FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA: PATOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL

Determinação da Prevalência da Infecção por Vírus Herpes Simples do Tipo 2 e *Chlamydia Trachomatis* em Pacientes com Adenocarcinoma de Colo de Útero: Análise por Reação de Polimerase em Cadeia

MANUELA ZEREU

Porto Alegre, 2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA: PATOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL

Determinação da Prevalência da Infecção por Vírus Herpes Simples do Tipo 2 e *Chlamydia Trachomatis* em Pacientes com Adenocarcinoma de Colo de Útero: Análise por Reação de Polimerase em Cadeia

Tese apresentada para a obtenção do Grau de Doutor em Patologia: Patologia Geral e Experiemental.

MANUELA ZEREU

Orientador:
Professor Doutor Cláudio Galleano Zettler

Co-orientadores:
Doutora Alice de Medeiros Zelmanowicz
Professor Doutor Cláudio Alexandre Pereira

Pesquisador Associado:
Doutora Jane Ulbrich Kultchinsky

Porto Alegre, 2006

Z583d Zereu, Manuela

Determinação da prevalência da infecção por vírus herpes simples do tipo 2 e chlamydia trachomatis em pacientes com adenocarcinoma de colo de útero: análise por reação de polimerase em cadeia / Manuela Zereu; orient. Cláudio Galeano Zettler, co-orient. Alice de Medeiros Zelmanowicz. Porto Alegre: FFFCMPA, 2006.

98p.

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Patologia: Patologia Geral e Experimental apresentada a Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

1. Adenocarcinoma 2. Colo do útero 3. Câncer 4. Doenças Infecciosas 5. Herpes 6. Clamydia Tracomatis 7. Epidemiologia 8. Prevalência I. Manuela Zereu II. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre III. título

CDU – 616-006.66:616.9-036.22

Agradecimentos

À minha família, pelo carinho, amor e estímulo;

Ao meu orientador, Dr. Cláudio Galeano Zettler, pela amizade, paciência e confiança;

À minha co-orientadora, Dra. Alice de Medeiros Zelmanowicz, a melhor amiga;

Ao meu colega, Dr. Eduardo Cambruzzi;

Aos amigos do laboratório Amplicon, em especial, Dra. Cláudia Rota;

Aos diretores do Centro de Câncer do Complexo Hospitalar Santa Casa, Dr. Ênio Utz e Dr. James de Freitas Fleck;

Aos colegas do Núcleo de Novos Tratamentos em Câncer do Complexo Hospitalar Santa Casa;

À Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre e Laboratório de Biologia Molecular;

Aos professores, colegas e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Patologia.

Dedico esta tese aos pacientes com câncer.

“Toda a verdade passa por três etapas:

Primeiro, ela é ridicularizada;

Depois, violentamente antagonizada;

Por fim, é aceita universalmente como auto evidente.”

Arthur Schoppenhauer

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS ……..7

INTRODUÇÃO …….8

1 REVISÃO DE LITERATURA ……..…….10

2 OBJETIVOS ……..42

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……..43

4 ARTIGO ORIGINAL ……67

4.1 Língua Portuguesa ……...67

4.2 Língua Inglesa ……..78

5 ANEXOS ……...89

5.1 Casos e Métodos ……...……...89

5.2 Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa ……..94

5.3 Figuras …….97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO Anticoncepcional oral

CDC *Center for Disease Control and Prevention*

CT *Chlamydia trachomatis*

DNA Ácido desoxirribonucléico

dNTP Desoxinucleosídeo trifosfatase

DST Doença sexualmente transmissível

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida

HPV Papiloma Vírus Humano

HSV Vírus Herpes Simples

HSV-1 Vírus Herpes Simples Tipo-1

HSV-2 Vírus Herpes Simples Tipo-2

IARC *International Agency for Research on Cancer*

INCA Instituto Nacional do Câncer

NIC Neoplasia intraepitelial cervical

OMS Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*)

PCR Reação de polimerase em cadeia (*protein chain reaction*)

INTRODUÇÃO

A despeito dos avanços nas últimas décadas, o câncer de cérvice uterina permanece sendo um problema de saúde pública. Estimativas mostram que é a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo, sendo em alguns países em desenvolvimento a principal causa de morte (Parkin, 2002).

Comparado com outros tumores, a neoplasia de cérvice uterina se caracteriza por ser um exemplo de câncer passível de prevenção. A partir de 1940, com a introdução do exame de Papanicolaou (citologia cervical), pelo Dr. George Papanicolaou, a incidência e mortalidade por neoplasia de cérvice uterina diminuiram progressivamente nos países desenvolvidos (Vizcaino, 1998). Evidências científicas indicam que a utilização de exame de citologia cervical como método de diagnóstico precoce, a cada 3 a 5 anos por mulheres com idade entre 35 e 64 anos, reduz a incidência de carcinoma invasor de cérvice uterina em pelo menos 80% (IARC, 2004).

Estudos recentes demonstram que a realização do exame de citologia cervical como método de diagnóstico precoce é efetivo tanto no tipo histológico adenocarcinoma (Mitchell, 2003; Bray, 2005a), quanto no carcinoma epidermóide de cérvice uterina (Bray, 2005b).

A infecção pelos tipos oncogênicos do Papiloma Vírus Humano (HPV) é comprovadamente um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia invasora de cérvice uterina (Walboomers, 1999). A identificação de co-fatores que aumentem o risco para o desenvolvimento desta neoplasia em mulheres com infecção pelo HPV

poderá aumentar a efetividade das medidas preventivas e de diagnóstico precoce (Castellsagué, 2003; Castle, 2003b).

Os principais co-fatores estudados são multiparidade, fatores hormonais, tabagismo, fatores nutricionais e imunológicos (Castellsagué, 2003; Castle, 2003b). O papel da inflamação cervical crônica ocasionada por outras doenças sexualmente transmissíveis como co-fator na carcinogênese do HPV, também vem sendo avaliado (Castle, 2001).

Entre as doenças sexualmente transmissíveis, o Vírus Herpes Simples Tipo 2 (HSV-2) e *Chlamydia trachomatis* (CT) são causa freqüente de cervicite crônica entre mulheres com vida sexual ativa (Castle, 2003b). Por esta razão, sua importância na carcinogênese cervical ocasionada pelo HPV está sendo estudada.

O objetivo desta tese é identificar a prevalência das infecções genitais por Vírus Herpes Simples Tipo 2 e *Chlamydia trachomatis* e sua importância como co-fatores ao HPV, aumentando o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma de cérvice uterina.

REVISÃO DE LITERATURA

1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE CÉRVICE UTERINA:

1.1 Distribuição Mundial:

O carcinoma de cérvice uterina é a segunda neoplasia mais comum em mulheres no mundo, sendo responsável por cerca de 417.000 casos novos e pelo óbito de 230.000 mulheres por ano em 2000 (Parkin, 2002). Sua incidência aumenta progressivamente a partir dos 20 anos, atingindo seu pico entre 45 e 50 anos. Quase 80% dos novos casos ocorrem em países em desenvolvimento, onde em algumas regiões, é a neoplasia mais comum entre as mulheres (Parkin, 2002).

Conforme estatísticas do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), em 2002 ocorreram 12.085 novos casos de neoplasia de cérvice uterina nos Estados Unidos (US, 2005). As maiores incidências mundiais acontecem em alguns países da América Central e do Sul (Costa Rica, Colômbia, Equador, Brasil e Argentina), e no leste e sudeste da África (Parkin, 2002).

O carcinoma epidermóide é o tipo histológico mais freqüente de neoplasia cervical, representando cerca de 75-90% dos casos de carcinoma invasor (Parkin, 2002). O adenocarcinoma de cérvice uterina é um tipo histológico relativamente raro de câncer de cérvice porém, nos Estados Unidos representa cerca de 20% dos casos de neoplasias de cérvice diagnosticadas anualmente (Smith, 2000).

Enquanto as taxas de carcinoma epidermóide invasor mostraram um declínio da incidência desta doença ao longo dos últimos anos em países que adotaram programas efetivos de exame citológico preventivo (IARC, 2004), nas duas últimas décadas as taxas de adenocarcinoma aumentaram em relação ao carcinoma epidermóide (Vizcaino, 1998; Smith, 2000; Wang, 2004; Bulk, 2005; Bray, 2005a).

1.2 Distribuição no Brasil:

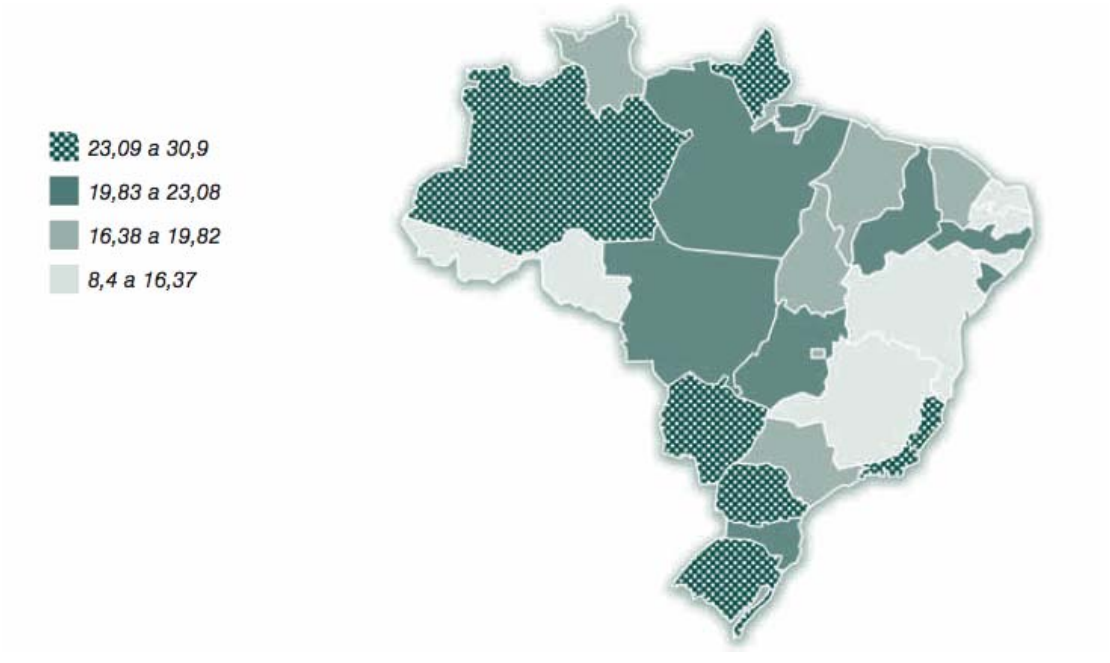
No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para 2006, 472.050 casos de câncer de qualquer topografia. Destes, 237.480 ocorrerão em mulheres. O número esperado de novos casos de carcinoma de cérvice uterina é de 19.260, com risco estimado de 20 casos para cada 100.000 mulheres (Brasil, 2006).

Sem considerar o tumor de pele não melanoma, o carcinoma de cérvice uterina é a neoplasia mais incidente na região Norte (22/100.000). Nas regiões Sul (28/100.000), Centro-Oeste (21/100.000) e Nordeste (17/100.000) representa o segundo tumor mais freqüente, após neoplasia de mama. Na região Sudeste, é o terceiro mais freqüente (20/100.000), após tumores de mama e colorretal (Brasil, 2006). A representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia de cérvice está representada na figura 1 (Brasil, 2006).

Para o estado do Rio Grande do Sul, a estimativa de novos casos de carcinoma de cérvice uterina é de 1.730 novos casos, sendo que 260 estimados para Porto Alegre (Brasil, 2006).

Em uma série que analisou retrospectivamente 1.139 casos de carcinoma de cérvice uterina de origem endocervical em um hospital público de Porto Alegre, constatou-se que 20.1% dos tumores eram do tipo histológico adenocarcinoma (Cambruzzi, 2005).

Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia de cérvice uterina por 100.000 habitantes estimadas para 2006, segundo a Unidade da Federação (Brasil, 2006).



1.3 Mortalidade:

O câncer de cérvice uterina é responsável por um grande número de mortes por câncer entre mulheres no mundo inteiro. A Organização Mundial da Saúde estima que em todo o mundo, ocorram anualmente aproximadamente 250.000 mortes ocasionadas por carcinoma invasor de cérvice uterina (www.who.int). Nos Estados Unidos em 2002, conforme estatísticas do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), ocorreram 3.952 óbitos por neoplasia de cérvice uterina (US, 2005).

A mortalidade por neoplasia de cérvice uterina ainda é extremamente elevada na América Latina. Em países como Equador, México e Venezuela a mortalidade é maior que 30/100.000 habitantes, enquanto que na maioria dos outros países chega a 20/100.000 habitantes. Somente em Porto Rico as taxas de mortalidade se assemelham as encontradas na América do Norte (4.9/100.000 e 7/100.000, respectivamente) (Bosetti, 2005).

Porém, dados de mortalidade obtidos através de atestados de óbito tem qualidade variável em diferentes países (Bosetti, 2005). Em muitos casos não é possível a diferenciação entre neoplasia de cérvice uterina e endométrio (corpo de útero). Entretanto, como a morte por neoplasia de endométrio é rara em pacientes jovens, a mortalidade por câncer de útero na faixa etária entre 35 e 64 anos reflete provavelmente, a mortalidade por carcinoma de cérvice uterina (Bosetti, 2005).

A partir da década de 1970, observou-se um declínio lento da mortalidade por carcinoma de cérvice uterina em países da América Latina, principalmente em mulheres de meia-idade, o que reflete a adoção de sistemas de rastreamento (Arossi, 2003). Entretanto, as taxas de mortalidade ainda permanecem duas a quatro vezes maior que nos países da América do Norte, o que indica a necessidade de programas de diagnóstico precoce mais eficazes nos países latino-americanos (Arossi, 2003).

Diferente do carcinoma epidermóide, onde o exame de citologia cervical diminui a morbidade e mortalidade através da detecção de lesões precursoras e a carcinoma *in situ* (Wang, 2004), o efeito dos métodos de diagnóstico precoce ainda não resultou em diminuição das taxas de mortalidade por adenocarcinoma invasor de cérvice uterina (Wang, 2004; Bulk, 2005; Sherman, 2005).

Embora a mortalidade por neoplasia de cérvice uterina tenha diminuído no País (Brasil, 2002), no Rio Grande do Sul houve um aumento linear do coeficiente bruto e padronizado de mortalidade por este tipo de tumor, de 5.3 mortes por 100.000 mulheres em 1979, período inicial da observação e 9.6 por 100.000 mulheres em 1998, período final (Kalakun, 2005).

2 NOMENCLATURA:

O câncer de cérvice uterina representa um processo de alterações progressivas do epitélio, passando através de lesões precursoras, que são identificadas através do exame de citologia cervical (Papanicolaou). Inicialmente, as alterações encontradas no exame de citologia cervical eram classificadas através do uso de diferentes nomenclaturas, dificultando o entendimento entre os especialistas.

A uniformização da nomenclatura das alterações citológicas cervicais pelo Sistema de Bethesda foi sugerida inicialmente em 1988, após uma reunião de consenso do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (The Bethesda System, 1989). Este sistema, que foi revisado em 1991 e 2001, objetiva o uso de um guia claro para o manejo clínico dos pacientes portadoras de alterações cervicais, através de um diagnóstico descritivo das alterações celulares e adequação da amostra coletada.

O Sistema de Bethesda utiliza o termo "negativo para lesões intraepiteliais ou malignas" para definir condições como a presença de células endometriais com aparência benigna, condição freqüente quando o exame Papanicolaou é coletado no período menstrual; infecções e alterações celulares reacionais, que ocorrem secundária a utilização de dispositivo intra-uterino, inflamações e pós radioterapia (Wright, 2002b).

As alterações de células epiteliais descritas pelo Sistema de Bethesda estão descritas na tabela 1 e são subdivididas em alterações de células escamosas e alterações de células glandulares (Solomon, 2002).

Tabela 1: Alterações de células epiteliais descritas no Sistema de Bethesda (Solomon, 2002).

