
**O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E O CANCRO DO COLO DO ÚTERO:
UM ESTUDO OBSERVACIONAL ENTRE A CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO E
O TESTE DE DETECÇÃO DE HPV POR PCR**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Oncologia
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto e à Thomas Jefferson
University.

Orientador: Prof. Doutor Fernando Carlos de Landér Schmitt

CRISTINA MARIA DIAS DE CARVALHO

Porto, 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que (directa ou indirectamente) contribuíram para a realização desta tese, fundamental para o enriquecimento do meu conhecimento científico.

Ao Prof. Doutor Fernando Schmitt, meu orientador neste trabalho, um especial agradecimento, pelo seu apoio e orientação. Obrigado por toda a disponibilidade demonstrada para com a elaboração desta tese.

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, Director do Serviço de Anatomia Patológica e Director do Curso de Mestrado em Oncologia, um especial agradecimento pela disponibilização dos meios necessários no CHP-HSA e pelo incentivo à escolha do tema. Obrigado também por toda a disponibilidade, imensa ajuda e amabilidade.

A toda a comissão coordenadora do Curso de Mestrado em Oncologia, assim como a todos os docentes deste mestrado, pelo empenho demonstrado e excelente modo de transmissão dos conhecimentos científicos.

À Prof. Doutora Regina Silva, pelo incentivo, encorajamento e disponibilidade. Obrigado também por ter contribuído para o meu enriquecimento pessoal e profissional delegando em mim a tarefa de partilhar o meu conhecimento com os alunos do Curso de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Saúde e Tecnologia do Porto.

Aos meus alunos do Curso de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica pela marcante experiência de aprender com eles e para eles. São para mim fonte de motivação e inspiração na caminhada do conhecimento, a minha sincera gratidão.

Quero também agradecer à Técnica Adelaide Brito, coordenadora do serviço de Anatomia Patológica pela disponibilização dos meios necessários no serviço para a realização deste trabalho, assim como também pelas palavras de incentivo e prestabilidade.

À Paula Fonseca pela atenção, tempo e valiosas observações neste estudo, à Virgínia pela amizade, companheirismo, presença e coragem que transmite, à Carmo Campos pela enorme colaboração no serviço e palavras de confiança, ao Paulo Brochado pelas ajudas espontâneas.

Quero também expressar os meus sinceros agradecimentos à Ana Martins pela sua incansável partilha e ajuda nesta tese e pelo carinho e amizade que se reforçou neste período. Sem a tua disponibilidade teria sido mais difícil, um obrigado muito sincero!

À Luísa Nogueira pela colaboração e disponibilidade neste estudo.

À Joana Mendes pela disponibilidade, apoio e atenção.

Finalmente aos meus Pais pela ajuda no dia a dia e motivação para concluir esta prova.

Obrigado!

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	11
SUMMARY	15
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Perspectiva histórica	22
1.2. Estrutura e organização do genoma do <i>HPV</i>	27
1.3. O ciclo de vida do <i>HPV</i> e a infecção do epitélio cervical	29
1.4. O papel do <i>HPV</i> na carcinogénese do colo uterino	30
1.5. A detecção do <i>HPV</i> nas amostras de lesões do colo uterino	33
1.6. A citologia cérvico-vaginal e a terminologia das lesões do colo uterino	34
1.7. O teste de <i>HPV</i> como adjuvante para a citologia	37
1.8. Dados epidemiológicos sobre o cancro do colo do útero e o <i>HPV</i>	39
1.9. Factores de risco para o cancro do colo do útero	44
1.10. Desenvolvimento de estratégias e vacinas	45
2.OBJECTIVOS	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. Amostra	53
3.2. Especificações sobre a técnica de Citologia Líquida	53
3.2.1. Processamento – Amostras Ginecológicas	54
3.2.2. Coloração de <i>Papanicolaou</i>	54
3.3. Especificações sobre a técnica de <i>PCR</i>	56
3.3.1. Extracção de <i>DNA</i> – preparação de amostras	57
3.3.2. Amplificação do <i>DNA</i> por <i>PCR</i>	57
3.3.3. Detecção dos amplicons por <i>PCR</i> – hibridação de fase sólida	58

3.4. Análise estatística	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Caracterização da população em estudo	61
4.2. Citologias, testes moleculares e correlação dos dados	62
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ÍNDICE DE FIGURAS	89
ÍNDICE DE TABELAS	93

Lista de abreviaturas

ADC - Adenocarcinoma

ASC – Células escamosas atípicas

ASCCP - American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

ASC-H – Células escamosas atípicas não podendo ser excluída HSIL

ASC-US – Células escamosas atípicas de significado indeterminado

ASG – American Society of Gynaecology

ICC - Carcinoma cervical invasor

CCU – Cancro Colo Útero

CHP-HSA – Centro Hospitalar do Porto, Hospital Santo António

CIS - Carcinoma in situ

CMV - Citomegalovirus

CIN 1 ;2 ;3 – Neoplasia intra-epitelial cervical 1;2;3

CP – Conventional preparation

CT - *Chlamydia trachomatis*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E2F – Factor de transcrição E2F

FDA – Food and drug administration

H&E – Hematoxilina-eosina

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Vírus do Papiloma Humano

HSIL – Lesão pavimentosa intra-epitelial de alto grau

HSV – virus herpes simplex

IARC – Internacional Agency for Research on Cancer

IC – Internal control

ICO – Institut Català d' Oncologia

IPO – Instituto Português de Oncologia

LBP – Liquid-based preparation

LCR – Long control region

LSIL – Lesão pavimentosa intra-epitelial de baixo grau

mL - Mililitro

NILM – Negativo para lesão intra-epitelial ou neoplasia maligna

Nm - Nanómetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Open Reading Frames

Pap - Papanicolaou

PCR – Polymerase Chain Reaction

RNA – Ácido ribonucleico

RB – Retinoblastoma

RORENO – Registo Oncológico Regional do Norte

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SCC – Carcinoma Células Escamosas

TBS - The Bethesda System

pRB – proteína do retinoblastoma

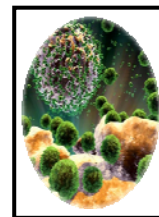
p53 – proteína 53

URR - Upper Regulatory Region

WHO – World Health organization

µL - Microlitro

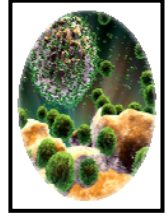
Resumo



OBJECTIVOS: o objectivo deste estudo observacional foi o de comparar os resultados obtidos na avaliação da citologia cérvico-vaginal em meio líquido com os respectivos resultados obtidos pelo teste *PCR* para detecção de *DNA* do *HPV*. MÉTODOS: foram analisadas 1570 amostras cérvico-vaginais em meio líquido (*ThinPrep*®) provenientes da consulta externa de Ginecologia do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto entre os meses de Janeiro e Dezembro de 2008, sendo os resultados relatados de acordo com a classificação de *Bethesda* de 2001. Paralelamente no restante líquido das amostras foi realizada a técnica de amplificação e detecção de *DNA* do *HPV* por *PCR* de acordo com o protocolo do sistema desenvolvido pela *GenoID*® *The HPV Diagnostics Company*. Realizou-se tratamento dos dados referentes à idade, informação clínica da requisição, resultado da citologia e do teste *PCR* para detecção de *DNA* do *HPV*. RESULTADOS: o teste de *PCR* detectou *HPV* de alto risco em 9,2% do total de amostras (145/1570). Das amostras classificadas como *NILM*, *ASC-US*, *LSIL* e *HSIL*, 6,4%, 20,0%, 62,2% e 85,7% apresentaram *HPV* de alto risco respectivamente. O carcinoma pavimentoso apresentou positividade para *HPV* de alto risco. Na nossa amostra a associação entre *HPV* de alto risco e *HSILs* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) bem como a associação entre a detecção de *HPVs* de alto risco/risco indeterminado e o diagnóstico de *ASC-US* ($p < 0,05$). Verificou-se ainda uma associação significativa entre a “inflamação” e a “presença de *HPV*” ($p = 0.003$) e o “desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana” e a “presença de *HPV*” ($p=0.006$). CONCLUSÃO: os resultados da nossa amostra seguem as tendências verificadas em estudos prévios realizados em amostras da Europa e América do Norte.

Palavras-chave: *HPV*, Cancro do colo do útero, Citologia em meio líquido, *PCR*

Summary



OBJECTIVES: The aim of this observational study was to compare the results obtained from the cytology evaluation of the cervico-vaginal liquid-based preparations and the PCR test results for HPV DNA. **METHODS:** We analyzed 1570 cervical liquid-based preparations (ThinPrep ®) from the Gynecology outpatient care of Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto between January and December 2008 and reported then according to the 2001 Bethesda classification. Alongside, the remaining of the liquid samples were used for PCR amplification and detection of HPV DNA according to the protocol of the system developed by GenoID ® The HPV Diagnostics Company. Data from the age, clinical information written in the forms, cytology and HPV DNA detection results were analysed. **RESULTS:** The PCR test detected high risk HPV in 9.2% of the total sample (145/1570). Of the samples classified as NILM, ASC-US, LSIL and HSIL, 6.4%, 20.0%, 62.2% and 85.7% had high-risk HPV, respectively. Squamous cell carcinoma was positive for high risk HPV. In our study sample, the association between high-risk HPV and HSILs was statistically significant ($p < 0.05$) as well as the association between the high risk/ undetermined risk HPV and the diagnosis of ASC-US ($p < 0.05$). We also found significant association between the variables “inflammation” and “presence of HPV” ($p = 0.003$), and “shift in flora suggestive of bacterial vaginosis” and “presence of HPV” ($p = 0.006$). **CONCLUSION:** The results of our sample follow the trends seen in previous studies carried out in Europe and North America.

Keywords: HPV, uterine cervix carcinoma, Liquid-based cytology, PCR

1. Introdução



Ao longo de mais de uma década de actividade como citotécnica do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santo António / Centro Hospitalar do Porto (HSA/CHP) assisti a progressos na área da citologia cérvico-vaginal, desde novas técnicas de processamento de amostras, ao sistema de relatórios de *Bethesda* e ao desenvolvimento de testes complementares à citologia.

Foi com entusiasmo que iniciei o ciclo de estudos do Mestrado em Oncologia, quer por gosto pessoal nesta área da ciência médica, quer pela oportunidade de aprender com referências a nível de clínica e de investigação nacionais.

O interesse no desenvolvimento de estratégias ao combate do cancro do colo do útero, a par do cancro da mama, são prioridade quer a nível nacional, quer a nível mundial. A aplicação do teste de detecção de *HPV* na prática clínica foi adoptada pela primeira vez numa Conferência de Consenso Nacional nos Estados Unidos, em *Bethesda* no ano de 2001. Sabe-se que aumenta a sensibilidade do rastreio do cancro do colo uterino como adjuvante à citologia mas o seu impacto a longo termo na morbilidade e mortalidade ainda aguarda aprovação. Apenas poucos estudos foram realizados a nível nacional.

Esta análise que vou apresentar surgiu paralelamente a um estudo de detecção de *HPV* realizado pelo departamento de Patologia Clínica do CHP-HSA durante o ano de 2008. Foi desta forma que me surgiu a oportunidade de correlacionar os dados do rastreio citológico com a biologia molecular.

Inicio este trabalho com um resumo da literatura sobre o cancro do colo do útero e *HPV*, quer a nível epidemiológico, quer a nível histórico.

1.1. Perspectiva histórica

A identificação do carcinoma invasivo do colo uterino sofreu um aumento significativo com a introdução das biopsias uterinas por *Ruge e Veit* em 1877. No final do século XIX, as características histológicas dos carcinomas pavimentosos invasivos foram bem ilustradas em alguns livros como os do autor *Amann*, publicados em 1897.

A origem do cancro invasivo foi estudada por *W.Schauestein*, um ginecologista austríaco, que publicou em 1908 um documento notável referindo a semelhança entre os padrões histológicos de cancros dos “epitélios de revestimento” (*Krebsbelag*, do original Alemão) e o “carcinoma pavimentoso infiltrante superficial” do colo uterino. Ele era da opinião de que o “epitélio de revestimento anómalo” mereceria o nome de cancro, pois era a fonte do “carcinoma infiltrante”. Estas observações foram consolidadas por *Pronai* em 1909 e *Rubin* em 1910 (Koss, 2006).

Este assunto foi extensamente considerado num grande livro de *Schottlander e Kermauner*, publicado em 1912, contendo uma análise detalhada de várias centenas de casos de cancros do colo uterino. Foram estes autores que utilizaram o termo carcinoma *in situ*, considerando a lesão como maligna. Apesar de na literatura americana atribuir o termo carcinoma *in situ* ao patologista *A.C. Broders* da *Mayo Clinic* num artigo publicado em 1932, ele não foi o primeiro a usar o termo (Koss, 2006).

Nos anos 20 e 30, dois ginecologistas alemães, *Walter Schiller* e *Robert Meyer* publicaram extensamente sobre a interpretação de biopsias cervicais e concluíram que de facto as lesões intra-epiteliais pré-cancerosas seriam precursoras do cancro cervical invasivo e poderiam ser identificadas ao microscópio. Contudo, dado que o comportamento das lesões pré-cancerosas se mostrava imprevisível, a controvérsia não cessou.

Em 1925 um ginecologista alemão, *Hinselmann*, ciente da incapacidade do olho humano para detectar cancros em estágio precoce, construiu um aparelho de ampliação, o colposcópico, para observar as alterações vasculares do colo uterino. Incapaz de convencer os conservadores patologistas alemães, criou um sistema de classificação de lesões em quatro grupos (*Rubriks*) para evitar o termo cancro. Infelizmente, os *Rubriks* incluíam uma variedade de achados desde simples metaplasias a carcinomas *in situ*, pelo que a classificação não obteve muito sucesso. Os *Rubriks* são como que reminiscentes das “classes” de *Papanicolaou*, que viriam a ser aplicadas aos esfregaços cérvico-vaginais muitos anos mais tarde (Koss, 2006).

