16	6, 11, 18, 31, 33 e 53.
Tu de BUSCHKE – LOWENTEIN	6 e 11	16

Adaptado de Shah KV. In: Carr, J, Gyorfí, T: Human Papillomavirus: Epidemiology, Transmission and Pathogenesis, 2000.

ANEXO 2

19.2 Folha de Rosto



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (verificar rubrica 2)

1. Projeto de Pesquisa: DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO GÊNITAL POR HIV ATRAVÉS DA PCR/RT-PCR EM ADOLESCENTES, ATENDIDAS NO SERVIÇO DE GINECOLOGIA E OBSTETRICA DO HU/UNICAMP.						
2. Área de Conhecimento (ver relação no verso)		3. Código: 7 03				
5. Área Temática (Opcional) (ver Programa no verso)		6. Categoria				
7. Função (Se Área Temática): (1) 1) (2) (3) (4)		8. 1) (2) (3) (4)				
8. Unicidade (3 opções): HIV, ADOLESCENTES, PCR						
SUJEITOS DA PESQUISA						
9. Número de sujeitos: 100 III. Grupo Expondo: 18 anos de Estado de Infecção Analisada (Pré-teste de Triagem) (Relatório Epidemiológico)						
10. Nº Centro: 010119 (Fundadores, Militares, Penitenciária, etc.) (1) Outros: () Não se aplica ()						
Total: 100						
PESQUISADOR RESPONSÁVEL						
11. Nome: LUISA DA SILVA FAROLO DE BARROS						
12. Identidade: 300100247869	13. CPF: 067998764-9	14. Endereço (Rua, nº): R. PROJ. WISDOMCATE, 31A	FAROLO			
15. Nacionalidade: BRASELEIRA	16. Profissão: MEDICA	17. CEP: 57082-900	18. Cidade: MARCELLO			
19. Estado: ESPRESSO	20. Cargo: MEDICA	21. Fone: 31-35716091	22. Fax: 31-34447			
23. Instituição que recebe: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS						
24. Assinatura: Luiza da Silva Farolo de Barros						
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO						
25. Nome: HOSPITAL UNIVERSITÁRIO						
26. Endereço (Rua, nº): AV. LAURIVAL NETO, S/N, F. 20, NOROESTE						
27. CEP: 52072-900				28. Cidade: MARCELLO	29. UF: GO	
30. Participação Externa: Sim () Não (X)				31. Fone: 3222494	32. Fax: 3222494	
33. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no final)						
34. Termo de Compromisso (do responsável pela instituição) (deverá ser colado e corrigido os registros do Res. CNPQ/05 e sua(s) complementação(s) e assinado este instituto com credencial de projeto, assinado no verso)						
35. Nome: Prof. João Márcio de Moraes Filho				36. Assinatura: [Assinatura]		
37. Data: 08/11/2002						
PATROCINADOR						
38. Nome:				39. Inscrição: Não se aplica ()		
40. Responsável:				41. CEP:	42. UF:	
43. Cargo/Função:				44. Fone:	45. Fax:	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP						
46. Data de Criação: 08/11/2002				47. Registro no CNPQ: 004088/2002-52	48. Data de Aprovação: 10/02/2003	49. Não Aprovado: ()
50. Relatório de Pesquisa: A CADA TRÊS MESES				51. Data: 10/05/2003		
52. Data: _____				53. Assinatura: [Assinatura]		
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP						
54. Nº Expediente: _____				55. Registro no CNPQ: _____		
56. Data: _____				57. Data: _____		

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió-AL, 10/02/2003

Senhor(a) Pesquisador(a) :

O Comitê de Ética na Pesquisa (CEP), reunido em 10/02/2003 e com base no parecer emitido pelo(a) relator(a) do processo nº 004008/02-52, sob o título DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO GENITAL PELO HPV ATRAVÉS DA PCR/RFLP EM ADOLESCENTES ATENDIDAS NO SERVIÇO DE GINECOLOGIA, de sua autoria, vem por este instrumento comunicar sua **aprovação**, com base no item VIII.13,b, da Resolução nº 196/96.