Alterações epiteliais de células escamosas
ÈCélulas escamosas atípicas
De significado indeterminado
Não se pode excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau
ÈLesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
ÈLesão intraepitelial escamosa de alto grau
ÈCarcinoma epidermóide invasor
Alterações epiteliais de células glandulares
ÈCélulas atípicas glandulares
ÈCélulas atípicas glandulares, provavelmente neoplásicas
ÈCarcinoma endocervical *in situ*
ÈAdenocarcinoma invasor

O sistema de Bethesda também introduziu o termo "alterações de células escamosas atípicas de significado indeterminado" utilizado para descrever a existência de alterações citológicas insuficientes para designar outras lesões (Solomon, 2002). As alterações de células escamosas que ocorrem na zona de transformação cervical, classificadas previamente como condiloma, displasia ou neoplasia intraepitelial cervical são nominadas como "lesão intraepitelial escamosa" (Solomon, 2002). As alterações de células glandulares são descritas como "células glandulares atípicas" e classificam células endocervicais, endometriais e glandulares atípicas (Solomon, 2002). Casos com aspecto citológico sugestivo, mas não suficiente para a designação "adenocarcinoma *in situ*", são classificados em uma categoria intermediária denominada de "células glandulares atípicas provavelmente

3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA:

3.1 Lesões precursoras

A existência de lesões precursoras de carcinoma invasor é descrita há mais de 50 anos (Crum, 1999). O reconhecimento da existência de uma relação espacial e temporal entre carcinoma *in situ* e carcinoma invasor foi de fundamental importância para a compreensão da patogênese e o desenvolvimento de medidas de diagnóstico precoce para o câncer de cérvice uterina.

As alterações citológicas presentes nas lesões precursoras foram classificadas de várias maneiras. O sistema mais antigo utilizava a nomenclatura displasia/carcinoma *in situ* (Regan, 1956). Posteriormente, outro sistema de classificação, utilizando o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) passou a ser usado (Richart, 1969). Atualmente, o Sistema de Bethesda é a classificação mais utilizada e as lesões precursoras são descritas como lesões intraepiteliais de baixo e alto grau (Solomon, 2002).

3.1.1 Lesão intraepitelial escamosa

A lesão intraepitelial escamosa se caracteriza pela presença de proliferação celular anormal, perda da maturação e atipias celulares. A principal característica da lesão intraepitelial escamosa é a atipia nuclear (Wright, 2002b). As lesões intraepiteliais escamosas são classificadas como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau e lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

O termos lesão intraepitelial escamosa de baixo grau e lesão intraepitelial escamosa de alto grau correspondem aos achados anátomo-patológicos de lesões condilomatosas e displasia leve (NIC 1) e displasias moderada (NIC 2), severa (NIC 3) e carcinoma *in situ*, respectivamente.

A lesão intraepitelial escamosa de baixo grau é reconhecida como sendo a manifestação morfológica da infecção do epitélio escamoso pelo HPV: o efeito citopático, considerado a principal característica citológica da lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (Wright, 2002b). O efeito citopático se caracteriza citologicamente por cavitação perinuclear do citoplasma com diminuição da espessura da membrana citoplasmática, atipia nuclear e anisocitose. A combinação

de atipia nuclear e cavitação do citoplasma é conhecida como coilocitose. As lesões intraepiteliais de baixo grau tem baixa probabilidade de progressão para neoplasia invasora, representando na maioria das vezes infecções transitória por HPV (Solomon, 2002; Wrigth, 2002b).

A lesão intraepitelial escamosa de alto grau se distingue pela presença de células basais imaturas e grande variabilidade do tamanho nuclear (Wright, 2002b). Estas lesões estão freqüentemente associadas com infecção por tipos oncogênicos de HPV, e apresentam risco elevado de progressão para carcinoma invasor (Wrigth, 2002b).

3.1.2 Adenocarcinoma *in situ*

O adenocarcinoma *in situ* se caracteriza pela presença de glândulas endocervicais revestidas por células atípicas de epitélio colunar, mas sem invasão do estroma (Crum, 1999). Estas células atípicas apresentam núcleo alongado e hipercrômico, com cromatina granular, e aumento da relação núcleo:citoplasma (Wright, 2002b). Embora exista a utilização do termo displasia glandular (ou atipia glandular) não existem estudos que comprovem que estas lesões sejam precursora do adenocarcinoma invasor (Zaino, 2002).

3.2 Carcinoma invasor

Os tumores epiteliais de cérvice uterina são classificados, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em carcinoma epidermóide (ou escamoso), tumores glandulares e outros tumores epiteliais (Wells, 2003). O carcinoma invasor cervical pode se manifestar clinicamente de três maneiras distintas: lesão exofítica, lesão ulcerada ou tumor infiltrativo. A apresentação mais freqüente é a exofítica, formando uma tumoração que se projeta na mucosa cervical (Eifel, 2005).

3.2.1 Carcinoma epidermóide

A progressão das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau resulta no desenvolvimento do carcinoma micro invasor, que se caracteriza por invasão do estroma menor que 3 milímetros a partir da membrana basal do epitélio, sem envolvimento linfático ou vascular. O carcinoma invasor de cérvice em 98% dos

casos desenvolve-se na zona de transformação cervical (Wrigth, 2002a). Microscopicamente, estes tumores se caracterizam por infiltração do estroma cervical por células neoplásicas poligonais com citoplasma eosinofílico, membrana celular proeminente e múltiplas mitoses.

O carcinoma epidermóide invasor representa cerca de 75% a 90% das neoplasias invasoras de cérvice uterina (Parkin, 2002). O sistema de classificação proposto pela OMS descreve oito sub-tipos histológicos de carcinoma epidermóide de cérvice: queratinizado, não-queratinizado, basalóide, verrucoso, condilomatoso, papilar, escamo-transicional e linfoepitelioma-*like* (Wells, 2003).

3.2.2 Adenocarcinoma

O adenocarcinoma invasor desenvolve-se histogeneticamente a partir das células pluripotenciais subcolunares de reserva do epitélio colunar endocervical, e tem como lesão precursora o adenocarcinoma *in situ* (Wright, 2002a). Esta neoplasia apresenta incidência variável conforme as séries estudadas, sendo descritas freqüências de 3 a 34% dos tumores invasores da cérvice uterina (Wright, 2002a).

Pela presença de diferentes tipos celulares e padrões histológicos, a OMS determina cinco subtipos histológicos para essa neoplasia: mucinoso, endometrióide, de células claras, seroso e mesonéfrico (Wells, 2003). Entretanto, a maioria dos casos de adenocarcinoma de cérvice uterina são do subtipo mucinoso, que compreende os padrões histológicos endocervical, intestinal, de desvio mínimo, viloglandular e células em anel de sinete (Wells, 2003).

O adenocarcinoma mucinoso com padrão endocervical, é caracterizado pela predominância de células com citoplasma eosinofílico, atividade mitótica exuberante e presença de corpos apoptóticos (Young, 2002). O padrão endometrióide é composto por células semelhantes as do adenocarcinoma de corpo uterino, com núcleo oval, citoplasma escasso e ausência de mucina, tendo como principal diagnóstico diferencial carcinoma endocervical pouco diferenciado e carcinoma primário de endométrio (Wrigth, 2002a).

Os outros padrões de adenocarcinoma mucinoso são raros. O padrão de células claras corresponde a 4% dos casos e acomete principalmente mulheres com exposição ao dietilestilbestrol na vida intra-uterina (Wrigth, 2002a). Na microscopia,

apresenta células claras, com citoplasma eosinofílico, ricas em glicogênio e com núcleo evidente. O adenocarcinoma mucinoso de desvio mínimo representa cerca de 1 a 3% dos casos de adenocarcinoma, sendo um tumor extremamente diferenciado, caracterizado por glândulas neoplásicas localizadas profundamente no estroma e com raras mitoses (Wrigth, 2002a). Os tumores com padrão histológico seroso e mesonéfrico são infreqüentes, sendo o primeiro, microscopicamente igual aos adenocarcinoma de ovário e de endométrio (Wrigth, 2002a).

4 ETIOLOGIA – INFECÇÃO PELO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)

Evidências demonstram que a infecção persistente por tipos carcinogênicos do HPV é necessária para o desenvolvimento de carcinoma cervical (Bosh, 2002) e lesões precursoras (Schiffman, 1993; Kjaer, 2002). Conforme demonstrado por Walboomer e colaboradores, esta infecção ocorre em 99.7% dos casos de carcinoma invasor de cérvice uterina (Walboomers, 1999), tornando a existência de carcinoma epidermóide de cérvice uterina sem a infecção pelo HPV extremamente incomum (Herrington, 1999; Walboomers, 1999).

A prevalência da infecção genital por HPV entre mulheres com exame citopatológico de cérvice uterina normal, varia amplamente entre diferentes países (Clifford, 2005). Nos Estados Unidos, estima-se que 20 milhões de pessoas estejam infectadas por este vírus e que a cada ano 5.5 milhões adquiram infecção genital pelo HPV (Cates, 1999). No Brasil a prevalência desta infecção é similar nas diferentes regiões do País. Na região Nordeste, cerca de 26% das mulheres apresentam infecção por HPV (de Lima Soares, 2003). No estado do Rio de Janeiro, em mulheres com exame citopatológico normal, a prevalência da infecção pelo HPV foi de 25% (Carvalho, 2005). Em Porto Alegre, um estudo transversal conduzido por Nonnenmacher e colaboradores, que incluiu somente mulheres assintomáticas, demonstrou prevalência de infecção pelo HPV em 27% dos casos (Nonnenmacher, 2002).

Diferentes técnicas laboratoriais permitiram a identificação de mais de 50 tipos de HPV que infectam o trato genital feminino (Altekruse, 2003). Evidências epidemiológicas indicam que os HPV tipo 16 e 18 são carcinogênicos e mais comumente associados ao câncer de colo do útero. Infecções pelos tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ou 66 também podem levar ao desenvolvimento de neoplasia de cérvice uterina (Muñoz, 2003; IARC, 2005).

A história natural da infecção pelo HPV mostra que a exposição inicial ao vírus ocorre em mulheres jovens, após início da atividade sexual (Ho, 1998; Kjaer, 2001). A maioria das mulheres desenvolvem infecções transitórias, por um período relativamente curto, e na maioria das vezes evoluem para a negativação do DNA do HPV. Somente uma pequena proporção de mulheres expostas ao HPV tornam-se persistentemente infectadas e continuam a ter níveis detectáveis de DNA viral no epitélio genital (Wallin, 1999). Estas mulheres apresentam risco de evolução para lesões intraepiteliais de alto grau persistentes e para carcinoma invasor.

A distribuição mundial da infecção por tipos específicos de HPV em lesões intraepiteliais de alto grau e carcinoma invasor foi avaliada em uma meta-análise de 85 e 52 estudos publicados, respectivamente, que incluíram 4.151 casos de lesão intraepitelial escamosa de alto grau e 10.058 casos de neoplasia cervical invasora (Clifford, 2003a). Nesta meta-análise, os tipos mais comuns de HPV identificados em carcinoma de cérvice foram, em ordem de prevalência decrescente, HPV 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6 51, 68, 39, 82, 73, 66 e 70. Dois terços dos casos de carcinoma de cérvice estavam associados a infecção pelo HPV 16 (51%) e HPV 18 (16.2%). Os outros tipos de HPV mais encontrados foram o HPV 45 (2-8%), HPV 31 (2-7%) e HPV 33 (3-5%).

Um estudo recente avaliou a prevalência da infecção pelo HPV em casos de citologia cervical alterada no Brasil (Schlecht, 2003). Neste estudo, a infecção pelo HPV ocorreu em 32% dos exames citológicos com presença de células escamosas atípicas de significado indeterminado, 61% dos exames com lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau e em 71% dos casos com lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (Schlecht, 2003).

No Brasil, estudos refletem o padrão mundial no que diz respeito a relação do HPV com carcinoma de cérvice. Em um estudo de casos-controle realizado em São

Paulo, Eluf-Neto e colaboradores demonstraram presença do DNA do HPV em 84% dos casos de neoplasia de cérvice, comparado com 17% nos controles (Eluf-Neto, 1994). Nesta mesma amostra, os tipos mais freqüentes foram os HPV 16, 18, 31 e 33. Em um estudo retrospectivo conduzido no Rio de Janeiro, o DNA do HPV foi identificado em 55.2% dos casos de carcinoma epidermóide de cérvice uterina sendo que os tipos 16 e 18 representavam 33.6% (Cavalcanti, 2000).

A relação causal entre HPV e carcinoma epidermóide de cérvice uterina está bem estabelecida (Walboomers, 1999). Estudos demonstram que, assim como para carcinoma epidermóide, a infecção pelo HPV é um fator de risco importante para o desenvolvimento do adenocarcinoma de cérvice uterina (Walboomers, 1999; Bosch, 2002; Cambruzzi, 2005), embora a prevalência de HPV no adenocarcinoma seja menor do que a reportada para carcinoma epidermóide (Iwasawa, 1996; Walboomers, 1999; Pirog, 2000; Andersson, 2001; Zielinski, 2003; Cambruzzi, 2005). Castellsagué e colaboradores, em um estudo multicêntrico de casos-controle conduzido pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), que avaliou infecção pelo HPV por técnica de PCR em tecido congelado, demonstrou que o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma de cérvice uterina é 81.3 vezes maior nos casos com infecção pelo HPV do que nos casos sem infecção por este vírus (95%IC=42.0-157.1) (Castellsagué, 2006).

A infecção pelos tipos oncogênicos de HPV 16 e 18 é a mais prevalente em casos de adenocarcinoma de cérvice uterina, assim como em carcinoma epidermóide (Clifford, 2003a). Entretanto, ao contrário do descrito para carcinoma epidermóide, o HPV 18 é o tipo mais encontrado em adenocarcinoma sendo o HPV 16 menos freqüente neste tipo histológico (Iwasawa, 1996; Andersson, 2001; Clifford, 2003b; Muñoz, 2003; Zielinski, 2003; Bulk, 2006).

Deve ser enfatizado que embora a infecção por tipos oncogênicos do HPV seja importante para o desenvolvimento de neoplasia invasora da cérvice uterina, isoladamente ela não é suficiente para o desenvolvimento do câncer. O longo período de latência entre a exposição inicial ao HPV e o desenvolvimento do câncer e o fato que somente um pequeno número de mulheres infectadas pelo HPV desenvolvem doença cervical, sugere que outros co-fatores sejam necessários na patogênese desta

neoplasia, incluindo condições que promovam a manutenção da infecção, sua transformação em lesões de alto grau e a evolução para neoplasia invasora.

5 CO-FATORES:

Está estabelecido que a infecção por tipos oncogênicos de HPV é importante para o desenvolvimento de lesões precursoras e neoplasia de cérvice uterina (carcinoma epidermóide e adenocarcinoma) (Walboomers, 1999). Entretanto como citado anteriormente, a infecção isoladamente não é suficiente para causar o câncer e outros co-fatores devem existir para, em conjunto com o HPV, influenciar o risco da progressão de infecção para carcinoma invasor (Castellsagué, 2003). Estes co-fatores podem ser fatores ambientais, relacionados ao hospedeiro ou relacionados ao HPV. A identificação destes co-fatores é importante não somente para um melhor entendimento da etiologia do câncer de cérvice, mas também para o desenvolvimento de estratégias de prevenção.

Vários co-fatores ao HPV têm sido estudados. Destes, os mais freqüentemente descritos são tabagismo, uso de anticoncepcional oral e multiparidade (Castle, 2003b). Entretanto, eles não são identificados em todos os casos de carcinoma de cérvice, por isso outros possíveis co-fatores vem sendo investigados, entre eles dieta, obesidade, fatores hormonais, outras doenças sexualmente transmissíveis e história familiar. Embora existam diversos estudos avaliando co-fatores, muitos deles não foram controlados pela infecção pelo HPV ou utilizaram diferentes técnicas de identificação da infecção, o que dificulta a comparação dos resultados.

Além disto, devido a baixa prevalência de adenocarcinoma de cérvice uterina, a avaliação de co-fatores na carcinogênese do adenocarcinoma fica restrita a sub-análise deste tipo histológico em estudos que incluíram todos os tipos histológicos de carcinoma cervical invasor.

Visto que o HPV tem papel central na carcinogênese tanto do carcinoma epidermóide quanto do adenocarcinoma de cérvice uterina, possivelmente estes tipos histológicos compartilhem alguns co-fatores, principalmente os relacionados ao comportamento sexual (Shiffman, 2003; Berrington de Gonzáles, 2004). Estudos

mostram que o número de parceiros sexuais, multiparidade e uso de anticoncepcionais orais são co-fatores compartilhados tanto por adenocarcinoma quanto por carcinoma epidermóide de cérvice uterina (Muñoz, 2002; Altekruse, 2003; Smith, 2003; Berrington de Gonzáles, 2004; Castellsagué, 2006).