A introdução da citologia cérvico-vaginal como meio de detecção de lesões pré-cancerosas do colo uterino tornou-se na pedra angular do estudo destas lesões por *Babés* e *Papanicolaou* em 1928. O nome do *Dr. George N. Papanicolaou* é sinónimo do método citológico de diagnóstico e detecção do cancro do colo uterino, e o seu enorme contributo foi honrado com o termo comum de “Pap smear”, ou seja, esfregaço de *Papanicolaou*. Todavia fora *Aureli Babés*, com contributo de *C.Daniel*, o primeiro a publicar em Janeiro de 1927 sobre a detecção de cancro do colo uterino através de um técnica citológica, usando uma ansa bacteriológica para colheita, metanol como fixador e *Giemsa* como coloração (Koss, 2006).



Figura 1- Da esquerda para a direita: *Johann Veit*, *Aureli Babés* e *Leopold G. Koss* (adaptado de Koss', 2006).

Shope e *Hurst* deram os primeiros contributos para a ciência sobre os vírus do papiloma humano (*HPV*) ao observarem a transmissão de papilomas da pele através de um extracto acelular entre uma espécie de coelhos selvagens, suspeitando que a doença pudesse ser causada por um vírus. Foram *Rous* e *Kidd* que, com a aplicação prévia de alcatrão, conseguiram infectar coelhos domésticos, geralmente resistentes ao vírus, concebendo então o “Papilomavírus” como um agente co-carcinogénico de lesões cutâneas invasivas e metastáticas.

Posteriormente *Hisaw e Hisaw* (1958) e *Sternberg* (1961) e *Hertig et al* (1983) descreveram respectivamente lesões invasivas do colo uterino e carcinoma *in situ* e lesões precursoras em macacos.

Há vários anos que se suspeitava da etiologia das verrugas vulgares cutâneas, conhecidas como *condylomata acuminata*, frequentes nos genitais externos, períneo e região peri-anal de homossexuais, mas apenas ocasionalmente observadas em mulheres e crianças, também na vagina e mais raramente no colo uterino.

A origem viral das *condylomata acuminata* recebeu mais aceitação após a observação de partículas virais nos núcleos de células epiteliais pavimentosas por microscopia electrónica. Os estudos sobre *condylomata acuminata* em veteranos que regressaram da Guerra da Coreia e suas esposas mostraram que esta doença sexualmente transmissível demora vários meses a desenvolver. Esta foi a primeira evidência de que os *HPVs* poderiam causar doenças no ser humano (Oriel, J.D., 1970).

Em 1956, *Koss e Durfee* cunharam o termo atipia coilócítica (do Grego, *koilos* = a oco e *Kytos* = a célula) para descrever grandes células pavimentosas, de núcleo aumentado, hiper cromático e de grande zona peri-nuclear clara ou “halo”, conhecidos actualmente como coilócitos (Figura 2). Posteriormente, através da microscopia electrónica, observou-se que os núcleos dos coilócitos continham partículas virais maduras e que os halos representavam um colapso dos filamentos citoplasmáticos ou necrose citoplasmática causada pela infecção viral. A presença destas células nos esfregaços observados por *Koss e Durfee* mostraram correlacionar com as anomalias histológicas de lesões pavimentosas assemelhando-se às verrugas cutâneas, e, deste modo designadas “lesões verrugosas”. Os coilócitos foram observados em papilomas pavimentosos do colo uterino classificados como condilomas (Oriel, J.D., 1970, Koss', 2006).

Estas células foram previamente descritas em 1949 e em várias publicações subsequentes por *J.Ernest Ayre*, que as chamou de “complexo celular pré-canceroso”, “células halo” ou “nearocarcinoma” (cancro precoce).

Meisels e Fortin (Canada, Dezembro de 1976) e *Purola e Savia* (Finlândia, Janeiro de 1977) publicaram documentos associando os condilomas e lesões pré-cancerosas similares do colo uterino ao “vírus verrugoso” (redenominado papilomavirus humano ou *HPV*).

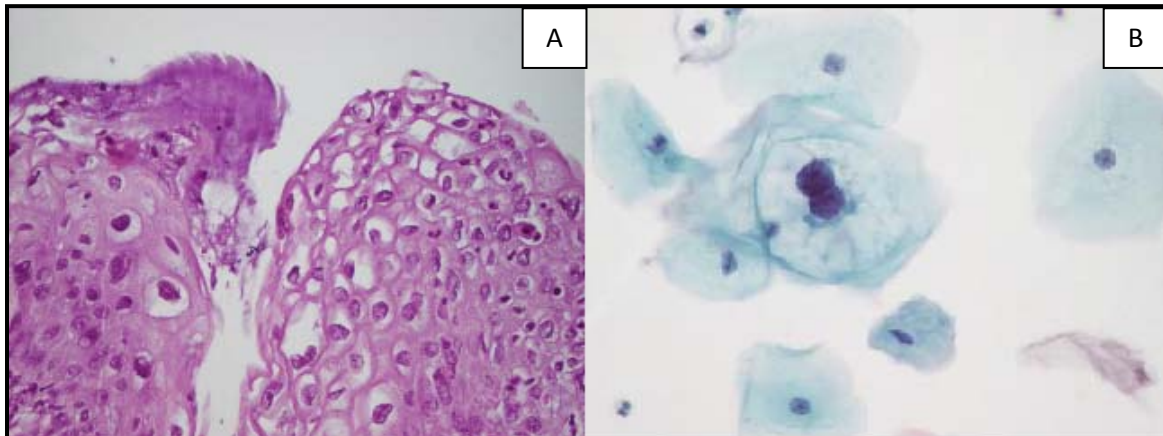


Figura 2 - Coilocitos observados em **(A)** biópsia do colo uterino [H&E, 40x] e **(B)** citologia cérvico-vaginal em meio líquido [Pap, 40x] (Fonte: Serviço de Anatomia Patológica, CHP-HSA, Portugal)

Laverty et al (Austrália, 1978) e *Torre et al* (Itália, 1979) observaram por microscopia electrónica, partículas consistentes com papilomavirus em lesões cervicais pré-cancerosas (Koss', 2006).

Ainda não foi possível suportar o crescimento dos *HPVs in vitro* em sistemas de cultura de tecidos. A evidência científica foi adquirida pela clonagem do *DNA* viral em plasmídeos e a análise do *DNA* viral por *Southern blotting* (zur Hausen, 1976).

Inicialmente a investigação com *zur Hausen et al.*, em 1972 procurou demonstrar, sem sucesso, sequências genéticas do vírus Herpes simplex 2 (*HSV2*) em células de carcinoma cervical humano. A atenção voltou-se então para o *HPV* e em 1974 com a entrada de *Gissmann* para o grupo foram conduzidos os estudos que levaram à identificação de diversos tipos de *HPV* e a sua estrutura fundamental em condilomas genitais e papilomas da laringe.

Foram os estudos destes dois investigadores que levaram á identificação dos dois tipos de vírus mais prevalentes do *HPV* (16 e 18) e ao estabelecimento do papel do *HPV* na carcinogénese do cancro do colo do útero (Figura 3).

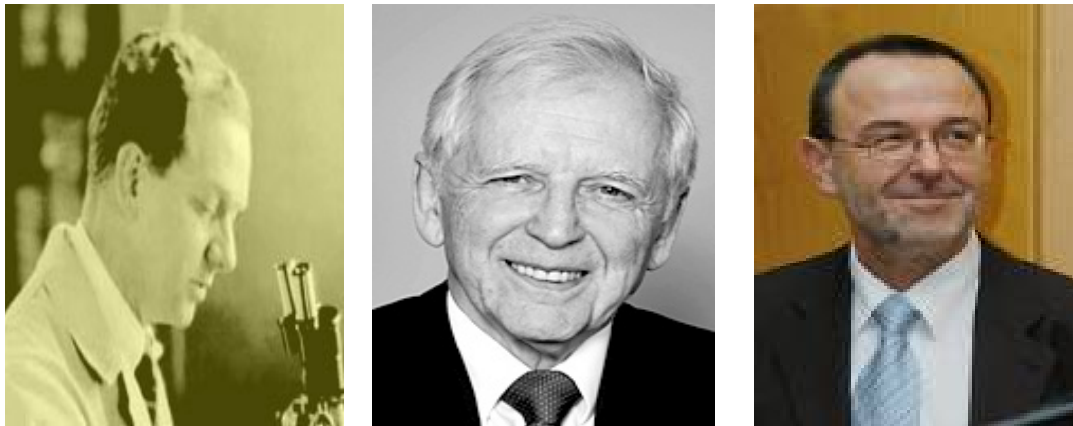


Figura 3 – Da esquerda para a direita: *Francis P. Rous, Harald zur Hausen e Lutz Gissmann* (adaptado de Koss', 2006).

Futuras contribuições conduziram ao desenvolvimento de vacinas contra este vírus. Em 2008 foi atribuído o prémio Nobel da Fisiologia e Medicina ao investigador principal, *zur Hausen*.

1.2. Estrutura e organização do genoma do HPV

Os HPVs são vírus de *DNA* de cadeia dupla (ds), relativamente pequenos (52-55 nm de diâmetro), de capsídeo viral icosaédrico, composto por 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais - L1 e L2 - sendo que a primeira corresponde a cerca de 80-90% do conteúdo proteico do vírus (Doorbar, 2006).

O genoma viral é constituído por cerca de 7.900 pares de bases (pb) distribuídos numa cadeia circular dupla que pode ser dividida em duas regiões codificantes e uma região não codificante (zur Hausen, 2002). As duas regiões codificantes são compostas por *open reading frames (ORFs)*, ou seja, sequências de *DNA* compreendidas entre um codão de iniciação (ATG) da tradução e um codão de terminação (Figura 4).

A expressão dos *ORFs* está intimamente dependente do programa da diferenciação da célula hospedeira, de modo que, a nível funcional, o genoma divide-se numa região precoce e numa região tardia, de acordo com o momento em que os genes respectivos são transcritos, durante o ciclo viral (Doorbar, 2006).

As *ORFs* de genes funcionais precoces (do inglês, *early*, E), E1 a E8, codificam proteínas envolvidas na transcrição, replicação, maturação viral e transformação celular. As *ORFs* dos dois genes que se expressam tardiamente (do inglês, *late*, L), L1 e L2, são responsáveis pela produção de proteínas estruturais necessárias para a produção do capsídeo. O gene L1 é altamente conservado entre os diferentes tipos de HPVs, enquanto o gene L2 é menos conservado, apresentando mais sequências variáveis.

O genoma do papilomavirus inclui ainda uma região regulatória, a *Long Control Region (LCR)*, também conhecida por *Upper Regulatory Region (URR)*, não codificante, de aproximadamente 100pb, localizada entre os genes L1 e E6, contendo o promotor p97 e sequências *enhancer* e *silencer* que regulam a replicação do *DNA* controlando a transcrição dos *ORFs* (Burd, 2003).

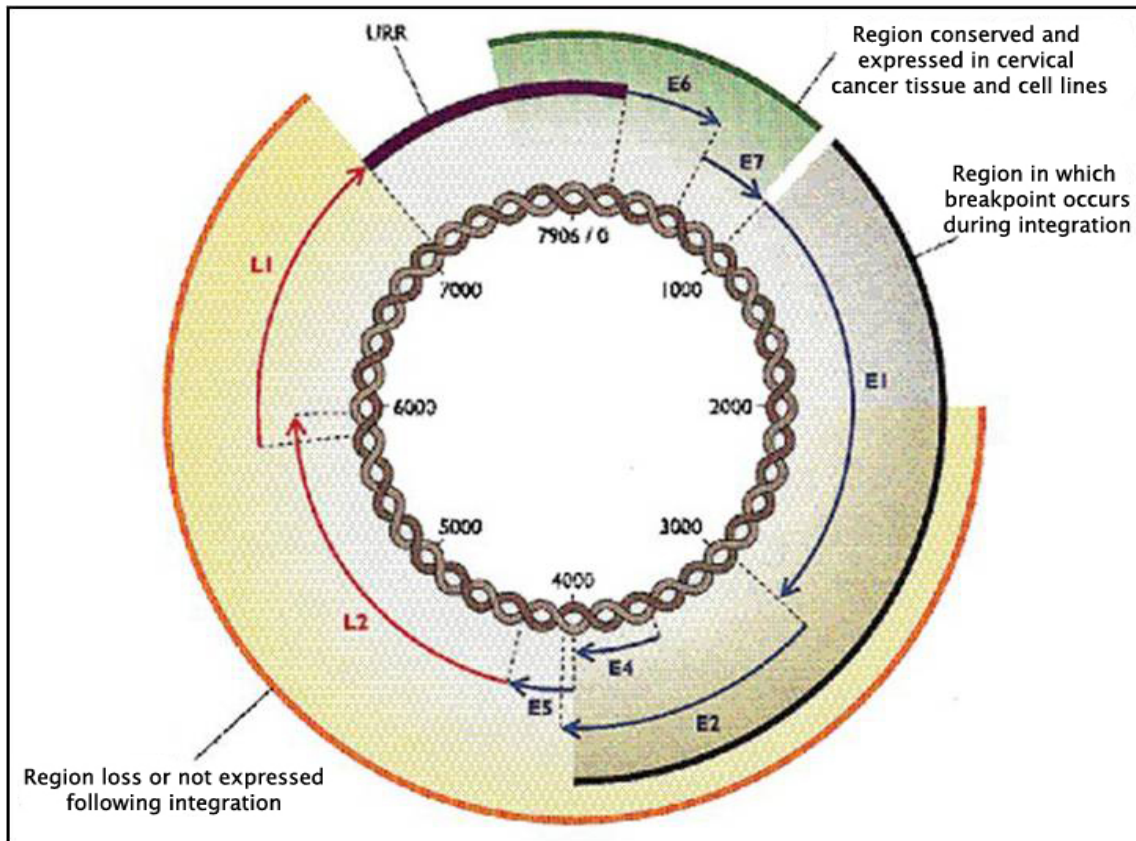


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do HPV, mostrando um *dsDNA* constituído aproximadamente por 7900 nucleótidos (centro do anel) e a posição das *open reading frames* (*ORFs*) E1-E7 e L1-L2 (anéis externos). (adaptado de Koss', 2006).