Outrossim, recomendamos a observância do que consta na folha de rosto com respeito ao cumprimento dos prazos para entrega de relatórios, bem como o atendimento da referida Resolução, sobretudo no que se refere aos itens III, IV e V, (*proteção ao sujeito*) e das demais Resoluções da CONEP/CNS, quando for o caso(*).

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais este Comitê coloca-se à disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra referidas.

(*). Áreas temáticas especiais.



ANEXO 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, concordo

em participar voluntariamente da pesquisa: “DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO GENITAL PELO HPV, através da PCR/RFLPS em adolescentes, atendidas na UFAL”. Fui informada que o estudo consistirá de exame ginecológico, com o objetivo de coletar material vaginal para identificação do sorotipo do HPV e exame citológico, colposcopia e, se necessário, biópsia, sem danos à minha saúde.

A identificação do vírus visa colaborar com o diagnóstico já estabelecido ou não por exames anteriores, como também orientar o acompanhamento clínico e previsão da evolução da infecção, através do reconhecimento de vírus de maior risco para o câncer genital.

Fui esclarecida também que, quando da apresentação dos resultados desta pesquisa, serão omitidos dados de identificação dos participantes.

Visto que nada tenho a me opor, concordo em participar, assinando este termo, sabendo que posso desistir do estudo, sem qualquer prejuízo em meu atendimento neste Hospital.

Maceió, ____/____/____.

Assinatura da Paciente

Assinatura do Pesquisador

Testemunha

Pesquisadora:

Luiza Daura Fragoso de Barros

Endereço: SERVIÇO DE GINECOLOGIA - Setor de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia - Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes - BR 104 - Km 97 - Tabuleiro do Martins - Tel : 33222244 - CEP 57061 - 970 - Maceió-Al.

ANEXO 5

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
DEPARTAMENTO DE TOCOGINECOLOGIA E PEDIATRIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Protocolo de Pesquisa: “**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO GENITAL PELO HPV, ATRAVÉS DO PCR-RFLPs ENTRE ADOLESCENTES, ATENDIDAS NA UFAL**”
Pesquisador – LUIZA DAURA FRAGOSO DE BARROS

Caso no. _____. Data de Coleta : ____/____/____. Prontuário : ____-____-_____.

NOME: _____

Endereço: _____

Fone : _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Cor: _____ Profissão: _____

1. Menarca : _____ anos. DUM : ____/____/____.

2. Sexarca : _____ anos.

3. EstadoCivil: 1 solteira 2 casada 3 viúva

4 separad 5 divorc 6 outros

4. Escolaridade : A - analfabeta E - 2º. grau completo

B - 1º. grau incompl. F - Superior incompl.

C - 1º. grau completo G - Superior completo

D - 2º. grau incompl.

5. No./parceiros (últim.5 anos): A- 1 parc B- 2-3 C- 4-5 D- \geq 6

6. DST prévia: Ignorado Não Sim Tempo _____ Qual(is)? _____

7. Anticoncepção: A-Horm B-Barreira C-Natural D-Cirúrg E-Nenhuma

8. Tabagismo: 1.Não 2. Sim 3. Ex-Tabagista Tempo _____

9. Uso de Álcool: Não Sim Tempo _____

10. Nº de gestações: A-nenhuma B-1-2 C-3-4 D- \geq 5 Últ. Parto__

11. Gestação Atual: IgTA _____ semanas IgUS corrigido _____ semanas

Edema: Não Sim Proteinúria: Não Sim P.A.: _____x _____mmHg

Medicação em uso (tipo, dose, duração): Não Sim Qual(is)? _____

Exames realizados : _____

Outras Patologias associadas : _____

12. Colpocitologia : Não Sim Data : ____/____/____.

Resultado: Amostra satisfatória limitada insatisfatória

Categorização:

- A- Normal** Alterações Benignas s/anormalidades de células epiteliais
 Flora: Lactob. Gardnerella Cocóide Tricom. Cândida Outras
- B- Alter. Celul. Benig./Reat.:** Inflam Repar Atrofia Irradiação Outras
- C- ASC-US:** Anormalidades Indeterminadas de Células Escamosas
- D- AG-US:** Anormalidades Indeterminadas de Células Glandulares
- E- NIC I** **H - Ca. Escamoso**
- F- NIC II** **I - Adenoca. Endocerv.**
- G- NIC III** **J - Adenoca. Endometr.**
- L- HPV:** Critérios citológicos sugestivos de HPV Não Sim
 Quais? _____