5.1 Anticoncepcional Oral

Vários estudos avaliam a relação do uso de anticoncepcionais orais (ACO) com risco de carcinoma de cérvice uterina. A principal hipótese para esta associação é a facilitação da carcinogênese cervical pelo uso de ACO, através da manutenção da zona de transformação cervical na ectocérvice, aumentando assim sua vulnerabilidade a infecção pelo HPV (de Villiers, 2003), e a ativação da região regulatória do gene do HPV pela interação com os hormônios esteróides (Moodley, 2003).

O papel do ACO como co-fator ao HPV foi avaliado em uma meta-análise de 28 estudos publicados, incluindo 12.531 mulheres com carcinoma *in situ* ou invasor de cérvice uterina (Smith, 2003). Este estudo mostrou que o risco associado ao uso de ACO por menos de 5 anos, 5 a 9 anos e mais de 10 anos é de 10%, 60% e 120%, respectivamente. Estes resultados foram similares em carcinoma *in situ* e invasor, carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma, e permanecem mesmo após ajuste para infecção por HPV, número de parceiros sexuais, realização de exames preventivos, tabagismo e uso de métodos anticoncepcionais de barreira. Estes resultados sugerem que a associação é consistente e forte.

Um estudo não controlado pela infecção pelo HPV demonstrou que o uso de ACO se associa a um risco aumentado de adenocarcinoma de cérvice (Ursin, 1994). Dois estudos demonstraram associação significativa entre o uso de ACO e adenocarcinoma *in situ* de cérvice, mas não com adenocarcinoma invasor, após controle de infecção pelo HPV por técnica de PCR (Lacey, 1999; Madeleine, 2001). Castellsagué e colaboradores em uma análise conjunta de oito estudos de caso-controle demonstraram que o risco de adenocarcinoma de cérvice aumenta com o aumento do tempo de uso de ACO (Castellsagué, 2006).

Shields e colaboradores, em um estudo que avaliou a infecção pelo HPV através de sorologia, não encontraram relação do uso de ACO com desenvolvimento

de neoplasia de cérvice (carcinoma epidermóide e adenocarcinoma) em casos com infecção pelo HPV (Shields, 2004a).

5.2 Multiparidade

As possíveis hipóteses para a multiparidade aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasia de cérvice são a manutenção da zona de transformação na ectocérvice por períodos prolongados, facilitando a exposição ao HPV e outros co-fatores (Autier, 1996) e a modulação da resposta imune ao HPV com as alterações hormonais induzidas pelo aumento dos níveis de estrogênio e progesterona na gestação (Sethi, 1998).

A multiparidade está associada com carcinoma *in situ* e carcinoma invasor de cérvice uterina em mulheres com infecção pelo HPV na maioria dos estudos de casos-controle. O número de gestações a termo em mulheres com infecção pelo HPV se associou diretamente ao risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide de cérvice uterina (Muñoz, 2002; Altekruse, 2003; Hinkula, 2004). Estes estudos, demonstraram que o risco foi significativamente maior em mulheres com mais de cinco gestações.

Embora os estudos citados anteriormente também tenham avaliado a multiparidade como co-fator ao HPV no desenvolvimento do adenocarcinoma de cérvice uterina, eles não demonstraram associação significativa (Muñoz, 2002; Altekruse, 2003; Hinkula, 2004).

Um estudo multicêntrico que incluiu 167 casos de adenocarcinoma cervical (67% adenocarcinoma invasor e 33% carcinoma adenoescamoso) e 1.881 controles demonstrou que o risco de adenocarcinoma aumenta com o número de gestações (P_{trend} = 0.2) em pacientes com infecção pelo HPV, sendo mais importante em mulheres com oito ou mais gestações (Castellsagué, 2006).

5.3 Tabagismo

O mecanismo pelo qual a exposição ativa ou passiva ao tabaco aumenta a carcinogênese cervical é desconhecido, mas acredita-se que as toxinas do tabaco se incorporem no DNA alterando os mecanismos de regulação das células da cérvice uterina (Haverkos, 2003). Um estudo de coorte prospectivo demonstrou que o fumo

também promove a carcinogênese da cérvice uterina pelo aumento na duração e diminuição da resolução da infecção pelo HPV (Giuliano, 2002), e também é fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau e alto grau em mulheres infectadas pelo HPV (Harris, 2004; McIntyre, 2005).

Dois estudos de coorte não controlados pela infecção por HPV, demonstraram existência de associação positiva entre tabagismo passivo e risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e carcinoma invasor de cérvice uterina (Tay, 2004; Trimble, 2005).

A associação entre tabagismo e carcinoma epidermóide de cérvice uterina em mulheres infectadas pelo HPV está estabelecida por diversos autores (Lacey, 2001; Plummer, 2003; IARC, 2006). Estes estudos demonstraram que mulheres com história de tabagismo atual ou passado e infecção pelo HPV, apresentam risco aumentado para carcinoma epidermóide de cérvice uterina.

Nenhuma associação entre tabagismo e adenocarcinoma de cérvice uterina em casos com infecção pelo HPV foi demonstrada nos estudos supracitados (Lacey, 2001; Plummer, 2003; IARC, 2006). Castellsagué e colaboradores, em um estudo multicêntrico recente, que incluiu 167 casos de adenocarcinoma de oito estudos de caso-controle, também não demonstraram associação entre tabagismo e adenocarcinoma invasor de cérvice uterina em casos com infecção pelo HPV (Castellsagué, 2006). Neste estudo, a baixa prevalência de tabagismo na população estudada limita o poder estatístico desta associação.

5.4 Nutrientes

Diversos estudos avaliaram a relação da dieta e estado nutricional com risco de persistência da infecção pelo HPV e desenvolvimento de neoplasia de cérvice uterina. Evidências reportam um efeito protetor do folato, vitamina B12, riboflavina e tiamina contra o carcinoma cervical (Hernandez, 2003; Powers, 2005).

Garcia-Closas e colaboradores, em uma revisão sistemática de trinta e três estudos controlados pelo HPV realizados entre 1995 e 2003, categorizaram evidências relacionando aspectos da dieta e estado nutricional na carcinogênese da cérvice uterina (Garcia-Closas, 2005). Evidências científicas demonstram um possível efeito protetor de frutas, vegetais, vitaminas C e E, caroteno (alfa e beta) e

licopeno diminuindo a persistência da infecção pelo HPV e um provável efeito protetor de folato, retinol e vitamina E na neoplasia invasora de cérvice (Garcia-Closas, 2005). Esta revisão concluiu que estudos de coorte são necessários para avaliar adequadamente a importância da alimentação e nutrientes como co-fatores na carcinogênese ocasionada pelo HPV.

5.5 História familiar

A avaliação da história familiar como co-fator a infecção pelo HPV é difícil pois não se pode excluir a participação de aspectos culturais e ambientais compartilhados pelos grupos familiares, na susceptibilidade genética para a neoplasia e nas práticas preventivas adotadas por estas famílias (Bosch, 2003).

Fatores genéticos podem conferir risco baixo ou elevado para determinado tipo de câncer, susceptibilidade a carcinógenos ambientais e resposta a agentes infecciosos. Estudos mostram associação entre alelos do antígeno leucocitário humano e risco de desenvolvimento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas de cérvice uterina, suportando a importância de fatores hereditários na etiologia desta neoplasia (Hildesheim, 2002; Wang, 2003).

Em uma revisão de literatura que avaliou estudos publicados relacionando a história familiar de câncer como fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia de cérvice, Zelmanowicz e colaboradores concluíram que a suscetibilidade genética pode estar associada com risco de desenvolvimento de carcinoma de cérvice uterina (Zelmanowicz, 2004).

Weber e colaboradores avaliaram a história familiar de câncer em mulheres da América Latina em um estudo que incluiu 335 mulheres com carcinoma invasor de cérvice uterina e 335 controles sem neoplasia (Weber, 2005). Este estudo não encontrou associação positiva da história familiar de neoplasia de útero em familiares de primeiro grau de mulheres com carcinoma de cérvice uterina.

Um estudo recente sugere que a história neoplasia de cérvice em familiares de primeiro grau está associada a um risco aumentado de neoplasia intraepitelial e carcinoma epidermóide cervical (Zelmanowicz, 2005). Este mesmo estudo demonstrou que a associação não foi evidente para adenocarcinoma de cérvice.

5.6 Fatores hormonais

A hipótese que hormônios sexuais femininos teriam influência na carcinogênese do HPV baseia-se no fato da cérvice uterina apresentar receptores hormonais de estrogênio e progesterona (Ford, 1983) e também nas evidências que multiparidade e uso de ACO (associados com elevação dos níveis de hormônios sexuais) aumentam o risco de neoplasia de cérvice uterina. Entretanto, estudos epidemiológicos não demonstraram um efeito importante desta exposição.

Um estudo de caso-controle que mensurou níveis plasmáticos de hormônios sexuais em mulheres pré e pós menopáusicas com lesões intraepiteliais e carcinoma invasor, também não demonstrou associação consistente entre hormônios sexuais o desenvolvimento de neoplasia de cérvice em mulheres infectadas pelo HPV (Shields, 2004b).

Um estudo multicêntrico de casos-controle, que incluiu casos de carcinoma de cérvice uterina (124 casos de adenocarcinoma e 139 casos de carcinoma epidermóide) e controles saudáveis, avaliou a associação do uso de terapia de reposição hormonal com risco de neoplasia invasora de cérvice uterina. Um excesso de risco foi descrito relacionando a reposição de estrogênio sem oposição de progesterona com adenocarcinoma de cérvice, porém esta associação não foi positiva para carcinoma epidermóide (Lacey, 2000).

5.7 Obesidade

A obesidade está associada ao desenvolvimento de neoplasia de mama, vesícula biliar, rim, cólon e reto e endométrio (Danaei, 2005). Entretanto, o impacto da obesidade na incidência da neoplasia de cérvice uterina foi pouco estudado. Em um estudo prospectivo avaliando obesidade e risco de câncer na população sueca, Wolk e colaboradores relataram uma associação positiva entre obesidade e neoplasia invasora de cérvice uterina (carcinoma epidermóide e adenocarcinoma) (Wolk, 2001).

Embora a associação entre carcinoma epidermóide de cérvice uterina e obesidade não tenha sido demonstrada (Lacey, 2003), estudos evidenciaram associação com adenocarcinoma cervical. Um estudo de base populacional nos Estados Unidos, demonstrou associação positiva entre peso elevado e

adenocarcinoma de cérvice (Ursin, 1996). E um estudo de caso-controle que avaliou 124 mulheres com adenocarcinoma e 307 controles, demonstrou que o aumento do índice de massa corporal e da relação cintura-quadril apresenta associação positiva com adenocarcinoma de cérvice uterina (Lacey, 2003). Neste mesmo estudo, a análise utilizando apenas controles com infecção pelo HPV evidenciou associação similar.

5.8 Imunidade

Indivíduos com imunossupressão causada pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) ou transplante de órgãos apresentam um risco aumentado para tumores ano-genital associado ao HPV quando comparado aos indivíduos saudáveis (Palefsky, 2003). A persistência da infecção pelo HPV causada pela diminuição da imunidade é um dos possíveis mecanismos para esta associação (Schiffman, 2003).

A relação da imunossupressão com a carcinogênese ocasionada pelo HPV pode ser estudada em carcinoma de ânus em homossexuais masculinos portadores da síndrome da imunodeficiência humana adquirida, que tem um risco fortemente aumentado para esta doença (Ching-Hong, 2002). À semelhança da cérvice uterina, o ânus apresenta uma zona de transformação suscetível a infecção pelo HPV, que pode ser identificada por PCR em 46-94% dos casos desta neoplasia (Frisch, 1999).

Um estudo recente demonstrou associação positiva entre desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas e imunossupressão pelo HIV (Hawes, 2006). Não existem estudos avaliando a relação da imunossupressão com risco de desenvolvimento de adenocarcinoma de cérvice uterina.

5.9 Co-Infecções

Desde a década de 1970, quando foi descrita a associação de doenças sexualmente transmissíveis (DST) com câncer de cérvice uterina (Schachter, 1975; Schmauz, 1989), vários agentes sexualmente transmissíveis foram associados à esta neoplasia. Embora a infecção pelo HPV seja o principal fator etiológico para esta neoplasia (Walboomers, 1999), estudos sugerem que outras DST possam ser um co-fator ao HPV na carcinogênese cervical.

O papel de co-infecções na carcinogênese cervical ocasionada pelo HPV ainda é pouco conhecido, mas a indução da inflamação crônica da cérvice uterina causada por outras DST é um mecanismo biológico plausível, pois não existem evidências que a infecção pelo HPV isoladamente induza a um estado inflamatório da cérvice (Ames, 1995).

Existem evidências associando taxas mais elevadas de neoplasia de cérvice uterina em áreas com alta incidência de cervicite causada por DST (Castle, 2001). A inflamação responsável pela síntese de prostaglandinas, vem sendo considerada fator de risco para diferentes neoplasias, e o aumento da expressão de ciclooxigenase-2 foi associado ao carcinoma invasor de cérvice uterina (Kulkarni, 2001), principalmente em casos de adenocarcinoma cervical (Chen; 2003). O mecanismo através do qual as co-infecções por outras DST se associam ao HPV na carcinogênese, promovendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvice uterina ainda é pouco conhecido. Entretanto, a principal hipótese biológica estudada é a facilitação da carcinogênese cervical pelas co-infecções genitais por HSV-2 e CT, através da reação inflamatória intensa e crônica da cérvice uterina, visto que, como citado acima, a infecção cervical pelo HPV não é de natureza inflamatória (Ames, 1995).

Estudos demonstram que a inflamação que ocorre em resposta a exposição crônica a agentes infecciosos ou irritativos pode estar associada ao desenvolvimento de diferentes neoplasias malignas (O'Byrne, 2001; Chan, 2002). A produção aumentada de mediadores da resposta inflamatória, como a ciclooxigenase-2, citocinas e prostaglandinas, ocasiona a supressão da imunidade celular e promove a angiogênese, fatores que facilitam a carcinogênese (O'Byrne, 2001).

A associação da carcinogênese cervical com a inflamação da cérvice uterina foi demonstrada em alguns estudos. Castle e colaboradores em 2001, em uma coorte de mulheres da Costa Rica, demonstraram associação positiva entre cervicite inespecífica e lesões cervicais de alto grau em casos com infecção pelos tipos oncogênicos de HPV (Castle, 2001). Kulkarni e colaboradores demonstraram em cultura de células humanas, que a ciclooxigenase-2, está superexpressa em carcinoma de cérvice quando comparada ao tecido normal, sugerindo que a inflamação mediada pela ciclooxigenase-2, está relacionada a carcinogênese cervical (Kulkarni, 2001). Chen e colaboradores, demonstraram que a superexpressão da

ciclooxigenase-2 é mais freqüente em casos de adenocarcinoma do que em carcinoma epidermóide de cérvice uterina, o que sugere uma relação causal (Chen, 2003).

A associação da infecção pelo HSV-2 e pela CT com a neoplasia de cérvice uterina vem sendo estudada por muitos autores. Em revisão no *Medline* os primeiros relatos desta associação ocorreram na década de 1970, por Schachter e colaboradores (Schachter, 1975). Desde então, estudos com diversas metodologias e diferentes técnicas para a detecção destas DST vem sendo publicados.

Estudos recentes sugerem a associação consistente das infecções por Vírus Herpes Simples Tipo 2 (HSV-2) e *Chlamydia trachomatis* (CT) com risco aumentado de desenvolvimento de lesões precursoras e carcinoma cervical invasor (Schachter, 1982; Meng, 1989; Daling, 1996; Olsen, 1998; Hakama; 2000; Koskella, 2000; Antilla, 2001; Smith, 2002a; Tamim, 2002; Wallin, 2002; Hinkula, 2004; Smith, 2004; Golijow, 2005;Pérez, 2006).

5.9.1 Herpes Simples Tipo 2

a. Técnicas de detecção da infecção

Os testes disponíveis para a detecção da infecção pelo HSV-2 são métodos laboratoriais, que incluem a cultura do vírus e a sorologia e métodos de diagnóstico molecular, que permitem a identificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) viral.

A cultura de vírus foi a base do diagnóstico da infecção pelo Vírus Herpes Simples (HSV) nas últimas duas décadas (Scoular, 2002). Embora permita o diagnóstico de infecção ativa, a identificação do tipo de vírus e a sensibilidade aos agentes antivirais, é uma técnica lenta que tem sua sensibilidade afetada pela evolução da doença, sendo maior quando o material é coletado de lesões bolhosas e diminuindo com a cicatrização e formação de crostas (Corey, 1983).