1.3. O Ciclo de vida do *HPV* e a infecção do epitélio cervical

O ciclo de vida dos *HPVs* ocorre nos núcleos das células epiteliais pavimentosas e depende de mecanismos de maturação epitelial ainda pouco conhecidos.

Quando ocorrem micro-traumatismos da mucosa cervical, com perda da integridade do epitélio de revestimento, os vírus ganham acesso às células basais (Fehrmann, Laimins, 2003, Stanley, M. A., 2009).

Os vírus adquirem a sua maturação total apenas nos núcleos de células que formam as camadas superficiais do epitélio pavimentoso, sendo este fenómeno conhecido por infecção permissiva. Os coilocitos são a expressão da infecção permissiva do *HPV* pois os seus núcleos estão cheios de partículas virais maduras ou virions.

Nas camadas basais do epitélio pavimentoso e noutros tipos de epitélio, os vírus não adquirem a sua forma madura e a sua presença apenas pode ser detectada pelo seu *DNA* (infecção oculta ou latente) (Vinokurova Svetlane, et al., 2008).

Uma importante diferença na apresentação dos *HPVs* foi observada entre a maioria das lesões pré-cancerosas e o cancro invasivo (e das linhagens celulares derivadas). Nas lesões pré-cancerosas, o vírus é geralmente episomal, ou seja, não integrado no *DNA* celular mas comportando-se com plasmídeo independente, capaz do seu próprio ciclo de vida, sem a participação do *DNA* da célula hospedeira. No cancro invasivo, nas linhagens celulares dele derivadas e em algumas lesões pré-cancerosas de alto grau, sequências truncadas de *DNA* viral são integradas no *DNA* celular e o seu ciclo de vida depende do ciclo de vida das células hospedeiras.

As diferenças genómicas entre os *HPVs* de baixo e de alto risco oncogénico ajudam a compreender a acção viral no genoma da célula infectada e justificam também as diferenças da capacidade transformante destes agentes (Koutsky, L.A. et al., 1992). Contrariamente à presença de genoma viral episomal nos tumores benignos, a forma integrada nas lesões de alto grau e no cancro invasivo determinam um comportamento viral mais agressivo (Karl Munger, 2004). Na maioria dos casos, a infecção por *HPV* oncogénico/não oncogénico regride espontaneamente sem qualquer intervenção médica. Contudo, uma infecção persistente por vírus de alto risco tem maior probabilidade de evoluir para cancro do colo do útero (Subhash C., et al., 2009, Liu, S.S., 2009).

1.4. O papel do HPV na carcinogénese do colo uterino

Na pesquisa de uma possível função carcinogénica do HPV documentou-se que as proteínas dos ORFs E6 e E7 dos tipos de HPV de alto risco 16 e 18 reagem com proteínas reguladoras de eventos no ciclo celular, estando directamente envolvidos nos eventos de transformação celular. A proteína E6 do HPV de alto risco possui uma elevada afinidade para a proteína supressora de tumor p53 e recruta proteínas celulares que vão actuar no complexo E6/p53, reconhecendo-o como proteína danificada e sinalizando-a para degradação pelo sistema ubiquitina-proteossoma (zur Hausen, 2000, zur Hausen, 2002, Liny, Baleja, J.D., 2007).

As importantes funções do gene *p53* - indução de paragem do ciclo celular em G1, reparação do DNA ou apoptose - são comprometidas quando ocorre a degradação da p53. A perda destas funções provoca um aumento de divisão celular, com instabilidade cromossómica e acumulação de várias mutações na célula infectada. Por outro lado, a ligação da proteína E6 de HPVs de baixo risco à p53 não resulta na sua degradação e portanto não colabora para os eventos de carcinogénese (zur Hausen, 1996, Christine, F.W., 2007), (Figura 5).

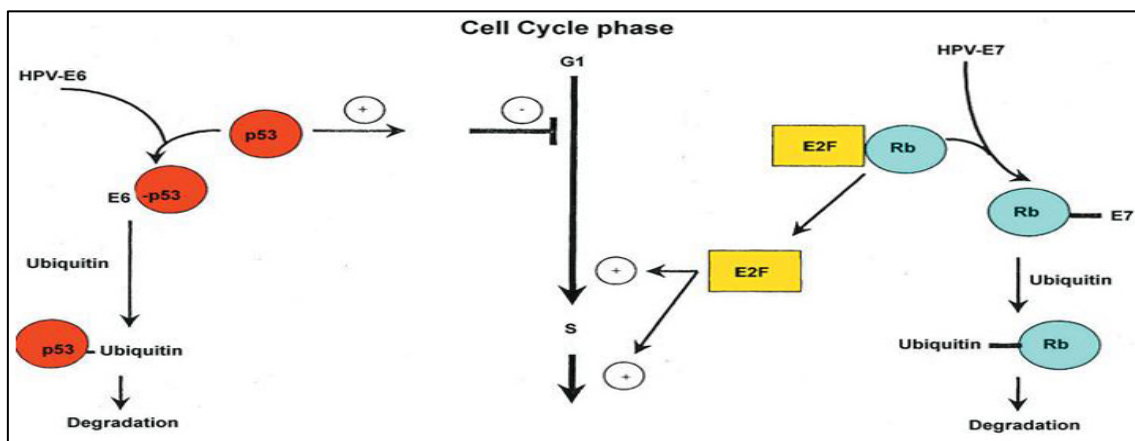


Figura 5 - Diagrama sobre o impacto das proteínas do HPV E6 e E7 nos vários estádios do ciclo celular. A proteína E6 interage com o p53 afectando a fase G1 do ciclo celular. A proteína E7 reage com o gene do retinoblastoma e, deste modo, com a fase terminal de G1 e o início da fase S. A ubiquitina intervem na degradação de ambas as proteínas expressas no tumor, facilitando a expressão de genes necessários para completar o ciclo celular (adaptado de Koss', 2006).

A proteína E7 do HPV age sobre o complexo formado entre a pRb (que controla a progressão do ciclo celular da fase G1 para S) e o factor de transcrição celular E2F,

quebrando a ligação. A degradação da proteína Rb resulta na libertação de E2F, que deixa de regular negativamente o ciclo celular de G1 para S, podendo induzir uma entrada prematura na fase S do ciclo celular (DeFilippis, et al., 2003, Ching-Hui Lin, et al., 2008), (Figura 5). Durante a década de 90 verificou-se um crescimento exponencial da literatura sobre o papel do *HPV* como agente carcinogénico.

A presença de *HPVs* de alto risco (incluindo de risco intermédio) foi documentada em quase todos os cancros invasivos e em 50-90% das lesões pré-cancerosas (Loincz et al., 1992, Bosch et al., 1995, Burd, 2003; Nubia Muñoz, 2003). Os valores mais elevados foram obtidos a partir da técnica de *PCR*, descrita adiante, a qual permite a detecção de quantidades diminutas de *DNA* viral nas células ou tecidos alvo.

Em 1995 um comité de peritos convocados pela *IARC (International Agency for Research in Cancer)*, declarou o *HPV* 16 de agente carcinogénico e os tipos 18 e 31 de agentes carcinogénicos prováveis.

O *follow-up* de mulheres, com ou sem anomalias citológicas, sugeriu que as portadoras de *HPVs*, particularmente do tipo de alto risco, estavam em risco de desenvolver lesões precursoras intra-epiteliais, algumas das quais de alto grau. *Burk* (1999) estimou que as mulheres portadoras de vírus teriam uma probabilidade de desenvolver lesões precursoras três vezes superior relativamente às não infectadas pelo vírus (Koss', 2006).

Um número de estudos realizados nos Estados Unidos em várias populações de mulheres jovens e saudáveis, baseados no método de detecção viral por *PCR*, documentaram a presença de vírus, principalmente de alto risco, em cerca de metade destas populações. A proporção de mulheres portadoras de *HPVs* de alto risco aumentava com o número de parceiros sexuais e chegava a 100% naquelas com 10 parceiros sexuais. Também se verificou que apenas uma pequena fracção dessas mulheres teria probabilidade de desenvolver cancro do colo uterino (Helmerhorst, Meijer 2002).

Foram realizados estudos a partir de avaliações serológicas mas estas apenas documentavam exposição passada ao vírus (geralmente o 16), pelo que o seu valor clínico não foi aprovado.

Posteriormente documentou-se que na maioria das mulheres jovens, a presença do vírus era transitória e sem significado clínico. *Ho et al* (1998) relatou que o tipo dominante de vírus poderia alterar-se a cada teste. Num estudo, *Moscicki et al* (1998) verificou que de 70% das mulheres com *HPV*, não era possível a detecção deste vírus após 24 meses (Koss', 2006).

Relativamente às mulheres grávidas, a presença dos vírus era transitória e aumentava a sua detecção à medida que progredia a gravidez, talvez devido a uma diminuição da imunidade que ocorre nesse período.

Vários autores então trabalharam numa nova teoria de que apenas infecções persistentes com vírus de alto risco conduziram a lesões de alto grau e por implicação, ao cancro invasivo. A destacar foram os estudos decorridos nos Países Baixos, por *Remmink et al* (1995) e *Nobbenhuis et al* (1999) usando o método de *PCR* (Koss', 2006).

Os estudos subsequentes mantêm esta teoria (Manos et al, 1999; Stoler, 2000; Trottier H., Franco E.L., 2006; Trottier H., Mahmud S., 2006). Contudo, o cancro do colo uterino é uma rara complicação da infecção por *HPV* como demonstraram os estudos holandeses (Helmerhorst, Meijer 2002).

Uma importante, se bem que indirecta, confirmação do papel do *HPV* 16 na carcinogénese do colo uterino foi a obtida através do desenvolvimento da vacina contra este agente, primeiro em ratos (Balmelli, et al., 1998) e depois no ser humano. Nos ensaios preliminares, a vacina mostrou protecção contra as lesões pré-cancerosas associadas ao *HPV* (Koutsky, et al., 2002).

Uma possível sequência dos eventos que relacionam o *HPV* às lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo uterino foram ilustradas no tratado de citologia diagnóstica de Koss' (2004), (Figura 6).

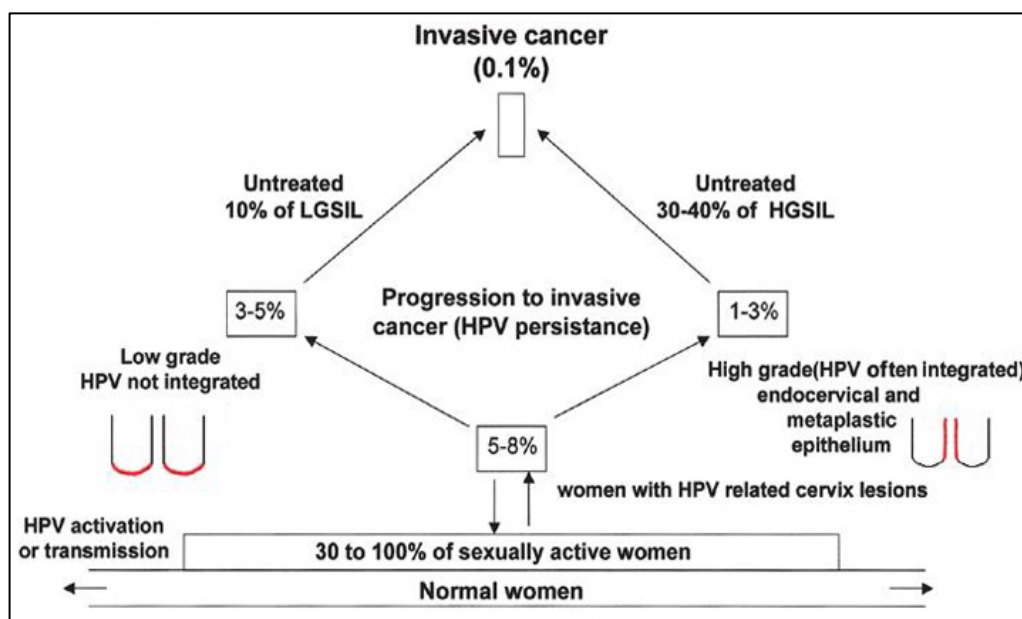


Figura 6 - Diagrama simplificado da provável sequência de eventos desde a infecção humana pelo Papilomavírus até ao cancro invasivo do colo uterino (adaptado de Koss', 2006).

1.5. A detecção do HPV nas amostras de lesões do colo uterino

Os primeiros estudos em 1983 de *Meisels* documentando a presença de HPV nas lesões epiteliais pavimentosas tiveram como suporte a microscopia electrónica de biopsias do colo uterino. *Jenson et al* utilizou outra técnica de detecção de virions maduros baseando-se em anticorpos contra antígenos comuns contidos no capsídeo de papilomavirus bovinos. Geralmente os virions maduros estavam limitados às camadas superficiais do epitélio pavimentoso, nos núcleos dos coilócitos (Koss', 2006).

Para identificar infecção latente e para determinar a relação específica de tipos virais na doença humana, foram necessárias técnicas de hibridização molecular. O princípio geral baseia-se na homologia da hibridização entre sequências de DNA conhecidas e DNA alvo desconhecido. O primeiro passo essencial foi a descoberta da estrutura molecular dos vários tipos de vírus, levando à produção de sondas de DNA tipo-específicas (zur Hausen, 1976). As técnicas de hibridização podem ser utilizadas em condições *stringent* (apenas um tipo de vírus) ou *nonstringent* (diversos tipos virais relacionados) e a técnica *gold standard* utilizada foi a de *Southern blotting* devido à sensibilidade e especificidade. Uma variante simplificada desta técnica foi criada para amostras em meio líquido (*dot blot hybridization*).

A identificação da presença de vírus é facilitada pela reacção em cadeia de polimerase (do inglês *polymerase chain reaction, PCR*) para amplificar pequenas quantidades de DNA extraído de células ou tecidos (Kulmala, S. M. e tal., 2004). Actualmente, sondas para a maioria dos vírus estão disponíveis comercialmente e o processo tornou-se automatizado. Esta técnica tem uma sensibilidade elevada que permite a detecção de sequências do genoma viral em células e tecidos (Morelva, T.M., et al., 2009).