13. Colposcopia : Não Sim Data: ___/___/___.

Achados Anormais:

- A** - Epitélio aceto-branco **B** - Epitélio micropapilar **C** - Condiloma
D - Zona iodo-negativa **E** - Mosaico **F** - Pontilhado
G - Queratose **H** - Orif. gl. Espessados **I** - VV. Atípicos
J - HPV **L** - Ausentes

14. Histopatológico : Não Sim Data : ___/___/___.

Resultado: **A- Normal** **B- Cervic.Crôn.** **C- HPV** **D - NIC I**
E- NIC II **F- NIC III** **G- MicroCa** **H - Ca Inv.**
I - Outros Quais? _____

Critérios histopat. sugestivos de HPV : Não Sim Quais? _____

15. Captura Híbrida: Não Sim Data : ___/___/___ . Carga viral: _____

Resultado: Negativo Positivo **GRUPO :** _____

16. PCR – RLFPs: Resultado: Negativo Positivo **TIPO:** _____

17. Tratamentos Anter.: Não Sim Data : ___/___/___ . Qual (is)? _____

18. Imunoterapia: Não Sim Data : ___/___/___ . Qual? _____

ANEXO 6



GEMPRO - UFAL³
 Universidade Federal de Alagoas - UFAL
 Laboratório de Genética e Patologia - GEMPRO
 Fone: (33) 349-2222

LISTAGEM GERAL DOS RESULTADOS

CASO	PACIENTE	RESULTADO (PCR)	TIPO
1	V. A. S.	POSITIVO	HPV 6B
2	M. S. S.	NEGATIVO	
3	E. A. S.	NEGATIVO	
4	S. S. S.	NEGATIVO	
5	A. C. F. C.	NEGATIVO	
6	M. C. N.	NEGATIVO	
7	F. S. F.	NEGATIVO	
8	B. I. S. L.	POSITIVO	INDETERMINADO
9	C. P. S. I.	NEGATIVO	
10	J. S. B.	POSITIVO	HPV 11
11	T. M. S.	POSITIVO	HPV 18
12	W. O. L.	POSITIVO	HPV 33
13	S. T. S.	POSITIVO	HPV 16
14	C. R. C. S.	NEGATIVO	
15	A. M. M.	NEGATIVO	
16	A. M. L.	POSITIVO	HPV 6B + 53
17	E. N. S.	NEGATIVO	
18	I. S. P.	NEGATIVO	
19	S. S. O.	POSITIVO	HPV 51 + 11
20	R. C. S.	POSITIVO	HPV 11
21	B. M. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
22	M. D. S. I.	NEGATIVO	
23	F. A. V.	POSITIVO	HPV 1509
24	V. A. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
25	R. M. M.	POSITIVO	HPV 52 + 66
26	J. R. S.	NEGATIVO	
27	S. S. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
28	V. G. T.	POSITIVO	HPV 51 + CP8201
29	F. C. S. I. V.	NEGATIVO	
30	S. S. S.	NEGATIVO	
31	M. J. C.	POSITIVO	INDETERMINADO
32	W. D. S. O.	POSITIVO	HPV 6B + 53
33	V. M. S.	NEGATIVO	
34	A. S.	NEGATIVO	
35	J. B. S.	NEGATIVO	
36	R. F. A.	POSITIVO	HPV 6B
37	A. C. S.	POSITIVO	HPV 6B
38	V. P. C.	POSITIVO	HPV 6B
39	E. R. F. S.	NEGATIVO	
40	A. S. S.	NEGATIVO	
41	M. C. J. S.	NEGATIVO	
42	J. C. S.	NEGATIVO	
43	S. M. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
44	J. S. S.	NEGATIVO	