Os testes sorológicos detectam anticorpos contra o HSV e indicam infecção atual ou passada. Embora as técnicas mais antigas apresentassem potencial de reação cruzada entre HSV-1 e HSV-2, dificultando a identificação do tipo viral, o desenvolvimento dos testes específicos utilizados atualmente permite o diagnóstico etiológico preciso da exposição (Ashley, 2001).

O teste sorológico de enzima-imunoensaio específico para identificação de anticorpos para as glicoproteínas G-1 e G-2, permite a diferenciação entre a infecção por HSV-1 e HSV-2, sendo a técnica utilizada na maioria dos estudos (Ashley, 2001). Este teste apresenta como principal limitação a variação da sensibilidade na identificação da infecção por HSV-2 entre as diferentes marcas comercializadas (Ashley, 2001). A identificação sorológica de antígenos específicos pela técnica de *western blot*, é o padrão-ouro utilizado atualmente para o diagnóstico de infecção por HSV (Martins, 2001). Este teste permite a identificação do tipo viral, mas devido ao seu alto custo e complexidade, tem seu uso limitado a laboratórios de pesquisa.

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular permite a identificação do DNA viral integrado ao genoma humano pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), que pode ser utilizada para avaliação de qualquer material biológico que contenha DNA. O uso de seqüências iniciadoras específicas (*primers*) possibilita o diagnóstico específico do tipo de infecção (Madhavan, 2003). Embora tenha também seu uso limitado pelo custo elevado, esta técnica apresenta execução rápida e maior sensibilidade que a cultura viral, e também permite a identificação entre os tipos de HSV (Marshall, 2001).

Por possibilitar o estudo de tecido conservado em parafina, a técnica de PCR permite a realização de estudos de prevalência retrospectivos (Iftner, 2003). Esta técnica identifica o genoma do HSV-2 integrado ao genoma humano em 59 a 89% dos casos (Scoular, 2002) e apresenta maior rapidez e sensibilidade que a cultura do vírus, sendo considerada atualmente o padrão ouro na identificação da infecção por HSV-2 (Slomka, 2000; Marshall, 2001).

b. Relação com carcinoma de cérvice uterina

O herpes genital é uma doença sexualmente transmissível, sendo que a infecção é mais freqüentemente causada pelo HSV-2, embora o HSV-1 também esteja associado na etiologia destas infecções, principalmente adolescentes e adultos jovens (Lafferty, 2000; Roberts, 2005). Após a infecção inicial o HSV-2 fica latente nos gânglios nervosos sensoriais, causando episódios intermitentes de infecção recorrente, que ocorrem por reativação e replicação viral.

A prevalência e incidência mundial da infecção por HSV-2 foi demonstrada pela comparação direta de estudos soro-epidemiológicos conduzidos em diferentes países (Malkin, 2004; Weiss, 2004). Considerando-se as variações de sensibilidade entre os testes diagnósticos e as variações demográficas entre as populações estudadas, a prevalência da infecção por HSV-2 foi maior nos países em desenvolvimento do que nos países desenvolvidos. No Brasil, estudos de soro-prevalência demonstram que prevalência da infecção por HSV-2 varia entre 30% e 72%, conforme as características do grupo populacional estudado (de Sanjosé, 1994; Smith, 2001; Smith, 2002b; Cowan, 2003).

Estudos soro-epidemiológicos realizados com testes validados específicos para o diagnóstico de infecção por HSV-2 enfatizam o curso relativamente assintomático desta infecção (Slomka, 2000). Por apresentar-se clinicamente de maneiras diversas, desde infecção assintomática até o quadro característico com lesões herpéticas clássicas (vesiculares ou ulceradas), a infecção genital por HSV-2 freqüentemente é sub-diagnosticada e não tratada de forma adequada, o que facilita a transmissão da doença.

Fundamentados em estudos *in vitro* e culturas de células, que sugerem que o vírus herpes simples cause amplificação do HPV e facilite da integração do HPV nas células cervicais, facilitando a carcinogênese (Hara, 1997; Di Paolo, 1998), muitos autores avaliaram a associação da infecção pelo HSV-2 com carcinoma invasor de cérvice uterina. Devido a variação entre as técnicas de detecção da infecção por HSV-2, a associação da infecção com o desenvolvimento de carcinoma cervical difere entre os estudos publicados.

Os estudos que utilizaram a técnica de enzima-imunoensaio para identificação sorológica da infecção pelo HSV-2 não foram concordantes quanto a existência de associação entre a infecção com o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical e câncer invasor de cérvice uterina. Em uma série de casos publicada recentemente, a infecção por HSV-2 não se associou a um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (Castle, 2003a), assim como descrito em dois estudos de casos-controle, que incluíram casos de neoplasia intraepitelial cervical, carcinoma epidermóide e adenocarcinoma de cérvice uterina (Muñoz, 1995; Lehtinen, 2002).

Em oposição ao descrito acima, em um estudo de casos-controle que incluiu 314 casos de carcinoma epidermóide de cérvice uterina, Daling e colaboradores relataram que a presença de infecção por HSV-2, identificada por técnica de enzima-imunoensaio está associada a um risco aumentado de câncer somente em casos sem infecção pelo HPV (Daling, 1996), enquanto Olsen e colaboradores, descreveram existência de um efeito combinado entre as infecções HSV-2 e HPV na carcinogênese cervical, utilizando a mesma técnica (Olsen, 1998).

Os estudos multicêntricos de casos-controle, coordenados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), que avaliaram a presença de infecção pelo HSV-2 através da técnica de *western blot*, mostraram associação positiva entre a presença de infecção sorológica por HSV-2 e risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma cervical (Smith, 2002a; Castellsagué, 2006). A análise agrupada destes estudos, demonstrou que a sorologia positiva para o HSV-2 estava associada a risco aumentado de carcinoma epidermóide (OR=2.19; 95% CI=1.41-3.40) e adenocarcinoma de cérvice uterina (OR=2.63; 95% IC=1.30-5.29), em mulheres com infecção pelo HPV (Smith, 2002a)

Talvez por limitações relacionadas ao custo e necessidade de equipe técnica treinada, poucos autores tenham utilizado a técnica de PCR para o diagnóstico da infecção por HSV-2 em casos de neoplasia de cérvice uterina (Meng, 1989; Lulitanond, 1994; Yamakama, 1994; Koffa, 1995; Han, 1997; Tran-Thanh, 2003; Yang, 2004; Pérez, 2006). Estes estudos apresentaram resultados divergentes quanto a associação entre infecção por HSV-2 e carcinoma de cérvice uterina. A presença do DNA do HSV-2 em espécimes de carcinoma cervical invasor de cérvice foi demonstrada por alguns autores (Meng, 1989; Lulitanond, 1994; Yamakama, 1994; Koffa, 1995; Han, 1997; Pérez, 2006), entretanto estes estudos em sua maioria, incluíram de casos de carcinoma epidermóide e adenocarcinoma de cérvice uterina.

Antes da comprovação do papel central do HPV na carcinogênese da cérvice uterina, Meng e colaboradores, descreveram em uma série que incluiu 49 casos de carcinoma invasor de cérvice uterina (46 casos de carcinoma epidermóide e 3 casos de adenocarcinoma), a presença do DNA do HSV-2 em apenas dois casos sendo ambos carcinoma epidemóide (Meng, 1989).

A associação da infecção pelo HSV-2 com carcinoma invasor de cérvice uterina foi descrita por Lulitanond e colaboradores, em uma série de 37 casos onde 7 apresentavam DNA do HSV-2 (Lulitanond, 1994), e também por Yamakama e colaboradores, em outra série que incluiu 82 casos sendo que 13 (41%) apresentavam infecção pelo HSV-2 (Yamakama, 1994). Os estudos conduzidos por Koffa e colaboradores e por Han e colaboradores tembém descreveram a existência de uma associação positiva entre infecção por HSV e carcinoma invasor de cérvice uterina, entretanto estes estudos não utilizaram diferenciaram infecção por HSV-1 e HSV-2 (Koffa, 1995; Han, 1997).

Tran-Thanh e colaboradores, em um estudo retrospectivo que incluiu 50 casos de carcinoma invasor de cérvice uterina (39 casos de carcinoma epidermóide e 11 casos adenocarcinoma), não identificaram a presença do DNA do HVS-2 integrado ao genoma humano em nenhum dos casos (Tran-Thanh, 2003). Este resultado foi concordante com o descrito por Yang e colaboradores, que também não identificaram a infecção por HSV-2 em nenhum caso, em um estudo que avaliou 27 casos de carcinoma invasor cervical, sendo 18 fixados em formalina e incluídos em parafina (Yang, 2004).

Em um estudo que avaliou a presença do DNA do HSV-2 em biópsias de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau e carcinoma epidermóide de cérvice uterina, Pérez e colaboradores identificaram a presença da infecção pelo HSV-2 em 26.5% dos 35 casos de carcinoma epidermóide de cérvice uterina (Pérez, 2006). Neste estudo, a associação da infecção com carcinoma epidermóide não foi estatisticamente significante (OR=2.01; 95% CI 0.7-5.3).

Devido a baixa prevalência de adenocarcinoma de cérvice em relação ao carcinoma epidermóide, os estudos citados previamente, em sua maioria, incluíram os dois tipos histológicos e analisaram a associação do HSV-2 com carcinoma invasor de cérvice no subgrupo de pacientes com adenocarcinoma (Meng, 1989; Lulitanond, 1994; Yamakama, 1994; Muñoz, 1995; Daling, 1996; Olsen 1998; Lehtinen, 2002; Smith, 2002a; Castle, 2003a; Tran-Thanh, 2003; Castellsagué, 2006). Destes, apenas quatro estudos utilizaram técnica de PCR para determinação da infecção por HSV-2 e incluíram casos de adenocarcinoma de cérvice uterina (Meng, 1989; Lulitanond, 1994; Yamakama, 1994; Tran-Thanh, 2003)

As inconsistências descritas pelos estudos citados podem estar relacionadas a variação da prevalência da infecção por HSV-2 entre as populações avaliadas, utilização de diferentes metodologias na condução dos estudos e, principalmente utilização de diferentes técnicas para o diagnóstico da infecção.

5.9.2 *Chlamydia trachomatis*

a. Técnicas de identificação da infecção

O diagnóstico da infecção por CT requer a utilização de técnicas complexas e com custo elevado, podendo ser realizado através de métodos que envolvem a cultura da bactéria ou métodos sem a cultura da CT (sorologia, detecção de antígenos e amplificação do DNA).

O método diagnóstico tradicional para a identificação da infecção por CT é o cultivo da bactéria, realizada através da inoculação de material coletado do trato genitourinário em meios de cultura específicos. A especificidade deste método se aproxima a 100% quando realizado por equipe experiente e permite a realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos (Mardh, 1977; CDC, 1993). Por apresentar desvantagens como custo elevado, técnica de realização complexa e necessidade de microorganismos viáveis, a cultura tem seu uso limitado a situações específicas, principalmente em medicina legal (Black, 1997; CDC, 2002).

O diagnóstico da infecção por CT através da avaliação do material cervical coletado pelo raspado cervical também pode ser realizado através de testes comerciais desenvolvidos específicamente para este fim (CDC, 2002). O uso das técnicas de enzimo-imunoensaio e de marcação com anticorpos fluorourecentes, permite a detecção de antígenos específicos para a CT nas células epiteliais presentes no material coletado para a citologia (Black, 1997). Estes métodos não necessitam a presença de microorganismos viáveis e tem a técnica de realização padronizada pelo fabricante, fatos que permitem seu uso em grande escala (Black, 1997). A principal desvantagem da técnica é o risco de falso-positivo, causado por reação cruzada com outros microorganismos, incluindo outras espécies de *Chlamydia* (CDC, 2002; Black, 1997).

Os testes sorológicos identificam a presença de anticorpos contra a CT no sangue, que pode significar tanto infecção ativa quanto passada (Black, 1997). Os

testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico de infecção por CT são as técnicas de fixação de complemento, enzimo-imunoensaio e microimunofluorescência. A fixação de complemento tem seu uso restrito por não ser específico para nenhuma espécie de CT (Black, 1997). As técnicas mais antigas de enzimo-imunoensaio, detectam anticorpos contra todas as espécies de *Chlamydia*, podendo ocorrer reação cruzada e dificultando a diferenciação entre as diferentes cepas desta bactéria e por conseqüência, limitando sua utilização (Black, 1997). O desenvolvimento de testes de enzimo-imunoensaio específicos para as diferentes espécies de CT contribuiu para a maior utilização desta técnica no diagnóstico da infecção por esta bactéria, principalmente por ser uma técnica de realização menos complexa e com menor custo (Bax, 2003).

O método sorológico considerado o padrão-ouro no diagnóstico da infecção por CT é a microimunofluorescência (Newhall, 1986). Esta técnica identifica a infecção pelas diferentes espécies de *Chlamydia* e diferencia entre infecção atual e passada, através da identificação de anticorpos IgG e IgM (Black, 1997), se caracteriza por ser uma técnica de difícil execução e com custo elevado, fatores que limitam sua utilização na rotina da maioria dos laboratórios (Bax, 2003).

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular através da amplificação do DNA representou um avanço para a detecção da infecção por CT. Estes métodos apresentam sensibilidade e especificidade elevadas quando comparado as outras técnicas diagnósticas (Gopalkrishna, 2000; Watson, 2002; Hadgu, 2005). Por não necessitar a presença de microorganismos viáveis, as técnicas de amplificação do DNA podem ser utilizadas em qualquer material biológico que contenha DNA (Black, 1997).

Uma das técnica de amplificação do DNA mais difundidas para o diagnóstico de infecção por CT é a reação de polimerase em cadeia (PCR), que pela utilização de seqüências iniciadoras específicas (*primers*) identifica a presença do DNA da CT no material analisado (Gopalkrishna, 2000), permitindo a identificação dos diferentes sub-tipos da bactéria (Anttila, 2001).

Assim como citado anteriormente, a técnica de PCR possibilita o estudo de tecido conservado em parafina, permitindo a realização de estudos de prevalência

retrospectivos (Iftner, 2003) e a associação da presença do DNA da CT com o diagnóstico de adenocarcinoma cervical e infecção pelo HPV.

b. Relação com carcinoma de cérvice uterina

A infecção por CT, uma bactéria com comportamento intracelular obrigatório, é a doença sexualmente transmissível mais freqüente entre homens e mulheres em todo o mundo, representando um problema de saúde pública. Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde, no ano de 1999 ocorreram 92 milhões novos casos de infecção por CT no mundo, sendo 9.5 milhões na América Latina e Caribe (www.who.int). No Brasil, o Ministério da Saúde estimou para 2003 1.5 milhões de casos de infecção por CT (www.portal.saude.gov.br).

Em cerca de 85-90% dos casos, a infecção por CT apresenta-se de forma assintomática tanto em homens como em mulheres (Stamm, 1999; Cecil, 2001). A ausência relativa de sintomas tem como principais conseqüências a manutenção da alta prevalência da infecção (Spiliopoulou, 2005) e persistência da doença por falta de tratamento adequado (Stamm, 1999).

Em mulheres, quando não tratada, a infecção por CT pode ocasionar diversas co-morbidades, como uretrite, cervicite, doença inflamatória pélvica, infertilidade, gestação ectópica e dor pélvica crônica (Westrom, 1992). O risco aumentado de desenvolvimento de neoplasia cervical invasora também foi associado a infecção por CT por alguns autores.

Os mecanismos pelos quais a infecção por CT atuaria na carcinogênese cervical não estão completamente esclarecidos. Estudos *in vitro* demonstram que a infecção por CT causa a inibição da apoptose (morte celular programada) das células do hospedeiro (Fan, 1998) e também pode ocasionar dano celular, favorecendo a transformação neoplásica do epitélio cervical, independente presença do HPV (Schlott, 2005).

Clinicamente, a cervicite crônica que ocorre em mulheres infectadas pela CT ocasiona a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células da cérvice uterina (Markowska, 1999), com conseqüente inflamação e dano do epitélio cervical, formação de atipias celulares e indução da metaplasia escamosa na cérvice uterina (Kiviat, 1985). A infecção pela CT também pode facilitar a persistência da infecção

pelo HPV (Silins, 2005; Samoff, 2005), que é o principal fator de risco identificado na carcinogênese cervical (Walboomers, 1999).

Diversos autores estudaram a associação da infecção por CT e o desenvolvimento de neoplasia invasora de cérvice uterina. Entretanto, a comparação entre os resultados encontrados é complexa, principalmente pelas diferenças metodológicas e entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico da infecção por CT, que como foi citado anteriormente, pode ser realizado através de cultura, sorologia, detecção direta de antígenos e amplificação do DNA.