Mais recentemente foi desenvolvida a técnica de captura híbrida para documentar a presença de vírus nas amostras em meio líquido obtido do tracto genital feminino. As amostras são tratadas com um desnaturante para quebrar o DNA celular (ds) em DNA de cadeia simples (ssDNA). São aplicadas sondas de RNA HPV-específicas para hibridização. Os híbridos são capturados numa microplaca e conjugados com anticorpos monoclonais marcados com fosfatase alcalina e específicos para os híbridos de DNA-RNA. As sondas em excesso são removidas por lavagem e os híbridos conjugados são detectados por quimio-luminescência produzida pela desfosforilação de um substrato baseado em dioxetano (Lorincz, 1996).

1.6. A citologia cérvico-vaginal e a terminologia das lesões do colo uterino

Ciente das dificuldades na caracterização de alterações citológicas, na variabilidade de interpretação inter-observadores, no sentido de uniformizar os resultados das avaliações citológicas cérvico-vaginais e otimizar a utilização de dados estatísticos, foram criados rigorosos critérios de classificação citológica (Figura 7) num importante encontro de peritos, em *Bethesda*, Estados Unidos (1998) com revisão em 2001 (Solomon, et al., 2004).

THE 2001 BETHESDA SYSTEM	
<p>Specimen adequacy</p> <ul style="list-style-type: none"> - Satisfactory for evaluation - Unsatisfactory for evaluation because of (<i>specify reason</i>) <p>General categorization (<i>optional</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Negative for intraepithelial lesion or malignancy - Epithelial cell abnormality - Other <p>Interpretation/result</p> <ul style="list-style-type: none"> - Negative for intraepithelial lesion or malignancy <ul style="list-style-type: none"> • Organisms <ul style="list-style-type: none"> <i>Trichomonas vaginalis</i> Fungal organisms morphologically consistent with <i>Candida</i> species Shift in flora suggestive of bacterial vaginosis Bacteria morphologically consistent with <i>Actinomyces</i> species Cellular changes consistent with herpes simplex virus • Other non-neoplastic findings (<i>Optional to report: list not comprehensive</i>) Reactive cellular changes associated with <ul style="list-style-type: none"> - Inflammation - Radiation - Intrauterine contraceptive device (IUD) Glandular cells status posthysterectomy Atrophy 	<ul style="list-style-type: none"> - Epithelial cell abnormalities <ul style="list-style-type: none"> Squamous cells <ul style="list-style-type: none"> • Atypical squamous cells (ASC) <ul style="list-style-type: none"> - of undetermined significance (ASC-US) - cannot exclude HSIL (ASC-H) • Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) encompassing human papillomavirus/mild dysplasia/cervical neoplasia (CIN) 1 • High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) encompassing moderate and severe dysplasia, carcinoma in situ; CIN 2 and CIN 3 • Squamous cell carcinoma Glandular cell <ul style="list-style-type: none"> • Atypical glandular cells (AGC) <ul style="list-style-type: none"> - Endocervical - Endometrial - Glandular • Atypical glandular cells, favor neoplastic • Endocervical adenocarcinoma in situ (AIS) • Adenocarcinoma: Endocervical endometrial, extrauterine, NOS - Other (<i>list not comprehensive</i>) <ul style="list-style-type: none"> Endometrial cells in a woman ≥ 40 years of age <p>Automated review and ancillary testing (<i>Include as appropriate</i>)</p> <p>Educational notes and suggestions (<i>Optional</i>)</p>

Figura 7 - The Bethesda System for Reporting Cytology (TBS) (adaptado de Solomon, 2004).

Os critérios das perturbações citológicas pertencentes ao Sistema de *Bethesda* (*TBS*) são extensos, pelo que se optou por referir apenas os termos mais frequentemente utilizados neste trabalho, incluindo a terminologia utilizada no relatório de 2007 do Centro de Informação da *WHO/ICO*, sobre *HPV* e Cancro do Colo Uterino: (*WHO/ICO*, 2007).

- Citologia normal (ou seja *NILM*, negativa para lesão intraepitelial maligna) - Não se observam células atípicas/displásicas no esfregaço citológico.
- Neoplasia Intra-epitelial Cervical (*CIN*) / Lesões Intra-epiteliais Pavimentosas (*SIL*) - *SIL* e *CIN* são dois termos usados frequentemente para descrever lesões pré-cancerosas ou proliferação anómala de células pavimentosas observadas no colo uterino. A *SIL* é um resultado anómalo derivado de uma avaliação citológica cervical ou teste de *Papanicolaou*. A *CIN* é o diagnóstico histológico realizado na análise de tecido cervical obtido por biopsia ou excisão cirúrgica.
- Lesões cervicais de baixo grau (*LSIL/CIN-1*) - As lesões cervicais de baixo grau compreendem alterações pavimentosas associadas ao “efeito citopático do *HPV*” e engloba *LSIL*, ou *CIN-1*. Estas alterações estão geralmente confinadas a células “maduras” e englobam alterações na forma e tamanho do núcleo.
- Lesões cervicais de alto grau (*HSIL/ CIN-2 / CIN-3 / CIS*) - As lesões cervicais de alto grau são definidas por um elevado número de células pré-cancerosas no esfregaço cervical, sendo distintas das células normais. Estas células tem o potencial de se tornarem células cancerosas e invadir os tecidos profundos do colo uterino. Estas lesões podem ser referidas como displasia moderada a severa, *HSIL*, *CIN-2*, *CIN-3*, ou carcinoma cervical *in situ* (*CIS*).
- Carcinoma *in situ* (*CIS*) - As células cancerosas estão confinadas a espessura do epitélio do colo uterino, sem ultrapassar a membrana basal e portanto não se disseminam para outras partes do corpo.

- Carcinoma cervical invasor (*ICC*) / Cancro do colo uterino - Se as células pré-cancerosas de alto grau ultrapassarem a membrana basal e invadirem os tecidos profundos do colo uterino e outros tecidos ou órgãos, a doença passa a designar-se de carcinoma cervical invasor ou cancro do colo uterino.
- Células escamosas atípicas de significado indeterminado (*ASC-US*) - A categoria *ASC* refere-se a alterações citológicas sugestivas de *SIL*, as quais se apresentam qualitativamente e quantitativamente insuficientes para uma interpretação definitiva.
- Células escamosas atípicas não podendo ser excluída lesão intra-epitelial de alto grau (*ASC-H*) - Esta categoria inclui pequenas células com uma razão núcleo-citoplasmática elevada, num padrão de “metaplasia (imatura) atípica” e/ou “crowded sheet pattern”, não podendo ser excluída *HSIL*.

1.7. O teste de HPV como adjuvante para a citologia

Como já foi referido previamente, para além do sistema de captura híbrida (*Hybrid Capture 2 System*) da *Digene Corp., Gaithersburg, Maryland*, nos Estados Unidos, outras abordagens para a detecção do HPV estão a ser utilizadas em larga escala, incluindo várias variantes da *PCR*, nomeadamente a utilizada neste estudo.

Um importante passo na história da detecção do HPV foi o estudo de triagem de células pavimentosas atípicas de significado indeterminado/ lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (estudo *ALTS*), patrocinado pelo *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (Schiffman, M., Adriansa, ME., 2000). Os resultados iniciais foram publicados num documento anónimo porque 81,4% de 642 mulheres foram HPV's positivas para alto risco, tendo-se concluído que o teste não oferecia opções de triagem e que portanto seria de valor limitado nas mulheres com *LSIL*.

Numa publicação subsequente baseada num estudo de 3488 mulheres com *ASC-US*, os autores concluíram que uma determinação negativa do HPV tinha um valor preditivo negativo muito alto de cerca de 99%. Ou seja, uma mulher com um resultado negativo, tinha uma probabilidade ínfima de desenvolver a lesão durante um período de 2 anos. Por outro lado, apesar do teste do HPV, baseado apenas numa determinação inicial singular, ter maior sensibilidade que a citologia, também tinha baixa especificidade e um valor elevado de falsos positivos, particularmente em mulheres de idade inferior a 30 anos (Solomon, D., et al., 2001).

Uma outra importante conclusão retirada por *Cuzick* do estudo *ALTS* foi que estes dois métodos tinham a mesma sensibilidade, após duas avaliações citológicas. Esta revisão alertou para o facto de que, com a especificidade mais baixa do teste de HPV para *HSIL* do que a citologia, o número de referências para colposcopia duplicaria (*Cuzick*, 2000). De facto, um teste de HPV positivo iria estigmatizar um número consideravelmente maior de mulheres sem lesões documentadas, e tudo isto para encontrar todos os *CINs 3* que poderiam não ser detectados numa única avaliação citológica. Este estudo documentou que as lesões de alto grau descobertas em doentes com *ASC-US* eram geralmente pequenas e com uma pequena probabilidade para progredir para carcinoma invasor (*Pinto et al.*, 2002; *Solomon*, 2004).

De todos os cenários possíveis de aplicação da detecção do DNA do HPV, a *FDA* aprovou sua aplicação em mulheres com idade superior a 30 anos, em dois ou mais testes,

complementados com uma citologia cérvico-vaginal, embora à custa de um elevado investimento, provavelmente apenas passível em países desenvolvidos.

A aplicação do teste de detecção de *HPV* na prática clínica foi adoptada numa Conferência de Consenso Nacional nos Estados Unidos, em *Bethesda* no ano de 2001 (Solomon et al., 2002;). As recomendações foram formalizadas pela *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP)* e encontram-se ilustradas no algoritmo representado (Figura 8).

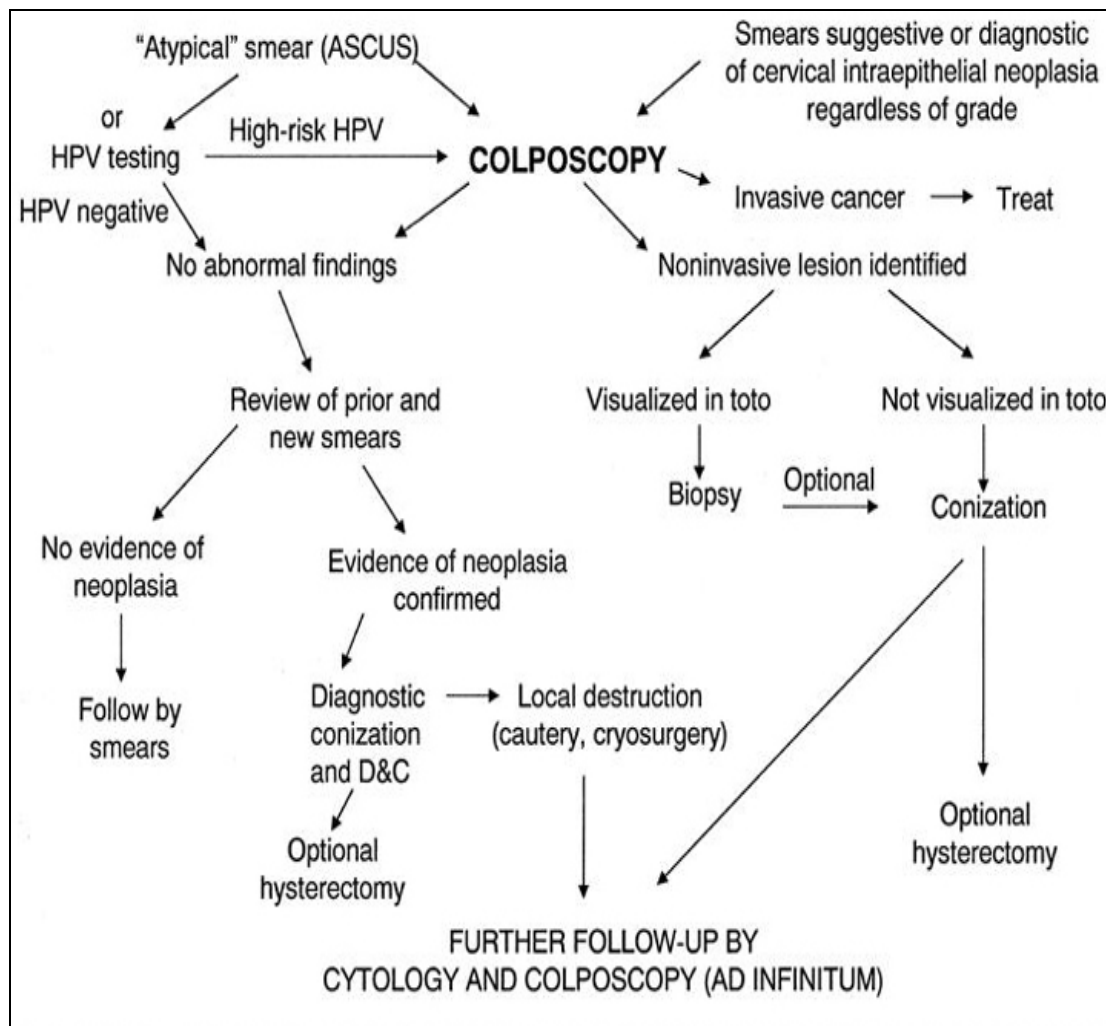


Figura 8 - As opções diagnósticas e terapêuticas para mulheres com citologia cervical anómala. A sequência de eventos neste diagrama procura incluir todas as opções terapêuticas. A colposcopia e as biopsias do colo uterino permanecem os procedimentos diagnósticos *gold standard*, conduzindo às decisões terapêuticas. O teste de detecção do *HPV*, que pode ser “reflexo” (i.e., realizado em todas as amostras relatadas de *ASC-US*) “selectivo” (i.e., limitado a doentes de alto risco), foi um passo acrescentado à lista de opções diagnósticas. Embora esta abordagem aumente o número de eventos pré-neoplásicos descobertos, o impacto a longo termo na morbilidade e mortalidade ainda aguarda aprovação, (adaptado de Koss', 2006).