45	V R S	NEGATIVO	
46	A P G N	POSITIVO	INDETERMINADO
47	L A S	NEGATIVO	
48	I S S	POSITIVO	INDETERMINADO
49	R A A	NEGATIVO	
50	R S P	POSITIVO	HPV 16X100
51	C O L	NEGATIVO	
52	E S S	NEGATIVO	
53	M T R S	NEGATIVO	
54	A R S G	NEGATIVO	
55	S M T L		
56	A M J	NEGATIVO	
57	E E B S	NEGATIVO	
58	C I S	NEGATIVO	
59	R K S J	NEGATIVO	
60	A E S	NEGATIVO	
61	L M C		
62	R M S		
63	E C R	POSITIVO	INDETERMINADO
64	J S T	POSITIVO	HPV 38
65	I S T	NEGATIVO	
66	G K R S	NEGATIVO	
67	M I E		
68	J P S D	NEGATIVO	
69	R M A J		
70	J S M	NEGATIVO	
71	M L P	NEGATIVO	
72	L S L	NEGATIVO	
73	A C S	POSITIVO	HPV 33
74	J S S	NEGATIVO	
75	D M C S	NEGATIVO	
76	L V R S	NEGATIVO	
77	A C S	NEGATIVO	
78	M S N O	NEGATIVO	
79	I R S	POSITIVO	INDETERMINADO
80	J S	NEGATIVO	
81	A F S	NEGATIVO	
82	L S	NEGATIVO	
83	C P F S	NEGATIVO	
84	L B U	NEGATIVO	
85	G S A	NEGATIVO	
86	A A S	NEGATIVO	
87	J S I	NEGATIVO	
88	S R S	NEGATIVO	
89	J E S	NEGATIVO	
90	M W M	POSITIVO	HPV 11
91	D G S	NEGATIVO	
92	W K S		
93	C S M	NEGATIVO	
94	M M P S	NEGATIVO	
95	C J S		
96	J O G	NEGATIVO	
97	G R S	NEGATIVO	

98	G. M. T.	NEGATIVO	
99	A. M. S.	NEGATIVO	
100	J. F. S.	NEGATIVO	
101	D. G. M. S.	NEGATIVO	
102	J. M. L. S.	NEGATIVO	
103	V. R. S.	NEGATIVO	
104	K. P. S.	NEGATIVO	
105	L. S. L.	NEGATIVO	
106	A. J. S.	NEGATIVO	
107	K. S. S.	NEGATIVO	
108	E. C. S. S.	NEGATIVO	
109	P. G.	NEGATIVO	
110	G. K. C. S.	NEGATIVO	
111	M. A. S. S.	NEGATIVO	
112	E. M. S. S.		
113	N. R. J.	NEGATIVO	
114	D. A. S.	NEGATIVO	
115	M. S. S.	NEGATIVO	
116	M. J. S. T.	NEGATIVO	
117	P. R. S. F.	NEGATIVO	
118	F. G. M.	POSITIVO	INDETERMINADO
119	M. T. S.		
120	A. J. S. P.	NEGATIVO	



Denise Wanderlei, Ph.D.
CRB 052225-0

Dr. Carlos Wanderlei - PhD
Biology Molecular
CRB 052225-0

ANEXO 7



GEMPRO - UFAL[®]
 Universidade Federal de Alagoas - UFAL
 Lab. de Genética Molecular e Análises - GEMPRO
 Fone: (321) 9104-2032

LISTAGEM DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS

CASO	PACIENTE	RESULTADO (PCR)	TIPO
21	B. M. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
24	V. A. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
30	S. S. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
31	M. J. C.	POSITIVO	INDETERMINADO
36	R. F. A.	POSITIVO	HPV 611
37	A. C. S.	POSITIVO	HPV 618
38	V. P. C.	POSITIVO	INDETERMINADO
43	S. M. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
46	A. P. G. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
48	J. S. S.	POSITIVO	INDETERMINADO
50	R. S. P.	POSITIVO	HPV LXX100
63	B. S. R.	POSITIVO	INDETERMINADO
64	J. S. T.	POSITIVO	INDETERMINADO
73	A. C. S.	POSITIVO	HPV 33
90	M. W. M.	POSITIVO	HPV 11
118	R. G. M.	POSITIVO	INDETERMINADO


 Denise Wanderski, Ph.D.
 CRBio 052225-D

Drª Denise Wanderski - PhD
 Bióloga Molecular
 CRBio - 052225-D