Os estudos que avaliaram a associação da infecção por CT com carcinoma invasor de cérvice uterina apresentam divergências entre seus resultados. Aqueles que utilizaram técnica de imunofluorecência direta, não demonstraram associação da infecção com maior risco de neoplasia intraepitelial cervical (Nunez-Troconis, 1995; Takac, 1998; Takac, 1999), entretanto os estudos que utilizaram técnicas sorológicas para avaliação desta associação demonstraram a existência de risco aumentado para carcinoma invasor de cérvice uterina em casos com infecção por CT (Koskela, 2000; Antilla, 2001; Reesink-Peters, 2001; Hinkula, 2004; Matsumoto, 2003; Smith, 2004).

Reesink-Peters e colaboradores, em um estudo transversal que avaliou a presença de anticorpos contra a CT através de técnica de enzimo-imunoensaio, não demonstraram associação da infecção com a severidade de lesões neoplásicas de cérvice uterina (Reesink-Peters, 2001), entretanto este mesmo estudo demonstrou que a presença de anticorpos anti-clamídia foi maior no grupo de pacientes com carcinoma micro-invasor de cérvice uterina que no grupo com lesões pré-neoplásicas, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p<0.001$). Hinkula e colaboradores utilizando a mesma técnica descreveram em um estudos de casos-controle, uma associação positiva entre a presença de anticorpos contra CT e risco aumentado de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau e carcinoma invasor de cérvice uterina (carcinoma epidermóide e adenocarcinoma), que permaneceu após ajuste pela presença de infecção pelo HPV (Hinkula, 2004). Matsumoto e colaboradores em um estudo de casos-controle descreveram que a infecção por CT, avaliada por enzimo-imunoensaio é um co-fator ao HPV no desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical (Matsumoto, 2003).

Por ser a técnica sorológica mais sensível, a microimunofluorescência foi amplamente utilizada nos estudos que avaliaram a infecção pela CT como co-fator ao HPV na carcinogênese cervical a partir de 1982, quando Schachter e colaboradores observaram em um estudo de casos-controle, a presença de anticorpos contra a CT em 75.7% dos casos de neoplasia cervical e em 60.8% nos controles (P<0.0001). Neste estudo, a infecção pelo HPV não foi avaliada (Schachter, 1982).

Um estudo soro-epidemiológico prospectivo de casos-controle realizado na Escandinávia, que incluiu 182 casos de carcinoma invasor de cérvice uterina (149 casos de carcinoma epidermóide e 32 casos de adenocarcinoma) e avaliou a presença de anticorpos contra CT através de técnica de microimunofluorescência, descreveu que a infecção por esta bactéria se associa a um maior risco de carcinoma epidermóide (OR=2.2; 95% CI=1.3-3.5), mas não de adenocarcinoma cervical (OR=0.4; 95% CI=0.1-1.7) em casos com infecção pelo HPV (Koskella, 2000). Outro estudo realizado por este mesmo grupo, incluindo somente casos de carcinoma epidermóide, demonstrou que a infecção pela CT se associa a um aumento de 2.5 vezes o risco de carcinoma invasor cervical após ajuste para anticorpos séricos para HPV 16, 18 e 33 (Antilla, 2001).

Um estudo multicêntrico de casos-controle avaliou a presença de anticorpos contra a CT através de microimunofluorescência (Smith, 2004). Este estudo, que incluiu 1.238 casos de carcinoma invasor de cérvice uterina em sete países demonstrou, risco aumentado de carcinoma epidermóide de cérvice uterina em mulheres com presença de anticorpos contra a CT (OR=1.8; 95% IC=1.2-2.7). Este estudo, também não demonstrou esta associação nos casos de adenocarcinoma cervical (OR=1.0; 95%CI=0.53-1.9)(Smith, 2004).

Recentemente, a análise agrupada dos estudos multicêntricos de casos-controle, conduzidos pela IARC e incluiu 167 casos de adenocarcinoma de cérvice uterina, também não demonstrou associação entre a presença de anticorpos contra a CT, avaliada por microimunofluorescência e maior risco de adenocarcinoma invasor de cérvice uterina em casos com infecção pelo HPV (Castellsagué, 2006), em concordância com o descrito pelos outros autores (Koskella 2000; Smith, 2004).

Por apresentarem sensibilidade e especificidade elevadas quando comparado as outras técnicas e permitirem a avaliação de qualquer matéria biológico que

contenha DNA, os métodos de diagnóstico molecular também são utilizados para o diagnóstico de infecção por CT (Gopalkrishna, 2000; Markowska, 2001; Watson, 2002). A reação de polimerase em cadeia (PCR) permite a identificação do DNA da CT em material biológico fresco, congelado ou fixado em formalina e conservado em parafina (Gopalkrishna, 2000; Finan, 2002; Tamim, 2002; Golijow, 2005). Por estas razões, a técnica de PCR também foi utilizada em estudos que avaliaram a importância desta infecção como co-fator ao HPV no desenvolvimento da neoplasia cervical (Gopalkrishna, 2000; Antilla, 2001; Wallin, 2002; Golijow, 2005).

Em uma série de casos que incluiu mulheres assintomáticas, com neoplasia intraepitelial cervical e carcinoma invasor de cérvice uterina, Gopalkrishna e colaboradores descreveram a presença do DNA da CT em 3%, 12% e 22% dos casos, respectivamente (Gopalkrishna, 2000). Neste estudo observou-se uma maior taxa de infecção por CT nos casos de câncer invasor em comparação aos casos de neoplasia intraepitelial cervical e casos assintomáticos, indicando talvez a importância da CT como co-fator ao HPV na carcinogênese cervical. Em outra série, o DNA da CT foi encontrado em 5% (4/79) dos casos de carcinoma epidermóide de cérvice uterina conservados em parafina casos incluídos na análise (Antilla, 2001).

Em um estudo recente, que incluiu 279 casos com citologia normal, lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau e carcinoma epidermóide de cérvice uterina, Golijow e colaboradores demonstraram que a prevalência de infecção por CT é menor em casos com citologia normal (11.4%) em comparação aos casos de lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau (41.8% e 46.7%, respectivamente), demonstrando a associação entre a presença do DNA da CT e risco aumentado de lesões precursoras (Golijow, 2005). Este mesmo estudo, identificou o DNA da CT em 20% (7/35) dos casos de carcinoma epidermóide invasor. Porém, a prevalência desta infecção não foi significativamente maior que a encontrada nos casos com citologia normal (P=0.22), não caracterizando nesta série, a infecção como co-fator ao HPV na carcinogênese cervical.

Em um estudo prospectivo de base populacional, Wallin e colaboradores, avaliaram a presença do DNA da CT em casos de carcinoma de cérvice uterina desenvolvidos por mulheres participantes de um programa nacional de prevenção (Wallin, 2002). Neste estudo, o DNA da CT foi identificado em 3 dos 118 casos de

carcinoma cervical invasor (93 casos de carcinoma epidermóide e 25 casos de adenocarcinoma) incluídos na análise. Embora a identificação da CT por PCR em casos com infecção por HPV tenha se associado a um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma invasor cervical, os autores não descreveram a associação específica para cada tipo histológico (Wallin, 2002).

Estes estudos apresentaram resultados diferentes, porém as séries incluíram casos de neoplasia intraepitelial cervical, carcinoma epidermóide e adenocarcinoma cervical e não foram conduzidos com a mesma metodologia, utilizando para análise por PCR tecido congelado (Gopalkrishna, 2000), urina (Tamim, 2002) e tecido conservado em parafina (Antilla, 2001; Wallin, 2002; Golijow, 2005).

Embora diversos autores tenham avaliado o impacto da infecção por HSV-2 e CT na carcinogênese cervical ocasionada pelo HPV, os estudos não foram conclusivos quanto a existência de uma associação entre estas DST e adenocarcinoma de cérvice uterina. A avaliação por PCR quanto a presença do DNA do HSV-2 e da CT em casos de adenocarcinoma de cérvice uterina, com e sem infecção pelo HPV e provenientes de uma mesma população, poderá auxiliar na determinação da importância destes agentes na carcinogênese do adenocarcinoma cervical.

Objetivos

Objetivo Primário:

- Determinar a prevalência das infecções por Herpes Vírus Tipo 2 e *Chlamydia trachomatis*, identificadas por técnica de PCR em casos de adenocarcinoma de cérvice uterina.

Objetivo Secundário:

- Determinar a existência de associação entre as infecções por Herpes Vírus Tipo 2 e *Chlamydia trachomatis* e adenocarcinoma de cérvice uterina em casos com e sem infecção pelo Papiloma Vírus Humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altekruse SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barnes WA Jr, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States.Am J Obstet Gynecol. 2003 Mar;188(3):657-63.

Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 6;92(12):5258-65.

Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. Eur J Cancer. 2001 Jan;37(2):246-50.

Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA. 2001 Jan 3;285(1):47-51.

Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. Salud Publica Mex. 2003;45 Suppl 3:S306-14.

Ashley RL. Sorting out the new HSV type specific antibody tests. Sex Transm Infect. 2001 Aug;77(4):232-7.

Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegnee AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Br J Cancer. 1996 Aug;74(3):488-90.

Bax CJ, Mutsaers JA, Jansen CL, Trimbos JB, Dorr PJ, Oostvogel PM. Comparison of serological assays for detection of Chlamydia trachomatis antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan;10(1):174-6.

Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Green J. Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. Br J Cancer. 2004 May 4;90(9):1787-91.

Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. Clin Microbiol Rev. 1997 Jan;10(1):160-84.

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

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

Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. Ann Oncol. 2005 Mar;16(3):489-511.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, 2006. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância - Conprev. Atlas de Mortalidade por Câncer no Brasil 1979-1999. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2002.

Bray F, Carstensen B, Moller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G, Hakama M, Weiderpass E. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005a Sep;14(9):2191-9.

Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Moller H, Hakama M, Parkin DM. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005b Mar;14(3):677-86.

Bulk S, Berkhof J, Bulkmans NW, Zielinski GD, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. Br J Cancer. 2006 Jan 16;94(1):171-5.

Bulk S, Visser O, Rozendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Cervical cancer in the Netherlands 1989-1998: Decrease of squamo

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

Castle PE, Escoffery C, Schachter J, Rattray C, Schiffman M, Moncada J, Sugai K, Brown C, Cranston B, Hanchard B, Palefsky JM, Burk RD, Hutchinson ML, Strickler HD. Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotrophic virus type 1 are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. Sex Transm Dis. 2003a Jul;30(7):575-80.

Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients: assessing their roles as human papillomavirus cofactors. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003b;(31):29-34.

Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Burk RD, Rodriguez AC, Alfaro M, Hutchinson ML, Morales J, Schiffman M. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Oct;10(10):1021-7.

Carvalho MO, Carestiato FN, Perdigao PH, Xavier MP, Silva K, Botelho MO, Oliveira LH, Cavalcanti SM. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. Braz J Infect Dis. 2005 Oct;9(5):398-404.

Cates W Jr, Dallabetta G. The staying power of sexually transmitted diseases. Lancet. 1999 Dec;354 Suppl:SIV62.

Cavalcanti SM, Zardo LG, Passos MR, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. J Infect. 2000 Jan;40(1):80-7.

Cecil JA, Howell MR, Tawes JJ, Gaydos JC, McKee KT Jr, Quinn TC, Gaydos CA. Features of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infection in male Army recruits. J Infect Dis. 2001 Nov 1;184(9):1216-9.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the prevention and management of Chlamydia trachomatis infections, 1993. MMWR 1993.

Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria Gonorrhoeae infections, 2002. MMWR 2002.

Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. Lancet Oncol. 2002 Mar;3(3):166-74.

Chen YJ, Wang LS, Wang PH, Lai CR, Yen MS, Ng HT, Yuan CC. High cyclooxygenase-2 expression in cervical adenocarcinomas. Gynecol Oncol. 2003 Mar;88(3):379-85.

Chin-Hong PV, Palefsky JM. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 2002 Nov 1;35(9):1127-34.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjose S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. Lancet. 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.

Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. Br J Cancer. 2003a Jul 7;89(1):101-5.

Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Cancer. 2003b Jan 13;88(1):63-73.

Corey L, Adams HG, Brown ZA, Holmes KK. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. Ann Intern Med. 1983 Jun;98(6):958-72.

Cowan FM, French RS, Mayaud P, Gopal R, Robinson NJ, de Oliveira SA, Faillace T, Uuskula A, Nygard-Kibur M, Ramalingam S, Sridharan G, El Aouad R, Alami K, Rbai M, Sunil-Chandra NP, Brown DW. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. Sex Transm Infect. 2003 Aug;79(4):286-90.

Crum, CP. The Female Genital Tract. In: Cotram R, Cumar V, Collins T. Robbins Pathological Basis of Diseases. Sixth Edition. Philadelphia. WB Saunders, 1999. pp1035-1091.

Daling JR, Madeleine MM, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Ashley R, Schwartz SM, Beckmann AM, Hagensee ME, Mandelson MT, Galloway DA. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Jul;5(7):541-8.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Lancet. 2005 Nov 19;366(9499):1784-93.

de Lima Soares V, de Mesquita AM, Cavalcante FG, Silva ZP, Hora V, Diedrich T, de Carvalho Silva P, de Melo PG, Dacal AR, de Carvalho EM, Feldmeier H.Sexually

transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. Trop Med Int Health. 2003 Jul;8(7):595-603.

de Sanjosé S, Muñoz N, Bosch FX, Reimann K, Pedersen NS, Orfila J, Ascunce N, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, et al. Sexually transmitted agents and cervical neoplasia in Colombia and Spain. Int J Cancer. 1994 Feb 1;56(3):358-63.

de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. Int J Cancer. 2003 Mar 1;103(6):705-8.

Di Paolo JA, Woodworth CD, Coutlee F, Zimonic DB, Bryant J, Kessous A. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. Int J Cancer. 1998 Jun 10;76(6):865-71.

Eifel PJ, Berek JS, Markman MA. Gynecologic Cancers. Cancer of the Cervix, Vagina and Vulva. In: de Vita V, Hellman S, Rosenberg S. Cancer Principles and Practice of Oncology. Seventh Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2005.

Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. Br J Cancer. 1994 Jan;69(1):114-9.

Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. J Exp Med. 1998 Feb 16;187(4):487-96.

Finan RR, Tamim H, Almawi WY. Identification of Chlamydia trachomatis DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. Arch Gynecol Obstet. 2002 Jul;266(3):168-71.

Ford LC, Berek JS, Lagasse LD, Hacker NF, Heins YL, DeLange RJ. Estrogen and progesterone receptor sites in malignancies of the uterine cervix, vagina, and vulva. Gynecol Oncol. 1983 Feb;15(1):27-31.

Frisch M, Fenger C, van den Brule AJ, Sorensen P, Meijer CJ, Walboomers JM, Adami HO, Melbye M, Glimelius B. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. Cancer Res. 1999 Feb 1;59(3):753-7.

Garcia-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, Gonzalez CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. Int J Cancer. 2005 Nov 20;117(4):629-37.

Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harri R, Baldwi S, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Inserra P. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). Cancer Causes Control. 2002 Nov;13(9):839-46.

Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. Gynecol Oncol. 2005 Jan;96(1):181-6.

Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Koranne RV, Mohan VP, Mittal A, Das BC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. Clin Microbiol Infect. 2000 Feb;6(2):88-93.

Hadgu A, Dendukuri N, Hilden J. Evaluation of nucleic acid amplification tests in the absence of a perfect gold-standard test: a review of the statistical and epidemiologic issues. Epidemiology. 2005 Sep;16(5):604-12.

Hakama M, Luostarinen T, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Lehtinen M, Thoresen S, Youngman L, Hakulinen T. Joint effect of HPV16 with Chlamydia trachomatis and smoking on risk of cervical cancer: antagonism or misclassification (Nordic countries). Cancer Causes Control. 2000 Oct;11(9):783-90.

Han CP, Tsao YP, Sun CA, Ng HT, Chen SL. Human papillomavirus, cytomegalovirus and herpes simplex virus infections for cervical cancer in Taiwan. Cancer Lett. 1997 Dec 9;120(2):217-21.

Hara Y, Kimoto T, Okuno Y, Minekawa Y. Effect of herpes simplex virus on the DNA of human papillomavirus 18. J Med Virol. 1997 Sep;53(1):4-12.

Harris TG, Kulasingam SL, Kiviat NB, Mao C, Agoff SN, Feng Q, Koutsky LA. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. Am J Epidemiol. 2004 May 1;159(9):834-42.