1.8. Dados epidemiológicos sobre o cancro do colo do útero e o HPV

Portugal, a Europa e o Mundo

O carcinoma do colo do útero é a segunda neoplasia mais frequente em mulheres no mundo a seguir ao cancro da mama e representa 10% de todos os carcinomas que afectam a população feminina (Said, H.M., et al., 2009) e ocorre maioritariamente em mulheres em idade activa, entre os 35 e 50 anos de idade (Arbyn, M., et al., 2006).

O cancro do colo do útero desenvolve-se lenta e progressivamente, podendo levar 20 anos ou mais desde a infecção persistente até ao desenvolvimento de lesões de alto grau e de cancro invasor (WHO, 2008).

Desde a década de 70 que estudos epidemiológicos revelaram uma associação entre a infecção por um agente sexualmente transmissível – o Vírus do Papiloma Humano (HPV) – e o desenvolvimento de verrugas ou de carcinomas do colo do útero. Actualmente é aceite que todos os casos terão este agente como base da sua etiologia, tendo sido demonstrado em vários estudos que *DNA* de HPV está presente em aproximadamente 99,7% dos casos de carcinoma do colo do útero (Burd, E.M., 2003, David Soper, 2005).

Cerca de 70% dos casos de carcinoma cervical são causados por infecção de HPV de alto risco, sendo os tipos 16 e 18 os mais frequentemente encontrados nas lesões intra-epiteliais pavimentosas de alto grau e carcinoma invasor (Clifford, G.M., 2003; Weaver, B.A., 2006, Arbyn, M., et al., 2008, WHO/ICO, 2009).

De toda a literatura pesquisada, a publicação mais recente sobre o HPV e o Cancro do Colo Uterino com dados epidemiológicos centrados em Portugal pertence ao relatório de 2007 do Centro de Informação da OMS/ICO sobre HPV e Cancro do Colo Uterino e ao relatório de 2009 do Centro de Informação da OMS/ICO sobre HPV e cancros relacionados em Portugal e baseiam-se em dados da IARC, *Globocan 2002* e de *Medeiros R. et al*, 2005. Neste relatório, Portugal foi classificado em termos sócio-demográficos (para fins analíticos) na região geográfica da Europa do Sul, sendo comparado com as restantes nações desta região e também a nível Mundial (WHO/ICO, 2007, Medeiros, R., et al., 2005; Arbyn, M. et al., 2008, WHO/ICO, 2009).

De acordo com estas fontes, Portugal tem uma população de 4.64 milhões de mulheres com idade a partir de 15 anos que estão em risco de desenvolver cancro do colo

do útero. Dados actuais indicam que todos os anos 956 mulheres são diagnosticadas com cancro do colo do útero e 378 morrem desta doença.

A taxa de incidência bruta do cancro do colo uterino em Portugal foi de **18,4/100000** habitantes (2002) e quando comparado com outros cancros no sexo feminino, **para todas as idades**, esta ocupou a **4ª posição** seguindo-se por ordem decrescente aos cancros da mama, colo-rectal e estômago, respectivamente, 82,8/100000, 41,5/100000 e 25,8/100000. Já a taxa de incidência específica para mulheres na faixa etária dos **15-44 anos**, comparada a outros cancros, **foi de 11,1/100000** habitantes, ocupando a **2ª posição**, a seguir ao cancro da mama (29,4/100000 habitantes) (WHO/ICO, 2007, (WHO/ICO, 2009).

No que respeita à taxa de incidência por idade estandardizada de cancro do colo uterino, ocupou a **7ª** posição dos **Países da Europa do Sul** (13,5/100000) seguindo por ordem decrescente, o Montenegro, a Sérvia, a Albânia, a Bósnia e Herzegovina, a Eslovénia e a República da Macedónia (Arbyn, M., et al., 2008).

Em termos de taxa de mortalidade bruta anual por 100000 habitantes, comparada com todos os cancros, em mulheres de todas as idades, o cancro do colo uterino em **Portugal** ocupa a **6ª posição (7,3)**, seguindo por ordem decrescente os cancros da mama, colo-rectal, estômago, pulmão e pâncreas. Já a taxa de mortalidade específica para mulheres na faixa etária dos **15-44 anos**, por cancro do colo uterino em Portugal, comparada a outros cancros é de **2,2/100000** habitantes, ocupando a **2ª posição**, a seguir ao cancro da mama (5,6/100000 habitantes) (WHO/ICO, 2007, (WHO/ICO, 2009).

Portugal ocupou a **8ª posição** com **4,5/1000000** no que respeita as taxas de mortalidade por idade estandardizada, por cancro do colo uterino, nos países da Europa do Sul (WHO/ICO, 2009).

À medida que as mulheres portuguesas envelhecem, aumentam as taxas de mortalidade específicas para a idade, por cancro do colo uterino, à semelhança do que acontece nos países da Europa do Sul, embora com percentagens superiores para Portugal. Do mesmo modo a prevalência do *HPV* aumenta com a severidade das lesões cervicais (Medeiros R., et al., 2005; WHO/ICO, 2007), (Figura 9).

	Portugal		Southern Europe		World	
	No. tested	HPV prevalence % (95% CI)	No. tested	HPV Prevalence % (95%CI)	No. tested	HPV Prevalence % (95%CI)
Normal cytology	-	--	4884	5.7 (5.0-6.3)	157879	10.0 (9.8-10.1)
Low-grade lesions ^a	416	82.9 (79.0-86.4)	3391	66.6 (64.9-68.1)	8640	71.6 (70.6-72.5)
High-grade lesions ^b	132	91.7 (85.6-95.8)	650	81.1 (77.9-84.0)	7094	84.9 (84.1-85.7)
Cervical Cancer	60	98.3 (91.1-100.0)	732	83.7 (80.9-86.3)	14595	87.2 (86.7-87.8)

Figura 9 - Prevalência do *HPV* em mulheres com citologia normal, lesões pavimentosas intra-epiteliais e cancro do colo do útero invasor em Portugal (adaptado de WHO/ICO, 2007).

Em Portugal, nos Países da Europa do Sul e mesmo no Mundo, o tipo de *HPV* mais frequente nas mulheres com lesões intra-epiteliais cervicais de baixo grau (*LSIL/CIN-1*) foi o 16, de acordo com as taxas de prevalência específica para tipo de *HPV*, respectivamente, 44,2, 21,6 e 20,3% (*IARC Infection and Cancer Epidemiology Unit*). Da mesma forma, para as lesões intra-epiteliais de alto grau (*CIN 2-3, CIS e HSIL*), o tipo 16 foi o mais prevalente com taxas de prevalência específicas de 74,2, 45,8 e 45,4, respectivamente.

Para o cancro do colo uterino (invasor) os tipos de *HPV* mais frequentes em Portugal, Europa do Sul e Mundo foram os tipos 16 e 18, com taxas de prevalências específicas de 80,0 /15,0, 52,5/12,8 e 54,4/15,9, respectivamente.

Os dados conhecidos sobre a incidência de cancro na Região Norte correspondem aos novos casos, registados anualmente no Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO). Durante o ano de 2004, foram registados 245 (4,6%) casos de cancro do colo do útero, correspondendo a uma taxa de incidência de 14,5/1000000. Neste ano o cancro do colo do útero foi o 5º tipo de cancro mais comum na mulher, após o cancro da mama, do cólon e recto, do estômago e da glândula tiroideia. O tipo histológico mais frequente de cancro do colo do útero foi o carcinoma pavimentoso (67,3%), (RORENO, 2005).

A última literatura centrada no Cancro do Colo Uterino a nível Europeu foi um extenso documento publicado na Bélgica pelas Comunidades Europeias em 2008 intitulado

“*European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening*” (Arbyn, M., et al., 2008).

Todos os anos na Europa são diagnosticados aproximadamente 52000 novos casos de cancro do colo uterino e ocorrem 27000 óbitos devido a esta doença. Foi estimado para o conjunto dos 27 Países Membros da União Europeia em 2007 uma incidência de 34300 casos e um número de mortes de 16300. As taxas de incidência e mortalidade estandardizadas para a idade, por cancro do colo uterino foram desde aproximadamente 4,6 e 1,1/100000 na Finlândia até 37,3 e 22,0/100000 na Roménia. Portugal ficou na 17^a posição com taxas de aproximadamente 14,5 e 4,2/100000 (Arbyn, M., et al., 2008).

Os primeiros programas de rastreio para o cancro do colo uterino na Europa verificaram-se nos países Nórdicos como a Finlândia, a Suécia e a Islândia nos anos 60. Seguiram-se países como o Reino Unido e a Bélgica. Estes rastreios não foram realizados em condições uniformes mas os resultados foram exemplares. Por exemplo, na Finlândia, onde todos os municípios aderiram, obtiveram-se resultados nos anos 90 (30 anos depois) de diminuição da taxa de mortalidade na ordem dos 80% e no caso da Suécia e Dinamarca, onde os programas foram organizados parcialmente, a diminuição nas taxas de mortalidade foi de 52 e 66%, respectivamente. Posteriormente, resultados obtidos em 2005 de países menos organizados ou com rastreio “oportunistas” a diminuição variou de 10 a 60% (Arbyn, M., et al., 2008).

Pelo contrário, nos países onde não foram realizados rastreios para o cancro do colo uterino verificou-se um aumento das taxas de mortalidade e incidência, como foi o caso da Bulgária, Roménia e Estónia (Arbyn, M., et al., 2008).

As publicações com base nos dados dos estudos *EUROCORE 3* e *4* mostraram taxas de sobrevivência média aos 5 anos nos países europeus de aproximadamente 62% (1990-1994) e 60% (2000-2002) respectivamente. É verdade que são controversas as estimativas entre os países, resultado de imperfeições (p.e. na plenitude dos *follow-ups* ou nas informações de estadiamento comparáveis), mas também as diferenças observadas podem resultar da qualidade dos tratamentos praticados por toda a Europa (Arbyn, M., et al., 2008).

Uma ilustração sobre a taxa de incidência a nível mundial do cancro do colo do útero publicada pela *IARC* mostra, entre outras coisas, uma discrepância entre os países desenvolvidos e os em vias de desenvolvimento, reflectindo a aplicação de programas de rastreio e o acesso a tratamentos de alta qualidade (Figura 10).

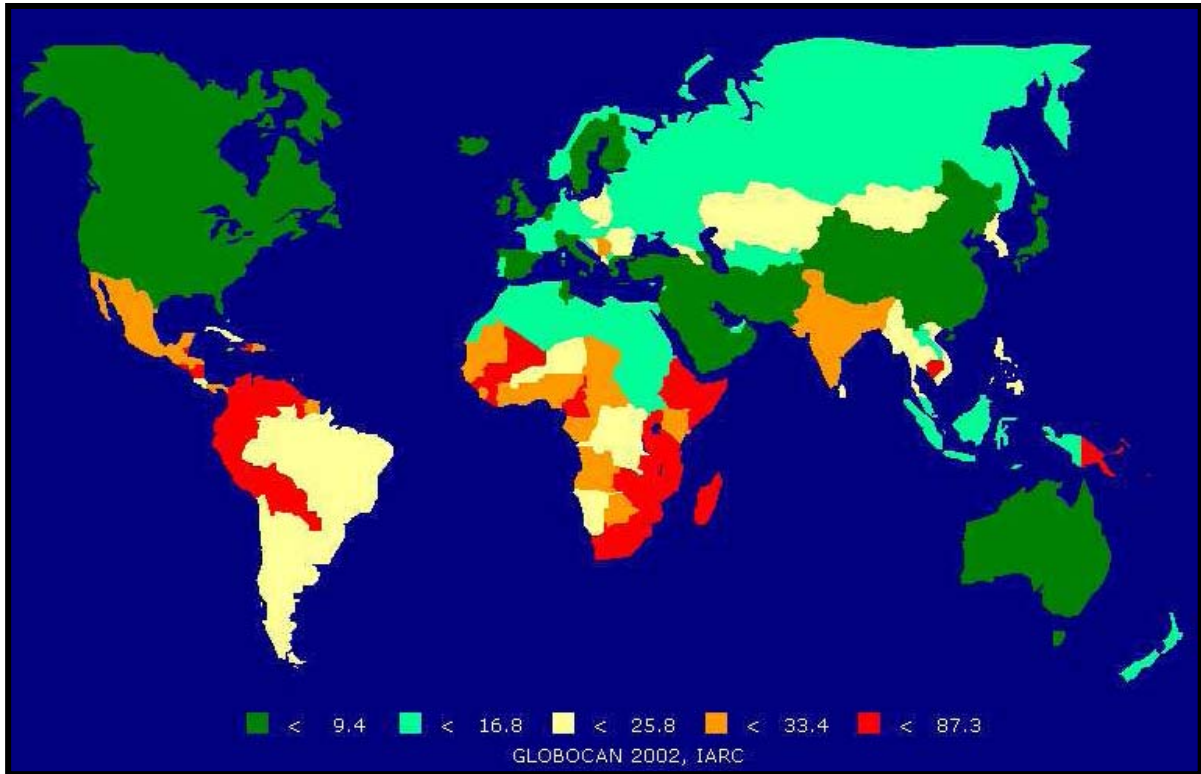


Figura 10 - Taxa de incidência mundial do cancro do colo do útero, por 100 000 habitantes, em 2002 (adaptado de IARC, 2008).

Para terminar, uma visão epidemiológica sobre os Estados Unidos da América, um país onde o rastreio conduziu a uma importante diminuição do cancro do colo uterino, no entanto constituindo ainda a terceira neoplasia ginecológica mais frequente. A incidência de cancro cervical invasivo é de 10370 novos casos por ano e a mortalidade de 3710 mortes por ano, representando 1,4% das mortes por neoplasia nas mulheres. Neste país a incidência de cancro cervical diminuiu mais de 70% entre 1950 e 2000, em grande parte devido ao sucesso do rastreio. É de sublinhar que mais de metade dos casos de carcinoma invasivo foram diagnosticados em mulheres cujo rastreio não foi adequado (Jemal, et al., 2005).