Haverkos HW, Soon G, Steckley SL, Pickworth W. Cigarette smoking and cervical cancer: Part I: a meta-analysis. Biomed Pharmacother. 2003 Mar;57(2):67-77.

Hawes SE, Critchlow CW, Sow PS, Toure P, N'Doye I, Diop A, Kuypers JM, Kasse AA, Kiviat NB. Incident high-grade squamous intraepithelial lesions in Senegalese women with and without human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2. J Natl Cancer Inst. 2006 Jan 18;98(2):100-9.

Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Kamemoto L, Goodman MT. Diet and

Hildesheim A, Wang SS, Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. Virus Res. 2002 Nov;89(2):229-40.

Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J, Lehtinen M, Kauppila A. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. Br J Cancer. 2004 Mar 8;90(5):1025-9.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998 Feb 12;338(7):423-8.

Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):80-8.

International Agency for Research on Cancer: IARC Handbooks of Cancer Prevention Vol 10. Cervix Cancer Screening. Lyon: IARC Press; 2004.

International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Vol 90. Human pappilomaviruses. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2005.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (IARC). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. Int J Cancer. 2006 Mar 15;118(6):1481-95.

Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. Cancer. 1996 Jun 1;77(11):2275-9.

Kalakun L, Bozzetti MC. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Cad Saude Publica. 2005 Jan-Feb;21(1):299-309.

Kiviat NB, Paavonen JA, Brockway J, Critchlow CW, Brunham RC, Stevens CE, Stamm WE, Kuo CC, DeRouen T, Holmes KK. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. I. Epithelial and inflammatory cellular changes. JAMA. 1985 Feb 15;253(7):989-96.

Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Feb;10(2):101-6.

Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. BMJ. 2002 Sep 14;325(7364):572.

Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Tsatsanis C, Spandidos DA. Association of herpesvirus infection with the development of genital cancer. Int J Cancer. 1995 Sep 27;63(1):58-62.

Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E, Saikku P, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. Int J Cancer. 2000 Jan 1;85(1):35-9.

Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. Clin Cancer Res. 2001 Feb;7(2):429-34.

Lacey JV Jr, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Silverberg SG, Hildesheim A. Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999 Dec;8(12):1079-85.

Lacey JV Jr, Brinton LA, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. Use of hormone replacement therapy and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Gynecol Oncol. 2000 Apr;77(1):149-54.

Lacey JV Jr, Frisch M, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Zaino RJ, Hildesheim A. Associations between smoking and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix (United States). Cancer Causes Control. 2001 Feb;12(2):153-61.

Lacey JV Jr, Swanson CA, Brinton LA, Altekruse SF, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Cancer. 2003 Aug 15;98(4):814-21.

Lafferty WE, Downey L, Celum C, Wald A. Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. J Infect Dis. 2000 Apr;181(4):1454-7.

Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloigu A, Anttila T, Hallmans G, Luukkaala T, Thoresen S, Youngman L, Dillner J, Hakama M. Herpes simplex virus and risk of

cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. Am J Epidemiol. 2002 Oct 15;156(8):687-92.

Lulitanond V, Chantratita W, Thammaprasert K, Nimmanahaeminda K, Matangkasombut P, Yoosook C. Detection of herpes simplex virus type 2 Bgl II N fragment in paraffin-embedded cervical tissue sections using nested polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1994 Dec;8(6):441-7.

Madeleine MM, Daling JR, Schwartz SM, Shera K, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Critchlow CW, McDougall JK, Porter P, Galloway DA. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Mar;10(3):171-7.

Madhavan HN, Priya K, Bagyalakshmi R. Phenotypic and genotypic methods for the detection of herpes simplex virus serotypes. J Virol Methods. 2003 Mar;108(1):97-102.

Malkin JE. Epidemiology of genital herpes simplex virus infection in developed countries. Herpes. 2004 Apr;11 Suppl 1:2A-23A.

Mardh PA, Ripa T, Svensson L, Westrom L. Chlamydia trachomatis infection in patients with acute salpingitis. N Engl J Med. 1977 Jun 16;296(24):1377-9.

Markowska J, Fischer N, Fischer Z, Warchol JB. Chlamydia trachomatis infection in women with CIN and invasive uterine cervix cancer. Significance of hormonal status. Eur J Gynaecol Oncol. 2002;23(6):511-3.

Markowska J, Fischer N, Filas V, Fischer Z, Breborowicz J, Markowski M. The role of Chlamydia trachomatis infection in cervical cancer development. Eur J Gynaecol Oncol. 1999;20(2):144-6.

Marshall DS, Linfert DR, Draghi A, McCarter YS, Tsongalis GJ. Identification of herpes simplex virus genital infection: comparison of a multiplex PCR assay and traditional viral isolation techniques. Mod Pathol. 2001 Mar;14(3):152-6.

Martins TB, Woolstenhulme RD, Jaskowski TD, Hill HR, Litwin CM. Comparison of four enzyme immunoassays with a western blot assay for the determination of type-specific antibodies to herpes simplex virus. Am J Clin Pathol. 2001 Feb;115(2):272-7.

Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, Hoshiai H, Taketani Y, Kawana T, Yoshikawa H. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Different results after adjustment for HPV DNA and antibodies. Br J Cancer. 2003 Sep 1;89(5):831-3.

McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM; ALTS Group. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 May;14(5):1165-70.

Meng XJ, Sun Y, Chen MH, Liu ZH, Zhang YX, Li XZ, Li K, Han RC, Si JY, Hu LY. Viral etiology of cervical carcinoma. Human papilloma virus and herpes simplex virus type 2. Chin Med J (Engl). 1989 Feb;102(2):94-9.

Mitchell H, Hocking J, Saville M. Improvement in protection against adenocarcinoma of the cervix resulting from participation in cervical screening. Cancer. 2003 Dec 25;99(6):336-41.

Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS.The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. Int J Gynecol Cancer. 2003 Mar-Apr;13(2):103-10.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical

Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):518-27.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002 Mar 30;359(9312):1093-101.

Muñoz N, Kato I, Bosch FX, De Sanjosé S, Sundquist VA, Izarzugaza I, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, Viladiu P, et al. Cervical cancer and herpes simplex virus type 2: case-control studies in Spain and Colombia, with special reference to immunoglobulin-G sub-classes. Int J Cancer. 1995 Feb 8;60(4):438-42.

Newhall WJ 5th, Terho P, Wilde CE 3rd, Batteiger BE, Jones RB. Serovar determination of Chlamydia trachomatis isolates by using type-specific monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1986 Feb;23(2):333-8.

Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. Rev Saude Publica. 2002 Feb;36(1):95-100.

Nunez-Troconis JT. Cervical intraepithelial neoplasia: Chlamydia trachomatis and other co-factors. Invest Clin. 1995 Sep;36(3):101-16.

O'Byrne KJ, Dalgleish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. Br J Cancer. 2001 Aug 17;85(4):473-83.

Olsen AO, Orstavik I, Dillner J, Vestergaard BF, Magnus P. Herpes simplex virus and human papillomavirus in a population-based case-control study of cervical intraepithelial neoplasia grade II-III. APMIS. 1998 Mar;106(3):417-24.

Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):41-6.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editors. Cancer incidence in five continents. Lyon (France): IARC; 2002. (Scientific Publication; nº 155).

Pérez LO, Barbisan G, Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. Herpes simplex virus and human papillomavirus infection in cervical disease in Argentine women. Int J Gynecol Pathol. 2006 Jan;25(1):42-7.

Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, Richart RM, Isacson C. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. Am J Pathol. 2000 Oct;157(4):1055-62.

Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, de Sanjosé S, Muñoz N; IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study. Cancer Causes Control. 2003 Nov;14(9):805-14.

Powers HJ. Interaction among folate, riboflavin, genotype, and cancer, with reference to colorectal and cervical cancer. J Nutr. 2005 Dec;135(12 Suppl):2960S-2966S.

Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, Van Der Zee AG, Quint WG, Burger MP, Adriaanse AH. No association of anti-Chlamydia trachomatis antibodies and severity of cervical neoplasia. Sex Transm Infect. 2001 Apr;77(2):101-2.

Regan JW, Hamonic MJ. Dysplasia of the uterine cervix. Ann NY Acad Sci. 1956 63:662-682.

Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. Am J Obstet Gynecol. 1969 Oct 1;105(3):386-93.

Roberts C. Genital herpes in young adults: changing sexual behaviours, epidemiology and management. Herpes. 2005 Jun;12(1):10-4.

Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, Papp JR, Black CM, Unger ER. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. Am J Epidemiol. 2005 Oct 1;162(7):668-75.

Schachter J, Hill EC, King EB, Heilbron DC, Ray RM, Margolis AJ, Greenwood SA. Chlamydia trachomatis and cervical neoplasia. JAMA. 1982 Nov 5;248(17):2134-8.

Schachter J, Hill EC, King EB, Coleman VR, Jones P, Meyer KF. Chlamydial infection in women with cervical dysplasia. Am J Obstet Gynecol. 1975 Dec 1;123(7):753-7.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst. 1993 Jun 16;85(12):958-64.

Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):14-9.

Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst. 2003 Sep 3;95(17):1336-43.

Schlott T, Eiffert H, Bohne W, Landgrebe J, Brunner E, Spielbauer B, Knight B. Chlamydia trachomatis modulates expression of tumor suppressor gene caveolin-1

and oncogene C-myc in the transformation zone of non-neoplastic cervical tissue. Gynecol Oncol. 2005 Sep;98(3):409-19.

Schmauz R, Okong P, de Villiers EM, Dennin R, Brade L, Lwanga SK, Owor R. Multiple infections in cases of cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. Int J Cancer. 1989 May 15;43(5):805-9.

Scoular A. Using the evidence base on genital herpes: optimising the use of diagnostic tests and information provision. Sex Transm Infect. 2002 Jun;78(3):160-5.

Sethi S, Muller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L, Wahrendorf J, Gissmann L, Chang-Claude J. Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. Am J Obstet Gynecol. 1998 Feb;178(2):360-4.

Sherman ME, Wang SS, Carreon J, Devesa SS. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. Relation to incidence and survival. Cancer. 2005 Mar 15;103(6):1258-64.

Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS, Weinstein SJ, Ziegler RG, Studentsov YY, McAdams M, Schiffman M. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004a Oct;13(10):1574-82.

Shields TS, Falk RT, Herrero R, Schiffman M, Weiss NS, Bratti C, Rodriguez AC, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A. A case-control study of endogenous hormones and cervical cancer. Br J Cancer. 2004b Jan 12;90(1):146-52.

Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hansson BG, Wang X, Arnheim L, Dahl V, Bremell D, Persson K, Dillner J, Rylander E. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. Int J Cancer. 2005 Aug 10;116(1):110-5.

Slomka MJ. Current diagnostic techniques in genital herpes: their role in controlling the epidemic. Clin Lab. 2000;46(11-12):591-607.

Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States--a 24-year population-based study. Gynecol Oncol. 2000 Aug;78(2):97-105.

Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van Den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW; IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. Int J Cancer. 2004 Sep 1;111(3):431-9.

Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, Beral V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. Lancet. 2003 Apr 5;361(9364):1159-67.

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsagué X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. J Natl Cancer Inst. 2002a Nov 6;94(21):1604-13.

Smith JS, Herrero R, Muñoz N, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Bosch FX, Ashley RL. Prevalence and risk factors for herpes simplex virus type 2 infection among middle-age women in Brazil and the Philippines. Sex Transm Dis. 2001 Apr;28(4):187-94.

Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, Bosch FX, Walboomers JM, Peeling RW. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. J Infect Dis. 2002b Feb 1;185(3):324-31

Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. J Infect Dis. 2002c Oct 15;186 Suppl 1:S3-28.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002 Apr 24;287(16):2114-9.

Spiliopoulou A, Lakiotis V, Vittoraki A, Zavou D, Mauri D. Chlamydia trachomatis: time for screening? Clin Microbiol Infect. 2005 Sep;11(9):687-9.

Stamm WE. Chlamydia trachomatis infections of the adult. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF e colaboradores. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGraw Hill, 1999:407-22.

Takac I, Gorisek B. Chlamydia trachomatis infection in women with and without cervical intraepithelial neoplasia. Int J STD AIDS. 1999 May;10(5):331-3.

Takac I, Gorisek B. The frequency of Chlamydia trachomatis infection in women with intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. Eur J Gynaecol Oncol. 1998;19(5):492-4.

Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Aug;43(4):277-81.

Tay SK, Tay KJ. Passive cigarette smoking is a risk factor in cervical neoplasia. Gynecol Oncol. 2004 Apr;93(1):116-20.

The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. JAMA. 1989 Aug 18;262(7):931-4.

Tran-Thanh D, Provencher D, Koushik A, Duarte-Franco E, Kessous A, Drouin P, Wheeler CM, Dubuc-Lissoir J, Gauthier P, Allaire G, Vauclair R, Dipaolo JA, Gravitt P, Franco E, Coutlee F. Herpes simplex virus type II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. Am J Obstet Gynecol. 2003 Jan;188(1):129-34.

Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Diener-West M, Comstock GW, Alberg AJ. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. Obstet Gynecol. 2005 Jan;105(1):174-81.

Ursin G, Peters RK, Henderson BE, d'Ablaing G 3rd, Monroe KR, Pike MC. Oral contraceptive use and adenocarcinoma of cervix. Lancet. 1994 Nov 19;344(8934):1390-4.

Ursin G, Pike MC, Preston-Martin S, d'Ablaing G 3rd, Peters RK. Sexual, reproductive, and other risk factors for adenocarcinoma of the cervix: results from a population-based case-control study (California, United States). Cancer Causes Control. 1996 May;7(3):391-401.

U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 2002 Incidence and Mortality. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute; 2005.

Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. Int J Cancer. 1998 Feb 9;75(4):536-45.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. N Engl J Med. 1999 Nov 25;341(22):1633-8.

Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T, Anttila T, Bergman F, Hallmans G, Ikaheimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl U, Paavonen J, Dillner J. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. Int J Cancer. 2002 Oct 1;101(4):371-4.

Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):35-40.

Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, Lacey JV Jr, Devesa S.Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. Cancer. 2004 Mar 1;100(5):1035-44.

Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, Pederson BS. The accuracy and efficacy of screening tests for Chlamydia trachomatis: a systematic review. J Med Microbiol. 2002 Dec;51(12):1021-31.

Weber W, De Sabata MS, Paredes RM, Rodriguez G, Santos C, Sabillon JU, Zwahlen M. Cancer in first degree relatives of Latin American women with cervical cancer. A pilot study. Anticancer Res. 2005 Mar-Apr;25(2B):1219-23.

Weiss H. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world. Herpes. 2004 Apr;11 Suppl 1:24A-35A.

Wells M, Ostor AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M, Nesland JM, Goodman AK, Sankaranarayanan R, Hanselaar AG, Albores-Saavedra J. Tumours of the Uterine Cervix. Epitelial Tumours. In: Tavassoli FA, Devillee P. World Health

Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon, 2003.

Westrom L, Joesoef R, Reynolds G, Hagdu A, Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and fertility. A cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. Sex Transm Dis. 1992 Jul-Aug;19(4):185-92.

Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyren O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adam HO. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). Cancer Causes Control. 2001 Jan;12(1):13-21.

Wright TC, Ferenczy A and Kurman RJ. Carcinoma and Other Tumors of the Cervix. In: Kurman RJ. Blaustein's pathology of the female genital tract. Fifth Edition. New York. Springer-Verlag New York, Inc. 2002a. p325-381.

Wright TC, Kurman RJ and Ferenczy A. Precancerous Lesions of the Cervix. In: Kurman RJ. Blaustein's pathology of the female genital tract. Fifth Edition. New York. Springer-Verlag New York, Inc. 2002b. p253-324.

www.portal.saude.gov.br

www.who.int

Yamakawa Y, Forslund O, Chua KL, Dillner L, Boon ME, Hansson BG. Detection of the BC 24 transforming fragment of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA in cervical carcinoma tissue by polymerase chain reaction (PCR). APMIS. 1994 Jun;102(6):401-6.

Yang YY, Koh LW, Tsai JH, Tsai CH, Wong EF, Lin SJ, Yang CC. Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2004 Oct;37(5):282-7.

Young RH, Clement PB. Endocervical adenocarcinoma and its variants: their morphology and differential diagnosis. Histopathology. 2002 Sep;41(3):185-207.

Zaino RJ. Symposium part I: adenocarcinoma in situ, glandular dysplasia, and early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol. 2002 Oct;21(4):314-26.

Zelmanowicz A, Hildeshein A. Family history of cancer as a risk factor for cervical carcinoma: a review of the literature. Papillomavirus Report 2004;15:113-20.

Zelmanowicz A, Schiffman M, Herrero R, Goldstein AM, Sherman ME, Burk RD, Gravitt P, Viscidi R, Schwartz P, Barnes W, Mortel R, Silverberg SG, Buckland J, Hildesheim A. Family history as a co-factor for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix: results from two studies conducted in Costa Rica and the United States. Int J Cancer. 2005 Sep 10;116(4):599-605.

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Daalmeijer NF, Risse EK, Voorhorst FJ, Jiwa NM, van der Linden HC, de Schipper FA, Runsink AP, Meijer CJ. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. J Pathol. 2003 Dec;201(4):535-43.

Associação das Infecções por Vírus Herpes Simples do Tipo 2 e *Chlamydia Trachomatis* e Adenocarcinoma de Colo de Útero

Zereu M*; Zettler CG; Cambruzzi E**; Zelmanowicz A***.**

***Núcleo de Novos Tratamentos em Câncer; Santa Casa de Porto Alegre**

****Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre**

*****Centro de Prevenção; Centro de Câncer; Santa Casa de Porto Alegre**

Introdução: O adenocarcinoma da cervice uterina (AC) ocorre em 15-20% das neoplasisas cervicais primárias. Embora a relação do carcinoma invasor de cervice uterine (CC) com a infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) esteja estabelecida, diferente do que ocorre com o carcinoma epidermóide cervical (CE), pouco se conhece sobre a importância de co-fatores no desenvolvimento do AC. Objetivos: Determinar a prevalência da infecção por Herpes Simples Virus Tipo 2 (HSV-2) e *Chlamydia Trachomatis* (CT) em casos de AC e sua associação com a infecção pelo HPV. Material e métodos: 206 casos de adenocarcinoma de cérvice uterina conservados em parafina foram selecionados. As amostras foram desparafinizadas e o DNA foi extraído. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através da identificação do gene da β-globina humana e 67 foram consideradas adequadas para análise. A reação de PCR foi utilizada para identificação da presença do DNA do HSV-2 e da CT. A presença do DNA do HSV-2 foi avaliada pela utilização de *primers* que amplificam um segmento de 391 pares de bases conforme descrito por Madhavan e cols. (2003); e a presença da CT foi avaliada pela utilização de *primers* que amplificam um segmento de 281 pares de bases da membrana protéica maior da *Chlamydia trachomatis* (MOMP) conforme descrito por Bobo e cols. (1990) e realização de um teste confirmatório com *primers* que amplificam um segmento de 603 pares de bases do gene omp2 da

ocorrendo em 15-20% dos casos (Smith, 2000; Cambruzzi, 2005a). A despeito dos programas de diagnóstico precoce a incidência de AC está aumentando em relação ao carcinoma epidermóide cervical (Vizcaino, 1998; Smith, 2000; Wang, 2004; Bray, 2005; Bulk, 2005).

A infecção persistente por tipos oncogênicos de HPV está estabelecida como causa de carcinoma epidermóide e adenocarcinoma de cérvice uterina (Walboomers, 1999; Castellsagué, 2006). Enquanto o HPV 18 é principalmente um fator de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma, o HPV 16 está associado com os dois tipos histológicos (Bulk, 2006; Castellsagué, 2006). Estudos mostram que a infecção pelo HPV é, na maioria das vezes transitória não sendo associada a alterações citológicas detectáveis (Ho, 1998). A razão para as variações na história natural da infecção não está estabelecida mas acredita-se que outros fatores, ou co-fatores sejam importantes no desenvolvimento de neoplasia invasora de cérvice uterina em mulheres com infecção pelo HPV. Embora alguns co-fatores estejam associados ao risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide de cérvice (Moreno, 2002; Munoz, 2002; Smith, 2002c; Smith, 2004; IARC, 2006), o impacto na progressão de infecção pelo HPV para adenocarcinoma de cérvice uterina ainda não está estabelecido.

Desde 1989 quando Schmauz e cols. demonstraram que a infecção por múltiplas doenças sexualmente transmissíveis (DST) seria um fator de risco para CC (Schmauz, 1989), sugerindo que DST adicionais ao HPV poderiam agir como co-fatores, esta associação vem sendo estudada. As infecções por Herpes Simples Vírus-2 (HSV-2) e *Chlamydia Trachomatis* (CT) são as DST cuja importância como co-fator ao HPV na carcinogênese cervical vem sendo investigada.

Para avaliar a prevalência das infecções por HSV-2 e CT e sua influência como co-fator ao HPV na etiologia do adenocarcinoma de cérvice uterina, avaliamos retrospectivamente uma série de casos utilizando a técnica de PCR para identificar a presença do DNA do HSV-2 e da CT em casos de adenocarcinoma de cérvice uterina conservados em parafina.

População e métodos

De janeiro de 1995 a dezembro de 2003, 206 casos de AC foram diagnosticados em um hospital público da região sul do Brasil. Esta série de casos foi analisada previamente em um estudo

conduzido por Cambruzzi e col. (2005b), que avaliou a prevalência da infecção por HPV, através da identificação de seu DNA por técnica de PCR. Nesta série, o DNA do HPV foi identificado em 79.4% dos casos (51% HPV 18 e 34% HPV 16).

Extração do DNA:

Para a realização do presente estudo, procedeu-se nova extração de DNA das 206 amostras de adenocarcinoma de cérvice uterina. Os espécimes foram inicialmente desparafinizados com xileno seguido por etanol, o DNA foi isolado com a utilização do kit específico para este fim, QIAamp Tissue Kit (QIAGEN Inc., Santa Clarita, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído em 100 µl de solução e 10 µl foram utilizados para a amplificação. Em todas as amostras, a qualidade do DNA extraído foi avaliada através da amplificação por PCR de um segmento de 268 pares de bases do gene da beta-globina humana. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local.

Identificação do DNA do HSV-2:

A técnica de PCR foi realizada conforme descrito por Madhavan e colaboradores em 2003. Os *primers* utilizados foram HSV-5'-ATG GTG AAC ATC GAC ATG TAC GG-3' e HSV-2'-CCT CCT TGT CGA GGC CCC GAA AC-3', que amplificam um fragmento de 391 pares de bases e identificam o HSV-2 (Invitrogen do Brasil, São Paulo, Brasil). Para a amplificação, em 80 µmol de dNTP foram colocados 1 µmol de cada primer, 10 mM de Tris HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl2, 1 unidade de Taq polimerase e 1 microlitro de DNA da amostra. O perfil térmico do termociclador foi ajustado em um programa que consistia em desnaturação inicial a 94ºC por dois minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94ºC por 45 segundos, anelamento a 60ºC por 45 segundos e extensão a 72ºC por 45 segundos. Controles positivos e negativos para HSV-2 e água foram utilizados. O produto obtido após a passagem pelo termociclador (alíquota 10 µl) foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 5 µg/ml de brometo de etídio. O resultado considerado positivo foi a identificação das bandas de 391 pares de base equivalente ao fragmento descrito.

Identificação do DNA da CT:

Foram utilizados dois *primers* específicos para CT. Os primers CT05 (5'-GAT AGC GAG CAC AAA GAG AGC TAA-3') e CT06 (5'-TTC ACA TCT GTT TGC AAA ACA CGG TCG AAA ACA AAG-3'), que amplificam um segmento de 281 pares de bases (Bobo, 1990), e os *primers* CH1 5'- ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G-3' and CH2 5'- CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA - 3', que amplificam um segmento de 603 pares de bases (Hartley, 2001) para confirmar a identificação da CT. As reações de PCR foram realizadas em um volume de PCR 50 µl contendo 20 nmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl, 3.0 (para CH1 e CH2) e 2,5 mmol/L MgCl2 (para CT05 e CT06), 200 µmol/L dNTP, 2.5 U de Taq DNA polimerase platinum (INVITROGEN, Grand Island, NY, USA), e 25 pmol dos primers. A reação de PCR foi realizada em termociclador (MJ Research

Inc., Watertown, MA, USA) em um programa que consisitia de pré-incubação a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 20 segundos a 72°C. A extensão final foi realizada durante 4 minutes a 72°C. O produto obtido ap[os a amplificação (alíquota 20µl) foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 2%. Controles negativos e positivos para CT e água para controle de contaminação foram utilizados O resultado considerado positivo foi a identificação das bandas equivalentes aos fragmentos descritos.

Resultados

O DNA da β-globina foi identificado em 67 dos 206 casos de adenocarcinoma. Destes casos, 86.5% (54/67 casos) eram do tipo histológico mucinoso, 10.5% do tipo histológico endometrióide, 1.5% do tipo adenocarcinoma de células claras e 1.5% adenocarcinoma seroso.

O DNA do HSV-2 e da CT não foi identificado em nenhuma das 67 amostras analisadas.

Discussão

A infecção pelo HPV é o principal fator etiológico para o desenvolvimento de lesões precursoras e invasoras da cérvice uterina (Walboomers, 1999). Embora muitas mulheres sejam infectadas por tipos oncogênicos de HPV, apenas um pequeno número desenvolve neoplasia cervical invasora, sugerindo que outros cofatores devam estar presentes para o desenvolvimento do carcinoma invasor (Castle, 2003; Castellsagueé, 2003). A despeito da utilização de programas de diagnóstico precoce, estudos demonstram aumento da incidência de adenocarcinoma de cérvice uterina em relação ao carcinoma epidermóide (Vizcaino, 1998; Bray, 2005; Bulk, 2005). Embora a realização do exame de citologia cervical ofereça alguma proteção contra adenocarcinoma cervical invasor (Mitchell, 2003), a identificação de co-fatores ao HPV irá aumentar o conhecimento da etiologia do AC e poderá também auxiliar no desenvolvimento de medidas de prevenção específicas para este tipo histológico de neoplasia cervical.

A associação da infecção pelo HPV com o comportamento sexual motivou a avaliação da importância de outras doenças sexualmente transmissíveis como co-

fatores ao HPV na carcinogênese cervical. Embora alguns estudos demonstrem a existência de uma associação positiva entre infecção por HSV-2 e CT e risco aumentado de desenvolvimento de lesões precursoras e carcinoma invasor cervical (Lulitanond, 1994; Yamakama, 1994; Daling, 1996; Gopalkrishna, 2000; Antilla, 2001; Smith, 2002; Wallin, 2002; Hinkula, 2004; Matsumoto, 2003; Smith, 2004; Castellsagué, 2006), outros não demostraram esta associação (Munoz, 1995; Reesink-Peters, 2001; Lehtinen, 2002; Tran-Thanh, 2003; Yang, 2004; Golijow, 2005; Pérez, 2006). As inconsistências entre estes estudos podem ser resultantes da utilização de diferentes métodos de detecção da infecção, diferentes taxas de prevalência das infecções por HSV-2 e CT entre os grupos populacionais incluídos na análise e principalmente inclusão de casos de lesões precursoras, carcinoma epidemóide e adenocarcinoma de cérvice uterina na mesma série.

Devido a baixa prevalência de adenocarcinoma cervical, os estudos citados anteriormente determinaram a associação da infecção por HSV-2 e CT através da análise do subgrupo de pacientes com adenocarcinoma cervical. Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo, incluindo somente casos de adenocarcinoma cervical e utilizando a técnica de PCR para avaliar a associação entre estas infecções e risco de desenvolvimento desta neoplasia em casos com e sem infecção pelo HPV.

Em nosso estudo o DNA do HSV-2 não foi identificado em nenhum dos 67 casos de adenocarcinoma cervical analisados. Este resultado foi concordante pelo descrito por Meng e cols. (1989), Lulitanond e cols. (1994) e Tran-Thanh e cols. (2003), em estudos que incluíram somente um pequeno número de casos de adenocarcinoma cervical (3, 6 e 11 respectivamente).

Por outro lado, Yamakawa e cols. (1994), identificaram o DNA do HSV-2 em 27% dos casos de adenocarcinoma de cérvice, em concordância com o descrito pelos estudos soro-epidemiológicos, que demonstraram que a presença de anticorpos contra HSV-2 está associado a um maior risco de adenocarcinoma (Smith, 2002; Castellsagué, 2006).

A ausência do DNA do HSV-2 nos casos de adenocarcinoma não exclui sua participação como co-fator ao ao HPV na carcinogênese cervical. Embora casos conservados em parafina constituam uma fonte importante de material para estudos retrospectivos, (Ifner, 2003), o processo de fixação e o tempo de armazenamento

podem alterar consideravelmente a qualidade do DNA extraído (Tran-Thanh, 2003; Yang, 2004; Melo, 2005). Como nossos casos foram fixados em formalina e conservados em parafina, consideramos a possibilidade de dano ao DNA viral, impossibilitando sua identificação por técnica de PCR.

Os resultados de estudos *in vitro* sugerem que o HSV-2 possa interagir diretamente com o HPV aumentando o risco de carcinoma cervical invasor (Galloway, 1990; Di Paolo, 1998). Entretanto, é mais provável que o aumento do risco de câncer associado a infecção pelo HSV-2 esteja relacionado a resposta inflamatória crônica e aumento da proliferação e reparo celular ocasionado pela infecção (Kiviat, 1990). Estes resultados confirmam os estudos soro-epidemiológicos que demonstraram associação positiva entre infecção por HSV-2 e adenocarcinoma cervical invasor (Meng, 1989; Daling, 1996; Smith, 2002; Castellsagué, 2006), entretanto, não podemos estimar o impacto destes fatores no resultado em nosso estudo.

No presente estudo, o DNA da CT não foi identificado em nenhum dos 67 casos de adenocarcinoma cervical incluídos na análise. Este achado reforça os resultados dos estudos soro-epidemiológicos que não demonstraram associação entre a presença de anticorpos séricos contra CT e risco aumentado de adenocarcinoma de cérvice uterina (Koskella, 2000; Smith, 2004; Castellsagué, 2006), embora uma associação positiva com carcinoma epidermóide cervical tenha sido demostrada por dois autores (Antilla, 2001; Smith, 2004). Analisados em conjunto, estes dados sugerem que a infecção por CT não esteja envolvida como co-fator ao HPV na carcinogênese do adenocarcinoma de cérvice uterina.

Este estudo confirma a importância da infecção pelo HPV na etiologia do adenocarcinoma cervical. Porém, o papel e a magnitude das co-infecções por outras DST na carcinogênese desta neoplasias ainda não está esclarecido. O presente estudo reforça os demais, que sugerem que as co-infecções não tenham importância significativa para o carcinoma de cérvice uterina do sub-tipo histológico adenocarcinoma.

Referências

Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA. 2001 Jan 3;285(1):47-51.

Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of Chlamydia trachomatis cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1990 Sep;28(9):1968-73.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, 2006. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

Bray F, Carstensen B, Moller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G, Hakama M, Weiderpass E. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005Sep;14(9):2191-9.

Bulk S, Berkhof J, Bulkmans NW, Zielinski GD, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. Br J Cancer. 2006 Jan 16;94(1):171-5.

Bulk S, Visser O, Rozendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Cervical cancer in the Netherlands 1989-1998: Decrease of squamous cell carcinoma in older women, increase of adenocarcinoma in younger women. Int J Cancer. 2005 Mar 1;113(6):1005-9.

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre CO. Endocervical adenocarcinoma in Porto Alegre and metropolitan region: morphology and prevalence. Revista AMRIGS 2005a jan-mar; 49(1): 27-33.

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre CO. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma.Pathol Oncol Res. 2005b;11(2):114-20.

Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients: assessing their roles as human papillomavirus cofactors. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):29-34.

Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. J Natl Cancer Inst. 2006 Mar 1;98(5):303-15.

Castellsagué X, Munoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis. Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):20-8.

Daling JR, Madeleine MM, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Ashley R, Schwartz SM, Beckmann AM, Hagensee ME, Mandelson MT, Galloway DA. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Jul;5(7):541-8.

Di Paolo JA, Woodworth CD, Coutlee F, Zimonic DB, Bryant J, Kessous A. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. Int J Cancer. 1998 Jun 10;76(6):865-71.

Galloway DA, McDougall JK. Alterations in the cellular phenotype induced by herpes simplex viruses. J Med Virol. 1990 May;31(1):36-42.

Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. Gynecol Oncol. 2005 Jan;96(1):181-6.

Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Koranne RV, Mohan VP, Mittal A, Das BC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. Clin Microbiol Infect. 2000 Feb;6(2):88-93.

Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J, Ridgway G. PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3072-9.

Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J, Lehtinen M, Kauppila A. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. Br J Cancer. 2004 Mar 8;90(5):1025-9.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998 Feb 12;338(7):423-8.

Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):80-8.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (IARC). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. Int J Cancer. 2006 Mar 15;118(6):1481-95.