1.9. Factores de risco para o cancro do colo do útero

Para além do já abordado factor de risco mais importante para o cancro do colo uterino - infecção por *HPV* de alto risco – outros factores foram documentados na literatura. Dentro dos factores comportamentais, destaca-se como co-factor para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, o tabagismo (activo ou passivo). A referir também a associação de co-factores associado à oncogénese das lesões cervicais, documentadas em estudos de doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (*HIV*) vítimas da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), (Stanley M. A., 2009) e em estudos de infecção concomitante por outros agentes, nomeadamente o vírus do Herpes simplex (*HSV*), o Citomegalovírus (*CMV*) e a *Chlamydia Trachomatis* (*CT*) (Shepherd et al., 2000; Frisch et al., 2001; Castellsague, X., Muñoz 2003; Smith, J.S., et al., 2004; Trimble et al., 2005; Watts, D.H., 2005; Al-Daraji, Smith, 2009).

Estudos recentes abordam também a importância das infecções genitais por outros agentes nomeadamente *Trichomonas vaginalis* e vaginose bacteriana, como factores de risco para a aquisição da infecção por *HPV* e o consequente desenvolvimento da neoplasia cervical (Watts, D.H., Fazzari, M., 2005; Arbyn M. et al., 2008).

1.10. Desenvolvimento de estratégias e vacinas

Com o objectivo de reduzir a incidência de lesões pré-invasivas e consequentemente o cancro invasor, foi realizado um grande investimento para desenvolver vacinas que conferissem protecção contra estas estirpes. Estas vacinas são constituídas por partículas “viruslike” (VLP) que expressam apenas a proteína L1 do HPV. Estas VLPs têm grande semelhança com os viriões do HPV, não contendo, no entanto, material genético, pelo que não são infecciosas, nem oncogénicas, mas estimulam fortemente o sistema imunitário. (Stanley, M. A., 2008, Stanley, M. A., 2009).

Foram estudados 2 tipos de vacinas: a tetravalente, contra os tipos 6, 11, 16 e 18 (o 6 e o 11 são responsáveis pela maioria das verrugas genitais) e a bivalente, contra os tipos 16 e 18, conferindo protecção cruzada contra os tipos 31 e 45. Em 2006, a vacina tetravalente *Gardasil*® foi aprovada pela FDA como agente de prevenção para o cancro em mulheres com idade entre os 9 e 26 anos. Esta vacina (produzida pela *Merck Sharp & Dohme B. V.*), foi a primeira a ser lançada no mercado mundial, em 2006, inicialmente nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá, seguindo-se a Austrália e a Europa. Em Portugal, *Gardasil*® (tetravalente) foi comercializado em Dezembro de 2006 (FDA, 2008).

A vacina bivalente *Cervarix*® (produzida pela *GlaxoSmithKline Biological S.A.*), também aprovada pela FDA, foi comercializada na Europa em Setembro de 2007, encontrando-se à venda em Portugal desde Outubro de 2007. A indicação baseia-se na demonstração de eficácia em mulheres dos 15-25 anos de idade após e na imunogenicidade da vacina em raparigas e mulheres dos 10-25 anos de idade (FDA, 2008).

Dois estudos recentes de fase III confirmaram a elevada eficácia de *Gardasil*® na protecção do cancro cervical. No primeiro estudo, a vacina forneceu protecção em 100% das doenças (cervicais, vaginais e vulvares) provocadas pelos tipos HPV 6, 11, 16 e 18. No segundo estudo, *Gardasil*® forneceu protecção em 98% de lesões pré-malignas em estadios avançados, causadas pelos tipos de HPV 16 e 18. Para que as vacinas sejam eficazes têm de ser usadas antes de ocorrer a infecção por HPV. (Garland, et al., 2007).

A vacinação contra o HPV reduz o risco de cancro do colo do útero, mas não o elimina, já que nem todos os tipos de HPV estão incluídos na vacinação. Prevalece, assim, a importância de realizar um rastreio recorrendo à citologia cérvico-vaginal e provavelmente a testes adjuvantes.

2.Objectivos

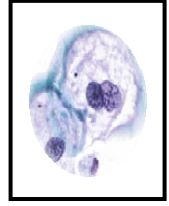


Este trabalho tem como objectivo comparar os resultados obtidos na avaliação da citologia cérvico-vaginal em meio líquido com os respectivos resultados obtidos pelo teste *PCR* para detecção de *DNA* do *HPV*.

Objectivos específicos:

- Verificar e comparar a associação de infecção por *HPVs* de alto risco com *SILs*;
- Verificar a presença de *DNA* do *HPV* nas amostras com diagnóstico de *ASC-US*;

3. Material e Métodos



3.1. Amostra

Este estudo inclui 1570 amostras cérvico-vaginais em meio líquido recebidas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto entre os meses de Janeiro e Dezembro de 2008, provenientes de mulheres da consulta externa de Ginecologia do mesmo hospital.

Foram analisadas as informações clínicas das pacientes de forma a obter os dados clínico-patológicos relevantes: idade, história clínica, exames anteriores, resultado da citologia e teste molecular ao *HPV* por *PCR*.

3.2. Especificações sobre a técnica de Citologia Líquida

Após colheita com *cervexbrush* durante o exame colposcópico, as amostras foram armazenadas nos frascos de *ThinPrep® Pap Test* contendo metanol tamponado e enviadas para o Serviço de Anatomia Patológica. A manipulação, processamento das amostras e coloração das lâminas foram realizadas segundo protocolo estabelecido no Sector de Citologia por um técnico de Anatomia Patológica. As lâminas foram observadas pelo citotécnico destacado para o efeito. O resultado foi relatado de acordo com a classificação de *Bethesda* de 2001 (Arbyn M., 2008).

Todos os casos com achados atípicos ou neoplásicos foram revistos pelo patologista responsável da área da citologia e os casos de *NILM* mas com história anterior de *Atipias/SILs/Carcinoma* foram observados por 2 técnicos. As citologias com diagnóstico de *NILM* e teste *HPV* positivo para alto risco foram revistas por dois observadores independentes.

Os resultados citológicos foram classificados em: negativo para lesão intra-epitelial ou neoplasia maligna (*NILM*), *NILM* com alterações celulares reactivas a inflamação, *NILM* com microorganismos associados, células escamosas atípicas de significado indeterminado (*ASC-US*), células escamosas atípicas não podendo ser excluída *HSIL (ASC-H)*, lesão intra-epitelial escamosa de baixo e alto grau (*LSIL* e *HSIL* respectivamente) e carcinoma pavimentoso.

3.2.1. Processamento – Amostras Ginecológicas

O equipamento e os produtos utilizados neste processamento são de marca comercial *Thin-Prep®*. Compreende produtos tais como: fixador, lâminas e um processador *Thin Prep® 2000*. O processador tem a função de homogeneizar a amostra, filtrar e realizar automaticamente a impressão (*imprint*) do esfregaço em monocamada.

No processador *Thin Prep® 2000* selecciona-se o programa para amostras ginecológicas. O processamento automático inicia com uma agitação e homogeneização celular; de seguida é feita uma aspiração e um *imprint* (circulo de 20mm-diâmetro) do material aspirado para a lâmina; finalizando com a colocação imediata da lâmina em álcool a 96%. A lâmina é retirada do aparelho e fixada em etanol a 96% durante 10 minutos; procede-se de seguida à coloração de *Papanicolaou*.

Quando a amostra apresenta demasiado sangue, deve-se proceder a uma lavagem com objectivo de reduzir a presença do mesmo, previamente ao processamento no processador *Thin Prep® 2000*. Este procedimento implica a utilização de uma centrífuga para centrifugação da amostra a 1500 rotações por minuto (r.p.m.) durante 10 minutos. Coloca-se o sedimento num tubo de vortex ao qual se adiciona solução citolítica/ácido acético a 10% até perfazer um volume de 50 ml. O ácido acético provoca a lise dos eritrócitos. Este tubo é colocado no vortex a agitar durante 1 minuto e de seguida é colocado a centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Pipeta-se novamente o sedimento para um frasco de *Thin-Prep®*, e após 10 minutos nesta solução a amostra está pronta a ser processada pelo *Thin Prep® 2000* conforme procedimento já descrito.

3.2.2. Coloração de *Papanicolaou*

A coloração de *Papanicolaou* é uma técnica executada em amostras ginecológicas e não ginecológicas.

É uma coloração com efeito tricrómico, a qual se baseia numa coloração nuclear minuciosa com uma avaliação muito sensível o aumento de actividade do *DNA* das células malignas evidenciada pela Hematoxilina de Harris. Este corante permite a sobrecoloração dos elementos celulares com afinidade para o corante e em seguida, através de uma

diferenciação resiste nas zonas que têm forte afinidade ao corante. Deste modo, a diferenciação entre os núcleos e os citoplasmas com água amoniacal permite bons resultados.

A coloração das lâminas é feita num colorador automático (*Shandon Vanistain 24-4*). A renovação das soluções é feita semanalmente, estas são colocadas pelo nível óptimo que permite a coloração total das lâminas. Os corantes são filtrados semanalmente e acrescentados até ao nível indicado, estes são substituídos quando há perda da sua capacidade corante, sendo este controlo feito por observação microscópica das lâminas.

Em resumo: a coloração inicia-se com uma hidratação para retirar o etanol utilizado como fixador. Segue-se a coloração dos núcleos com Hematoxilina de Harris (Shandon, código 6765004). Após várias lavagens com água corrente, procede-se à diferenciação com água amoniacal a 0,1%, novamente seguida de lavagens sucessivas. Após uma passagem por etanol a 96% procede-se à coloração citoplasmática com Orange (Shandon, código 6766006). Em seguida procede-se a uma lavagem com etanol a 96%. Continua-se a coloração citoplasmática com EA50 (Shandon, código 6766002), após a qual é efectuada a desidratação das lâminas com etanol a 100%, seguido de diafanização com xilol.

Após a coloração, as lâminas são montadas num montador automático (Shandon Consul Coverslipper).

Resultados da Coloração de Papanicolaou:

Núcleos.....	Azul
Queratina e Sangue.....	Laranja
Nucléolos e Citoplasma das Células Superficiais.....	Rosa
Citoplasma das Células Intermediárias, Parabasais e Basais.....	Azul esverdeado

No final do processamento as lâminas são conferidas com as requisições organizadas por ordem numérica, colocadas em pastas de distribuição e entregues aos citotécnicos para leitura.

3.3. Especificações sobre a técnica de PCR

Paralelamente o restante material das 1570 amostras foi enviado para o laboratório de biologia molecular e submetido à técnica de amplificação e detecção de *DNA* do *HPV* por *PCR* de acordo com o protocolo do sistema desenvolvido pela *GenoID® The HPV Diagnostics Company*.

A reação em cadeia da polimerase (*PCR*) é a amplificação enzimática de uma sequência específica de *DNA*, visando a produção de milhões de cópias desta sequência. Esta técnica foi descrita por *Kary Mullis* no final dos anos 80 para explorar a capacidade de duplicação do *DNA*. Uma cadeia simples de *DNA* é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a acção da enzima polimerase do *DNA*, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reacção, segundo a cadeia molde. A polimerase do *DNA* requer, entretanto, um "ponto de início" ligado à cadeia molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibridiza à cadeia molde simples, o qual é denominado de "primer".

O *Kit PCR* de amplificação e detecção do Vírus do Papiloma Humano amplifica e detecta 49 genótipos do *HPV* nos seguintes grupos:

- Grupo de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,59,66,68);
- Grupo de Baixo risco (6,11,42,43,44/55);
- Grupo de risco Indeterminado - (29 genótipos não classificados)
(2,3,7,10,13,26,27,28,29,30,34,40,53,54,57,61,67,70,72,73,81,82,83,84,85,89,90,91)

Este *Kit* é composto por componentes para 44 amostras. Para evitar falsos negativos, é preparado paralelamente à amostra um controlo interno de *DNA* que é amplificado concomitantemente na reacção.

Os componentes que fazem parte deste *Kit* são: o *Kit* de espectro completo de amplificação do *HPV M20040*; o *Kit* de espectro completo de detecção do *HPV P20430* e o *Kit* de reagente de detecção geral H20012. Os dois primeiros devem estar armazenados a menos que 18°C e o terceiro entre 2°C a 8°C.

A detecção do *HPV* e dos controlos é realizada em quatro “câmaras” reacção diferentes (poços). Os produtos *PCR* biotinilados (resultantes de uma amplificação com um sequenciador de *DNA* biotinilado) são capturados sobre a superfície de uma microplaca revestida com *streptavidina*. A cadeia complementar é eluída do produto *PCR* imobilizado e a hibridização é realizada na presença de sondas específicas marcadas com fluoresceína.

As sondas de ligação reagem com o anticorpo de anti-fluoresceína – *HRPO* (peroxidase de rábano). O substrato cromogénico *HRPO* (OST) produzirá uma coloração azul, no caso de uma reacção positiva (Genoid, 2008).

3.3.1. Extracção de *DNA* – preparação das amostras

1. Preparar extemporaneamente a solução de controlo interno (IC) adicionando 10 µl de *HPV-IC DNA* (100 µl *HPV Internal Control (IC) DNA*) a 20 ml de solução *Cytic PreservCyt*.
2. Transferir 1250 µl de amostra para um tubo e centrifugar 4000rpm, durante 10 minutos.
3. Descartar o sobrenadante.
4. Adicionar 250 µl de solução *IC* ao *pellet*, agitar e proceder à preparação das amostras usando o kit *AmpliLute Liquid Media Extraction* (ROCHE) ou o kit *High-Pure PCR Template Preparation* (ROCHE).

3.3.2. Amplificação do *DNA* por *PCR*

1. Adicionar 20 µl de enzima *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) ao reagente da *mastermix* (980 µl *Master Mix*) e agitar.
2. Transferir 20-20 µl de mix aos tubos *PCR* e adicionar 5-5 µl de *DNA* molde. Preparar os controlos positivo (65 µl *HPV positive DNA genotypes 6, 16*) negativo (5µl de água)
3. Colocar os tubos no termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700*), programado previamente.

3.3.3. Detecção dos amplicons *PCR* – hibridação de fase sólida

Utilizando sondas para detecção (*Full Spectrum HPV Detection Probe Kit P20430*) e reagents específicos (*General Detection Reagent kit H20012*), procede-se à hibridação de fase sólida. Os detectores para *HPV-HR*, *HPV-LR*, *HPV-Internal Control* e *General HPV* de uma amostra são elaborados em poços separados, segundo indicação do fabricante.

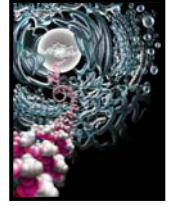
Mede-se a absorvância num *microplate reader* a 450 nm. Determina-se os valores *cut-off* positivos e negativos. Um ensaio é considerado válido quando o ratio dos controlos negativos do *PCR* e a hibridação correspondente é menor de 2 para cada *ratio* de *PCR*. O *ratio* entre a hibridação dos controlos positivos e os produtos *PCR* de controlo positivos devem ser pelo menos 2 vezes superiores que o valor *cutt-off* positivo.

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi efectuada usando o programa *Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 18.0.

Nesta análise foram consideradas como variáveis a idade dos pacientes, o resultado da citologia, resultado do diagnóstico molecular e a história clínica, tendo sido elaboradas tabelas descritivas. Os valores foram analisados usando testes não paramétricos, para avaliar possíveis associações entre essas variáveis e a presença de *HPV*. Foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* e o teste do *Qui-quadrado*, considerado para indicar significado estatístico um valor de $p < 0,05$.

4. Resultados



4.1. Caracterização da população em estudo

A idade das mulheres envolvidas neste estudo varia entre os 17 e os 81 anos, sendo a média de idades de 45 anos (44,71), a mediana de 45,00 e o desvio padrão de 9,93. A faixa etária dos 31 aos 40 anos foi a mais representativa (32,7%).

A maior parte das requisições dos exames citológicos cérvico-vaginais incluíam a informação clínica de “rastreio” (82,9%), sendo que os restantes apresentam diagnóstico prévio de atípias (2,0%) ou lesões pavimentosas (15,1%) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das amostras segundo a história clínica

História clínica	Nº Casos	%
Rastreio	1302	82,9
Antecedentes ASC-US	32	2,0
Antecedentes LSIL/HPV/CIN1	108	6,9
Antecedentes HSIL/CIN 2 e 3/Carcinoma	128	8,2
Total	1570	100

4.2. Citologias, testes moleculares e correlação dos dados

Das 1570 amostras, vinte e cinco (1,6%) foram avaliadas como contendo células pavimentosas atípicas de significado indeterminado (*ASC-US*) e 1 (0,1%) de células pavimentosas atípicas, não podendo ser excluída *HSIL (ASC-H)*.

Em relação às lesões intra-epiteliais, 45 (2,9%) foram avaliadas como sendo de baixo grau (*LSIL*) e 7 (0,4%) de alto grau (*HSIL*). Uma citologia (0,1%) foi classificada como carcinoma de células pavimentosas (Tabela 2).

Tabela 2: Diagnóstico citológico de 1570 amostras de citologia cérvico-vaginal

Diagnóstico Citológico	Nº Casos	%
<i>NILM</i> /Inflamação/Microorganismos	1491	95
<i>ASC-US</i>	25	1,6
<i>ASC-H</i>	1	0,1
<i>LSIL</i>	45	2,9
<i>HSIL</i>	7	0,4
Carcinoma	1	0,1
Total	1570	100

Dos resultados citológicos da população, 95% (1491/1570) corresponderam a achados não neoplásicos, que incluem *NILM*, *NILM* com alterações celulares reactivas associadas a inflamação e *NILM* com microorganismos associados. Obteve-se então 1046 casos de *NILM*, 277 de *NILM* com alterações celulares reactivas associadas a inflamação e 168 de *NILM* com microorganismos, respectivamente 66,6%, 17,6% e 10,7% (Tabela 3).

Especificando os microorganismos associados a *NILM* resultaram 87 citologias (5,5%) de desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana, 59 (3,8%) de fungos morfológicamente consistentes com *Candida spp*, 19 (1,2%) de *Trichomonas vaginalis* e 3 (0,2%) de bactérias morfológicamente compatíveis com *Actinomyces spp* (Tabela 3)

Tabela 3: Diagnóstico citológico, achados não neoplásicos

Diagnóstico Citológico	Nº Casos	%
<i>NILM</i>	1046	66,6
<i>NILM/Actinomyces</i>	3	0,2
<i>NILM/Candida</i>	59	3,8
<i>NILM/Trichomonas</i>	19	1,2
<i>NILM/Vaginose bacteriana</i>	87	5,5
<i>NILM/Inflamação</i>	277	17,6
Total	1491	100

Relativamente ao diagnóstico molecular dos 1570 casos, 1314 foram negativos para *DNA* do *HPV* (ou seja 83,7%), restando 256 casos positivos (16,3%). Estes incluem 145 casos positivos para *DNA* do *HPV* de alto risco (9,2%), 91 de risco indeterminado (5,8%) e 20 de baixo risco (1,3%) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das amostras segundo o resultado do teste de *PCR* do *HPV*

PCR	Nº casos	%
Negativo	1314	83,7
Positivo baixo risco	20	1,3
Positivo alto risco	145	9,2
Positivo risco indeterminado	91	5,8
Total	1570	100

Dos 1491 casos de *NILM* / *NILM* com inflamação e *NILM* com microorganismos, 13,5% foram positivos para *DNA* do *HPV*.

A correlação entre o diagnóstico citológico e o resultado da *PCR* mostrou que dos 1046 casos classificados de *NILM* pela citologia, 67 apresentaram *HPV* de alto risco, 52 *HPV* de risco indeterminado e 7 *HPV* de baixo risco, respectivamente 6,4%, 5,0% e 0,7%, perfazendo um total de 126 casos positivos para *DNA* do *HPV* (12,1%). (Tabela 5).

Das citologias de *ASC-US*, 5 apresentaram *HPV* de alto risco (20%) e 3 *HPV* de risco indeterminado (12,0%), perfazendo um total de 8 casos positivos para *DNA* do *HPV* (32,0%).

Passando às lesões intra-epiteliais pavimentosas, dos casos de *LSIL*, 28 foram positivos para *HPV* de alto risco (62,2%), 8 para risco indeterminado (17,8%) e 2 para baixo risco (4,4%), perfazendo um total de 38 casos de *LSIL* com *DNA* do *HPV* (84,4%). Já nos casos de alto grau, *HSIL*, todos apresentaram *DNA* do *HPV* (n = 7), sendo que, 6 foram

positivos para *HPV* de alto risco (85,7%) e 1 foi positivo para *HPV* de risco indeterminado (14,3%). O único caso de carcinoma pavimentoso foi positivo para *DNA* do *HPV* de alto risco.

Tabela 5: Correlação entre o diagnóstico citológico e *PCR*

Diagnóstico citológico	Biologia molecular				Total
	Negativo	Positivo baixo risco	Positivo alto risco	Positivo risco indeterminado	
<i>NILM</i>	920 88%	7 0,7%	67 6,4%	52 5,0%	1046 100%
<i>NILM/Actinomyces</i>	2 66,7%	0 0,0%	1 33,3%	0 0,0%	3 100%
<i>NILM/Candida</i>	45 76,3%	1 1,7%	6 10,2%	7 11,9%	59 100%
<i>NILM/Trichomonas</i>	16 84,2%	0 0,0%	1 5,3%	2 10,5%	19 100%
<i>NILM/Vaginose bacteriana</i>	58 66,7%	6 6,9%	13 14,9%	10 11,5%	87 100%
<i>NILM/Inflamação</i>	248 89,5%	4 1,4%	17 6,1%	8 2,9%	277 100%
<i>ASC-US</i>	17 68,0%	0 0,0%	5 20,0%	3 12,0%	25 100%
<i>ASC-H</i>	1 100%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100%
<i>LSIL</i>	7 15,6%	2 4,4%	28 62,2%	8 17,8%	45 100%
<i>HSIL</i>	0 0,0%	0 0,0%	6 85,7%	1 14,3%	7 100%
Carcinoma	0 0,0%	0 0,0%	1 100%	0 0,0%	1 100%
Total	1314 83,7%	20 1,3%	145 9,2%	91 5,8%	1570 100%

Fez-se o cruzamento de todas as variáveis citológicas / moleculares utilizando os testes de *Kruskal-Wallis* e do *Qui-quadrado* e obteve-se associação estatística nos seguintes casos: (Tabela 6)

- *NILM*/alterações celulares reactivas a inflamação;
- *NILM*/bactérias morfológicamente compatíveis com vaginose bacteriana;
- *ASC-US*;
- *LSIL* e *HSIL*.

Não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre os resultados citológicos de *NILM/candida spp*, *NILM/trichomonas vaginalis* ou *NILM/actinomyces* e detecção de *DNA* de *HPV*, sendo $p > 0,05$.

Dada a escassa representatividade da amostra de carcinoma pavimentoso ($n=1$), não é possível concluir neste estudo acerca da relação com a infecção por *HPV*, embora esta amostra tenha sido positiva para *HPV* de alto risco, não se verifica uma associação estatisticamente significativa com $p = 0,15$

Tabela 6: Diagnóstico citológico e detecção de *DNA* do *HPV* ($p < 0,05$)

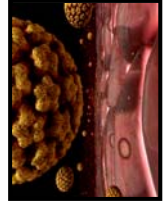
Diagnóstico Citológico	HPV	valor p
<i>NILM</i> /inflamação	+	$p = 0,003$
Vaginose bacteriana	+	$p = 0,006$
<i>ASC-US</i>	+	$p = 0,042$
<i>LSIL / HSIL</i>	+	$p = 0,000$

A percentagem de casos mais elevada para HPV de alto risco verificou-se no grupo etário dos 31-45 anos (Tabela 7).

Tabela 7: Resultado da PCR por grupo etário

Idades (Anos)	PCR				Total
	Negativo	Positivo baixo risco	Positivo alto risco	Positivo risco indeterminado	
< 30	57 4,4%	2 10%	22 15,2%	6 6,6%	87
31 - 45	610 46,4%	11 55%	72 49,6%	40 44%	733
+45	647 49,2%	7 35%	51 35,2%	45 49,4%	750
Total	1314 100%	20 100%	145 100%	91 100%	1570 100%

5. Discussão



Neste estudo não se pretendeu obter conclusões para a população geral visto os dados pertencerem a uma amostra de conveniência, no entanto foi possível correlacionar dados de biologia molecular com dados citológicos de amostras colhidas ao longo de um ano na consulta externa de Ginecologia do CHP-HSA. A sua análise permitiu também indirectamente realizar um controlo interno das citologias avaliadas no serviço, por exemplo, os diagnósticos de *NILM* ou de *SILs* e a detecção de *HPV* seguiram as tendências referidas na literatura, sem quaisquer discrepâncias, nomeadamente lesões de alto grau sem infecção por *HPV*.

Durante a década de 90 foram desenvolvidos novos métodos de processamento de amostras para citologia, designadas de preparações em meio líquido (*LBP*s), destacando-se o *Sure-Path® (TriPath Imaging)* e o *Thin-Prep® (Cytoc Corp)*, este último usado no nosso serviço por rotina e aplicado neste estudo. Comparativamente ao teste do *Papanicolaou*, designado de preparação convencional (*CP*) **surgiram diversos estudos com resultados controversos.**

Resumindo, e de acordo com a *US Preventive Service Task Force*, concluiu-se que **a evidência é insuficiente para uma recomendação a favor ou contra o uso por rotina destas novas tecnologias** no rastreio do cancro do colo do útero. **Foi reconhecida uma maior sensibilidade para o *Thin-Prep* sobre a preparação convencional** mas possivelmente à custa de uma menor especificidade. Esta *Task Force* refere que o ***Thin-Prep* poderá ser custo-eficaz no rastreio com intervalos mais longos e poderá ser útil no tratamento de *ASC-US*.** Actualmente não existem *Guidelines* especificamente recomendando as novas tecnologias de teste de *Papanicolaou (LBP*s) em favor de preparações convencionais, nomeadamente associações de renome incluindo as *American Cancer Society, American Academy of Family Physicians, American College of Preventive Medicine, and American College of Gynecology*. Mais recentemente, um estudo holandês, publicado a 28 de Outubro de 2009, de um ensaio controlado e randomizado envolvendo 89784 mulheres, concluiu contrariamente que as *LBP*s não mostrariam maior sensibilidade ou especificidade na detecção de lesões intra-epiteliais pavimentosas que as *CP*s (Albertus, G. et al., 2009).

Vantagens adicionais do *Thin-Prep®* incluem a possibilidade da realização do teste de detecção molecular do *HPV*, independentemente do método utilizado (captura híbrida ou *PCR*). Relativamente aos dados portugueses sobre a **prevalência do *HPV* na população em geral, estes ainda não estão disponíveis.** O relatório da *WHO/ICO* de 2009 estimou em **9.2%** a probabilidade de infecção por *HPV*, ao longo da vida, em mulheres do Sul da Europa, região onde Portugal está incluído. Este relatório não especifica os grupos de risco

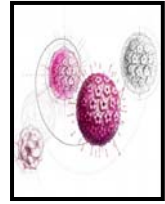
dos HPV (alto, baixo, indeterminado), refere apenas que na maioria, os dados foram relativos a estirpes de alto risco, podendo levar a uma eventual sub estimação das percentagens de HPV de baixo risco. No nosso estudo foi detectada a presença de DNA do HPV em 16.3% do total da amostra, sendo que 9.2% foram positivos para HPV de alto risco e os restantes 7,1% para baixo/indeterminado risco, valores concordantes com a referida estimativa para o Sul da Europa.

Já relativamente à infecção por HPV em **mulheres portuguesas com lesões intraepiteliais pavimentosas** temos um estudo de 2005 de Medeiros *et al.* (Medeiros et al, 2005). Este foi baseado numa amostra de conveniência (mulheres com SILs seguidas no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO do Porto), tendo-se verificado percentagens de infecção por HPV-16, nas LSIL, HSIL e CCI de 44,2, 74,2 e 80%, respectivamente. Estes autores levantaram então a hipótese da existência de uma elevada prevalência de HPV de alto risco, nomeadamente o 16, na população portuguesa, constituindo porventura um dado útil para a consideração da utilidade de um plano de vacinação em combinação com o rastreio. Comparando estas percentagens com as do nosso estudo (62,2% das LSIL e 85,7% das HSIL) verificamos a mesma tendência, embora ligeiramente superior nestes últimos pois não são específicos para HPV-16 mas sim para HPVs de alto risco. Obteve-se então uma associação estatisticamente significativa entre SILs e presença de HPV ($p=0.000$). O único caso de carcinoma invasor foi positivo para HPV de alto risco, no entanto por ser apenas um caso, a associação não foi estatisticamente significativa ($p=0,151$).

A literatura é bastante convincente no que respeita à utilidade do teste de detecção de DNA do HPV e este já faz parte de uma das opções do rastreio do cancro do colo do útero utilizada nos Estados Unidos (*consensus guidelines* para o tratamento de ASC segundo a *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, 2001*). Um estudo publicado no mesmo ano por Schiffman *et al.* 2000 e mais recentemente em 2003 por Burd complementam esta evidência de utilidade nos casos de ASC-US. No nosso estudo, das amostras classificadas como ASC-US pela citologia, 20% apresentaram infecção por HPV de alto risco, sendo que 12,0% foram positivas para HPV de risco indeterminado, tendo se verificado uma associação entre este diagnóstico e a infecção por HPV ($p=0.042$). Desta forma, ao longo de um ano, na consulta de Ginecologia do CHP evitar-se-iam 20 colposcopias (80% dos casos de ASC-US).

Para terminar, obteve-se ainda, neste estudo, uma associação significativa entre a inflamação e a presença de *HPV* ($p = 0.003$) e o desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana e a presença de *HPV* ($p=0.006$). Estes dados seguem a tendência documentada na literatura (Burd, 2003, Tavares-Murta, et al., 2008 e Watts, et al., 2005). Estes autores referem a inflamação cervical associada à infecção por *HPV* como um possível co-factor para o desenvolvimento de lesões precursoras do carcinoma cervical e o desvio da flora sugestivo de vaginose bacteriana como causa ou consequência indirecta da infecção pelo *HPV*.

6. Conclusão

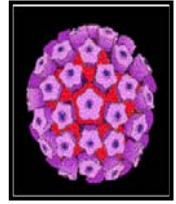


Os objectivos deste estudo foram cumpridos – os resultados da nossa amostra seguem as tendências verificadas em estudos prévios realizados em amostras da Europa e América do Norte.

Na nossa amostra a associação entre *HPV* de alto risco e *HSILs* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) bem como a associação entre a detecção de *HPVs* de alto risco/risco indeterminado e o diagnóstico de *ASC-US* ($p < 0,05$).

Neste estudo foi efectuada a detecção de *HPVs* em todas as amostras, opção não baseada na evidência científica (apenas seria útil no grupo de *ASC-US* para seleccionar casos para colposcopia, ou mulheres com idade superior a 30 anos) e portanto sem utilidade. Resta apenas referir que dos 25 casos de *ASC-US* da amostra, 20 não necessitariam de colposcopia (poupar-se-iam 80% das mulheres da realização de procedimentos desnecessários).

7. Referências Bibliográficas



Albertus, G., et al. Liquid-based cytology is not better than Pap tests for detecting cervical cancer. *JAMA* (2009).

Al-Daraji, W.I. and Smith, J.H. Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *Int J Clin Exp Pathol* **2** (2009), pp. 48-64.

Arbyn M., Anttila, A., Jordan J., ET AL., European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening, Second Edition, *International Agency for Research on Cancer* (2008), pp. 1-30.

Balmeli, C., et al., Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. *J Virol* **72** (1998), pp. 85-95.

Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K.V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87** (1995), pp. 796-802.

Burd, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* **16** (2003), pp. 1-17.

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

Ching-Hui Lin, et al., USP11 Stabilizes HPV-16E7 and Further Modulates the E7 Biological Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **23** (2008), pp. 15681-15688.

Christine F.W., et al., Physical status of multiple human papillomavirus genotypes in flow-sorted cervical cancer cells. *Cancer genetics and Cytogenetics* **175** (2007), pp. 132-137.

Clifford, G.M., Smith, J.S., Aguado, T. and Franceschi, S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* **89** (2003), pp. 101-5.

Cuzick J., Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *JAMA* **283** (2000), pp. 108-109.

David, Soper. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **2006** (2005), pp. 1-5.

DeFilippis, R. A., Goodwin, E.C., Wu, L. and DiMaio, D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol* **77** (2003), pp. 1551-63.

Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110** (2006), pp. 525-41.

FDA Approves HPV Vaccine U.S. National Institutes of Health. **3** (2008), Number 24 disponível em <http://www.cancer.gov/>;

Fehrmann, F. and Laimins, L.A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22** (2003), pp. 5201-7.

Frisch, M., Biggar, R.J., Engels, E.A. and Goedert, J.J. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA* **285** (2001), pp. 1736-45.

Garland, S.M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Harper, D.M., Leodolter, S., Tang, G.W., Ferris, D.G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F.J., Railkar, R., Esser, M.T., Sings, H.L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E. and Koutsky, L.A. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* **356** (2007), pp. 1928-43.

Genoid. *The HPV diagnostics company*. (2008).

Helmerhorst TJM, Meijer CJLM. Cervical cancer should be considered as a rare complication of oncogénico HPV infection rather than a STD. *Int J Gynecol Cancer* **160** (2002), pp. 235-236.

Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J. and Thun, M.J. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55** (2005), pp. 10-30.

Karl Munger, e.a. Mechanisms of Human Papillomavirus - Induced oncogenesis. *Journal of Virology* (2004), pp. 11451-11460.

Koss', L.G., Cytology and its Histopathologic Bases, Philadelphia, Pennsylvania USA (2006).

Koutsky, L.A., Holmes, K.K., Critchlow, C.W., Stevens, C.E., Paavonen, J., Beckmann, A.M., DeRouen, T.A., Galloway, D.A., Vernon, D. and Kiviat, N.B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* **327** (1992), pp. 1272-8.

Koutsky, L.A., Ault KA, et al., A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347** (2002), pp. 1645-1651.

Kulmala, S.M., Syrjanen, S., Shabalova, I., Petrovichev, N., Kozachenko, V., Podistov, J., Ivanchenko, O., Zakharenko, S., Nerovjna, R., Kljukina, L., Branovskaja, M., Grunberga, V., Juschenko, A., Tosi, P., Santopietro, R. and Syrjanen, K. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* **42** (2004), pp. 2470-5.

Liny, Baleja, J.D. Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins. *Front Biosci* **13** (2008), pp. 121-34.

Liu, S.S., et al., Evaluation of a newly developed GenoArray human papillomavirus (HPV) genotyping assay by comparison with Roche Linear Array HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol* (2009).

Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W. and Kurman, R.J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79** (1992), pp. 328-37.

Lorincz, A.T., Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Pap Report* **7** (1996), pp. 1-5.

Manos MM, Kinney WK, et al., Identifying women with cervical neoplasia: Using human papillomavirus DNA testing for equivocal papanicolaou results. *JAMA* **281**(1999), pp. 1605-1610.

Medeiros R., et al., Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a Southern European population at high risk of cervical cancer. *European Journal of Cancer Prevention* **14** (2005), pp. 467-471.

Morelva, T.M., et al. Detection and Genotyping of Human papillomavirus DNA Using Polymerase Chain Reaction Short PCR Fragment 10- Line Probe Assay in Abnormal Papanicolaou-Stained Cervicovaginal Smears. *Acta Cytol* **53** (2009), pp. 540-547).

Nubia Muñoz, et.al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* **348** (2003), pp. 518-27.

Oriel JD, A.J. Demonstration of virus particles in human genital warts. *Br J Vener Dis* **46** (1970), pp. 37-42

Pinto AP., et al., Limiting factors for cytopathological diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesions: a cytohistological correlation between finding in cervical smears and loop electrical excision procedure. *Diagn Cytopathol* **26** (2002), pp. 15-18.

RORENO, Relatórios 1999 a 2004. Instituto Português de Oncologia do Porto (2005). <http://www.ipoportor.pt/roreno/roreno>.

Said, H.M., Ahmed, K., Burnett, R., Allan, B.R., Williamson, A.L. and Hoosen, A.A. HPV genotypes in women with squamous intraepithelial lesions and normal cervixes participating in a community-based microbicide study in Pretoria, South Africa. *J Clin Virol* **44** (2009), pp. 318-21.

Schiffman, M. Adrianza, M.E. ASCUS-LSIL. Triage Study. Design, methods and characteristic participantes. *Acta Cytol* **44** (2000), pp. 726-742.

Shepherd, J., Weston, R., Peersman, G. and Napuli, I.Z. Interventions for encouraging sexual lifestyles and behaviours intended to prevent cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev* (2000), p. CD001035.

Smith, J.S., Bosetti, C., Munoz, N., Herrero, R., Bosch, F.X., Eluf-Neto, J., Meijer, C.J., Van Den Brule, A.J., Franceschi, S. and Peeling, R.W. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* **111** (2004), pp. 431-9.

Solomon, D., et al. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: Baseline results from a randomized trial. *JNCL* **93** (2001), pp. 293-299.

Solomon, D., et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* **287** (2002), pp. 2114-2119.

Solomon, D., Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cytology (2004).

Stanley M. A. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology* **109** (2008), pp. S15–S21.

Stanley M. A. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res* **130** (2009), pp. 266-276.

Stoler, M.H. Human papillomavirus and cervical neoplasia: A model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* **19** (2000), pp. 16-28.

Subhash, C., et al., Chapter 22. Epidemiology of Human Papilloma Virus (HPV) in Cervical Mucosa. *Methods in Molecular Biology, Cancer Epidemiology* **471** (2009).

Tavares-Murta, B.M., de Resende, A.D., Cunha, F.Q. and Murta, E.F. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **138** (2008), pp. 93-9.

Trimble, C.L., Genkinger, J.M., Burke, A.E., Hoffman, S.C., Helzlsouer, K.J., Diener-West, M., Comstock, G.W. and Alberg, A.J. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol* **105** (2005), pp. 174-81.

Trottier, H. and Franco, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* **24 Suppl 1** (2006), pp. S1-15.

Trottier, H., Mahmud, S., Costa, M.C., Sobrinho, J.P., Duarte-Franco, E., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L. and Franco, E.L. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15** (2006), pp. 1274-80.

Vinokurova Svetlane, et al., Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Research* **68** (2008), pp. 307-313.

Watts, D.H., Fazzari, M., Minkoff, H., Hillier, S.L., Sha, B., Glesby, M., Levine, A.M., Burk, R., Palefsky, J.M., Moxley, M., Ahdieh-Grant, L. and Strickler, H.D. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis* **191** (2005), pp. 1129-39.

Weaver, B.A. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc* **106** (2006), pp. S2-8.

WHO. Preparing for the introduction of HPV vaccines: policy and programme guidance for countries, World Health Organization, Geneva 2008.

WHO/ICO, I.C.o.H.a.c.C.: Summary report on HPV and cervical statistics in Portugal www.who.int/hpvcentre (2007).

WHO/ICO, I.C.o.H.a.c.C.: Human Papillomavirus and Related cancers in Portugal. Summary Report. *int/hpvcentre* (2009).

zur Hausen, H. Condylomata acuminata and human genital cancer *Cancer Res* 36:794 (1976).

zur Hausen, H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* **122** (1996), pp. 3-13.

zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92** (2000), pp. 690-8.

zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2** (2002), pp. 342-50.

Índice de Figuras

Figura 1- Da esquerda para a direita: <i>Johann Veit, Aureli Babés e Leopold G. Koss</i> (da esquerda para a direita) (adaptado de Koss', 2006).....	23
Figura 2 - Coilocitos observados em (A) biopsia do colo uterino [H&E, 40x] e (B) citologia cérvico-vaginal em meio líquido [Pap, 40x] (Fonte: Serviço de Anatomia Patológica, CHP-HSA, Portugal).....	25
Figura 3 - Da esquerda para a direita: <i>Francis P. Rous, Harald zur Hausen e Lutz Gissmann</i> (adaptado de Koss', 2006).	26
Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do <i>HPV</i> , mostrando um <i>dsDNA</i> constituído aproximadamente por 7900 nucleótidos (centro do anel) e a posição das <i>open reading frames (ORFs)</i> E1-E7 e L1-L2 (anéis externos). (adaptado de Koss', 2006).....	28
Figura 5 - Diagrama sobre o impacto das proteínas do <i>HPV</i> E6 e E7 nos vários estádios do ciclo celular (adaptado de Koss', 2006).....	30
Figura 6 - Diagrama simplificado da provável sequência de eventos desde a infecção humana pelo Papilomavírus até ao cancro invasivo do colo uterino (adaptado de Koss', 2006).....	32
Figura 7 - <i>The Bethesda System for Reporting Cytology (TBS)</i> (adaptado de Solomon, 2004).....	34
Figura 8 - As opções diagnósticas e terapêuticas para mulheres com citologia cervical anómala. A sequência de eventos neste diagrama procura incluir todas as opções terapêuticas, (adaptado de Koss', 2006).....	38
Figura 9 - Prevalência do <i>HPV</i> em mulheres com citologia normal, lesões pavimentosas intra-epiteliais e cancro do colo do útero invasor em Portugal (adaptado de (WHO/ICO, 2007).....	41
Figura 10 - Taxa de incidência mundial do cancro do colo do útero, por 100 000 habitantes, em 2002 (adaptado de IARC, 2008).....	43

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição das amostras segundo a história clínica.....	61
Tabela 2: Diagnóstico citológico de 1570 amostras de citologia cérvico-vaginal.....	62
Tabela 3: Diagnóstico citológico, achados não neoplásicos.....	63
Tabela 4: Distribuição das amostras segundo o resultado do teste de <i>PCR</i> do <i>HPV</i>	64
Tabela 5: Correlação entre o diagnóstico citológico e <i>PCR</i>	65
Tabela 6: Diagnóstico citológico e detecção de <i>DNA</i> do <i>HPV</i>	66
Tabela 7: Resultado da <i>PCR</i> por grupo etário.....	67