Kiviat NB, Paavonen JA, Brockway J, Critchlow CW, Brunham RC, Stevens CE, Stamm WE, Kuo CC, DeRouen T, Holmes KK. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. I. Epithelial and inflammatory cellular changes. JAMA. 1985 Feb 15;253(7):989-96.

Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E, Saikku P, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. Int J Cancer. 2000 Jan 1;85(1):35-9.

Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloigu A, Anttila T, Hallmans G, Luukkaala T, Thoresen S, Youngman L, Dillner J, Hakama M. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. Am J Epidemiol. 2002 Oct 15;156(8):687-92.

Lulitanond V, Chantratita W, Thammaprasert K, Nimmanahaeminda K, Matangkasombut P, Yoosook C. Detection of herpes simplex virus type 2 Bgl II N fragment in paraffin-embedded cervical tissue sections using nested polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1994 Dec;8(6):441-7.

Madhavan HN, Priya K, Bagyalakshmi R. Phenotypic and genotypic methods for the detection of herpes simplex virus serotypes. J Virol Methods. 2003 Mar;108(1):97-102.

Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, Hoshiai H, Taketani Y, Kawana T, Yoshikawa H. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Different results after adjustment for HPV DNA and antibodies. Br J Cancer. 2003 Sep 1;89(5):831-3.

Melo A, Roa I, Montenegro S, Capurro I, Roa JC. Detection of human papilloma virus in cytologic samples or biopsies of the cervix. Rev Med Chil. 2005 Jun;133(6):639-44.

Meng XJ, Sun Y, Chen MH, Liu ZH, Zhang YX, Li XZ, Li K, Han RC, Si JY, Hu LY. Viral etiology of cervical carcinoma. Human papilloma virus and herpes simplex virus type 2. Chin Med J (Engl). 1989 Feb;102(2):94-9.

Mitchell H, Hocking J, Saville M. Improvement in protection against adenocarcinoma of the cervix resulting from participation in cervical screening. Cancer. 2003 Dec 25;99(6):336-41.

Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002 Mar 30;359(9312):1085-92.

Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002 Mar 30;359(9312):1093-101

Munoz N, Kato I, Bosch FX, De Sanjose S, Sundquist VA, Izarzugaza I, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, Viladiu P, et al. Cervical cancer and herpes simplex virus type 2: case-control studies in Spain and Colombia, with special reference to immunoglobulin-G sub-classes. Int J Cancer. 1995 Feb 8;60(4):438-42.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editors. Cancer incidence in five continents. Lyon (France): IARC; 2002. (Scientific Publication; nº 155).

Perez LO, Barbisan G, Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. Herpes simplex virus and human papillomavirus infection in cervical disease in Argentine women. Int J Gynecol Pathol. 2006 Jan;25(1):42-7.

Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, Van Der Zee AG, Quint WG, Burger MP, Adriaanse AH. No association of anti-Chlamydia trachomatis antibodies and severity of cervical neoplasia. Sex Transm Infect. 2001 Apr;77(2):101-2.

Schmauz R, Okong P, de Villiers EM, Dennin R, Brade L, Lwanga SK, Owor R. Multiple infections in cases of cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. Int J Cancer. 1989 May 15;43(5):805-9.

Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States--a 24-year population-based study. Gynecol Oncol. 2000 Aug;78(2):97-105.

Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van Den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW; IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. Int J Cancer. 2004 Sep 1;111(3):431-9.

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsague X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. J Natl Cancer Inst. 2002 Nov 6;94(21):1604-13.

Tran-Thanh D, Provencher D, Koushik A, Duarte-Franco E, Kessous A, Drouin P, Wheeler CM, Dubuc-Lissoir J, Gauthier P, Allaire G, Vauclair R, Dipaolo JA, Gravitt P, Franco E, Coutlee F. Herpes simplex virus type II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. Am J Obstet Gynecol. 2003 Jan;188(1):129-34.

Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. Int J Cancer. 1998 Feb 9;75(4):536-45.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T, Anttila T, Bergman F, Hallmans G, Ikaheimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl U, Paavonen J, Dillner J. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. Int J Cancer. 2002 Oct 1;101(4):371-4.

Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, Lacey JV Jr, Devesa S.Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. Cancer. 2004 Mar 1;100(5):1035-44.

Yamakawa Y, Forslund O, Chua KL, Dillner L, Boon ME, Hansson BG. Detection of the BC 24 transforming fragment of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA in cervical carcinoma tissue by polymerase chain reaction (PCR). APMIS. 1994 Jun;102(6):401-6.

Yang YY, Koh LW, Tsai JH, Tsai CH, Wong EF, Lin SJ, Yang CC. Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2004 Oct;37(5):282-7.

***Artigo aceito para publicação no periódico:**
Gynecologic Oncology, Editora Elsevier

*Herpes Simplex Virus Type 2 and Chlamydia Trachomatis in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix

Zereu M*; Zettler CG; Cambruzzi E**; Zelmanowicz A***.**
***Núcleo de Novos Tratamentos em Câncer, Santa Casa de Porto Alegre**
****Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre**
*****Centro de Prevenção, Centro de Câncer, Santa Casa de Porto Alegre**

Introduction: *Adenocarcinoma of the uterine cervice (AC) occurs in 15-20% of primary cervical neoplasias. Although some etiologic factors for squamous cell carcinoma are well defined, and its relationship with sexually transmitted disease as Human Papillomavirus (HPV) is established, we still don't know about the causative factors of most of AC besides HPV infection.* **Objectives:** *To determine the presence of Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) and Chlamydia Trachomatis (CT) DNA in AC specimens, and its correlation with HPV infection.* **Material and methods:** *206 paraffin embedded cases of AC were selected to DNA extraction. The specimens and the DNA were isolated. Samples were first screened for β-globin DNA sequences, and 67 cases were considered adequate to further analysis. In a previous analysis, DNA of HPV was identified in 79.4% of specimens included in this series (51% HPV 18 and 34% HPV 16). The local ethical committee approved the study.* **Results:** *All samples were negative for HVS-2 DNA and CT DNA.* **Conclusions:** *In our series HSV-2 DNA and CT DNA were not found to be integrated to the genome of adenocarcinoma of the uterine cervix and does not seems to be a co-factor for HPV on the etiology of this histologic subtype.*

Introduction

Cervical cancer (CC) is an important public health problem worldwide. Following skin and breast carcinoma, CC is the third most common cancer among Brazilian women (Brasil, 2006), ranking first in some developing countries (Parkin, 2002). Adenocarcinoma of the uterine cervix (AC) constitutes a relatively rare hystologic form of cervical cancer and occurs in 15-20% of primary cervical neoplasias (Smith, 2000; Cambruzzi, 2005a). In spite of effective cytological screening programs, the incidence rate of AC is increasing relative to that of squamous cell carcinoma (SCC) (Vizcaino, 1998; Smith, 2000; Wang, 2004; Bray, 2005; Bulk, 2005).

Persistent viral infection with the high-risk types of HPV is established as a necessary cause for the development of squamous cell and the majority of adenocarcinoma of the uterine cervix (Walboomers, 1999; Cambruzzi, 2005b; Castellsagué, 2006). HPV 18 is a risk factor for the development of adenocarcinoma whereas HPV 16 is associated with both histologic types (Bulk, 2006; Castellsagué, 2006). The natural history studies of HPV infection have shown that, different from those that progress to cancer, most infections are transient and not associated with detectable cytological abnormalities (Ho, 1998). The reasons for this variable natural history are poorly understood but it has been generally assumed that other causes or co-factors must be important for the development of neoplasia in HPV-infected women. Although several co-factors have been associated with the risk of SCC (Moreno, 2002; Munoz, 2002; Smith, 2002; Smith, 2004; IARC, 2006), their impact on the progression of HPV-infected cervical cells to adenocarcinoma remains unclear.

Since 1989, when Schmauz et al. published that multiple sexually transmitted diseases (STD) were a risk factor for CC (Schmauz, 1989), suggesting that additional non-HPV STD may act as HPV co-factors, even after adjustment for HPV, this association has been studied. Among other STD, Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2) and *Chlamydia Trachomatis* (CT) infection has been investigated as HPV co-factor for cervical carcinogenesis (Smith, 2002; Smith, 2004).

To examine the prevalence of the HSV-2 and CT infection and its influence as a co-factor of HPV in the etiology of adenocarcinoma of the uterine cervix, we performed a retrospective study using PCR to detect the presence of HSV-2 DNA and CT DNA in paraffin embedded cancer tissue.

Material and methods

From January 1995 to December 2003, 206 cases of AC were diagnosed in a public hospital in the South of Brazil. In a previous study conducted by Cambruzzi et al. (2005b) the HPV DNA was identified in 79.4% of adenocarcinoma specimens (51% HPV 18 and 34% HPV 16).

DNA extraction:

Paraffin embedded tissue was selected and DNA extraction was performed. The biopsy specimens for DNA analysis were deparaffinize with xylene followed by ethanol, and the DNA was isolated using the QIAamp Tissue Kit (QIAGEN Inc., Santa Clarita, CA, USA) according to the

manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 100 µl of elution buffer and 10 µl were used for the amplification reaction. Samples were first screened for β-globin DNA sequences, and 67 was considered adequate to further analysis. The local ethical committee approved the study.

HSV-2 DNA detection:

To detect HSV-2 DNA using polymerase chain reaction, a pair of primers that bracket 391 base pair segment of DNA polymerase gene was used as described by Madhavan et al. (2003). The sequences are an upstream primer HSV-5'-ATG GTG AAC ATC GAC ATG TAC GG-3' and one type specific downstream primer HSV-2-5'- CCT CCT TGT CGA GGC CCC GAA AC-3' (Invitrogen Custom Primers, São Paulo, Brazil). The reaction conditions contained 1µg sample of DNA. For amplification, a 25 µl reaction was set with 80 µmol of dNTP, 1 µmol of each primer, 10 mM of Tris HCl (pH 8,3), 50 mM of KCl, 1,5 mM of MgCl2 and 1 unit of *Taq* polymerase. One microlitre of DNA was added as the template. The thermal profile consisted of denaturation at 94ºC for 2 minutes followed by 40 cycles with 45 seconds of denaturation (94ºC), annealing (60ºC) and extension (72ºC). Negative and positive HSV-2 controls as well as water as a negative contamination PCR control were included in each assay. The amplified products were analyzed by gel electrophoresis using 2% agarose containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide. The results were considered positive when the product that was equivalent to the fragment described was found.

CT DNA detection:

PCR primer sets specific for the CT gene were used. The primer pairs CT05 and CT06 were designed by Bobo et al. (1990). These primers: CT05 (5'-GAT AGC GAG CAC AAA GAG AGC TAA-3') and CT06 (5'-TTC ACA TCT GTT TGC AAA ACA CGG TCG AAA ACA AAG-3') amplify a 281 bp product from the CT major outer membrane protein (MOMP) gene. To confirm CT identification, another PCR test, with primers annealing to the Chlamydia spp, was performed. The primers employed, CH1 5'- ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G-3' and CH2 5'- CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA - 3' amplify a 603 bp product from omp2 gene, designed by Hartley et al. (2001). PCR reactions were performed in a volume of 50 µl containing 20 nmol/L of Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L of KCl, 3.0 (for CH1 and CH2) and 2,5 mmol/L of MgCl2 (for CT05 and CT06), 200 µmol/L of deoxynucleoside triphophase, 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (INVITROGEN, Grand Island, NY, USA) and 25 pmol of both forward and reverse primers. PCR was performed in a PTC – 1196 DNA thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) under the following conditions: 5 minute preincubation at 94°C, followed by 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C and 20 seconds at 72°C. Final extension was performed for 4 minutes at 72°C. The amplimers were examined by electrophoresis on 2% agarose gels according to standard procedures. Negative and positive Chlamydia trachomatis controls as well as water as a negative contamination PCR control were included in each assay. PCR amplification was performed in duplicate for each DNA sample. The results were considered positive when the product that was equivalent to the fragment described was found.

Results

Overall, 67 of the 206 paraffin embedded cases of cervical adenocarcinoma were β-globin positive and were further analyzed for the presence of HSV-2 and CT DNA. The predominant histologic subtype was mucinous adenocarcinoma (86.5%), followed by endometrioid adenocarcinoma (10.5%). None of the 67 cervical adenocarcinoma cases included in our analysis contained HVS-2 DNA or CT DNA.

Discussion

HPV infection is the main etiologic factor for invasive and pre-invasive cervical neoplasia (Walboomers, 1999; Castellsagué, 2006). However, from women infected with high-risk types of HPV, only a small subset will develop invasive cervical cancer, suggesting that other co-factors must be present for the development of malignancy (Castle, 2003; Castellsagueé, 2003). In spite of utilization of high quality cytologic screening programs, studies have reported increasing rates of cervical adenocarcinoma relative to SCC (Vizcaino, 1998; Bray, 2005; Bulk, 2005). Although cervical screening offers some protection against invasive carcinoma (Mitchell, 2003), due to early detection of pre-malignant lesions, the identification of co-fators for HPV improves the understanding of etiology of AC and may also be useful from a prevention standpoint.

The association of HPV infection with sexual behaviour has motivated the search for a sexually transmitted agent other than HPV, which may be a cofactor for cervical carcinogenesis. Although some studies have found a positive association of HSV-2 and CT and pre-invasive and invasive cervical neoplasia (Lulitanond, 1994; Yamakama, 1994; Daling, 1996; Gopalkrishna, 2000; Antilla, 2001; Smith, 2002; Wallin, 2002; Hinkula, 2004; Matsumoto, 2003; Smith, 2004; Castellsagué, 2006), others failed to find such association (Munoz, 1995; Reesink-Peters, 2001; Lehtinen, 2002; Tran-Thanh, 2003; Yang, 2004; Golijow, 2005; Pérez, 2006). The inconsistencies among these studies could derive from differences in the detection methods used, differences in the prevalence of HSV-2 and CT infection among

different populations included in the analysis, and inclusion of cases of pre-invasive cervical lesions, SCC and AC of the uterine cervix in the same series.

Because of low prevalence of cervical adenocarcinoma, studies have included both histologic types and the association with HSV-2 and CT infection was determinate by the analysis of the subgroup of patients with cervical AC. To our knowledge, this is the first report using PCR, a highly sensitive diagnostic method, to examine this association specifically in cervical AC specimens.

In our study, the HSV-2 DNA was not identified in any of the 67 cervical AC specimens included in the analysis. This result is similar to those described by Meng et al. (1989), Lulitanond et al. (1994) and Tran-Thanh et al. (2003), in studies that included only a small number of cervical AC cases (3, 6 and 11 respectively).

On the other hand, Yamakawa et al. (1994), have found HSV-2 DNA in 27% of cervical AC cases, in accordance with epidemiologic studies that showed that HSV-2 seroprevalence was significantly higher among cases of cervical AC than among control specimens (Smith, 2002); among HPV DNA-positive cases, HSV-2 positivity was associated with increased risk of AC (OR=2.27; 95% IC=1.23-4.18), after adjustment for potential confounders (Castellsagué, 2006).

The absence of HSV-2 DNA in cervical AC biopsy does not exclude its participation as a co-factor in cervical carcinogenesis. Although archival specimens including paraffin-embedded tissue constitute an important source of materials for retrospective studies (Ifner, 2003), it is well known that the time of fixation and the type of fixative used can considerably affect the quality of extracted DNA (Tran-Thanh, 2003; Yang, 2004; Melo, 2005). As our specimens were formalin-treated and paraffin-embedded, we considered the possibility that conditions as well as time of storage may have affected the HSV-2 DNA stability for PCR detection.

Results of several *in vitro* studies in transfected cell lines suggest that HSV-2 may interact directly with HPV to increase the risk of cervical cancer (Galloway, 1990; Di Paolo, 1998). However, it is more likely that the increased cancer risk associated with HSV-2 is the result of chronic inflammatory response and increased epithelial cell repair and proliferation (Kiviat, 1990). These findings support epidemiological studies that found a positive association between HSV-2 seroposity

and invasive cervical AC (Meng, 1989; Daling, 1996; Smith, 2002; Castellsagué, 2006), however we cannot estimate the impact of those factors in our results.

In the present study, CT DNA was not identified in any of the 67 cervical AC specimens included in the analysis. This finding supports the results of the epidemiologic studies that have shown no association between the presence of serum antibodies to CT and higher risk of cervical AC (Koskella, 2000; Smith, 2004; Castellsagué, 2006), although a positive association with SCC of the uterine cervix had been shown (Antilla, 2001; Smith, 2004). Taking together, those data suggest that CT infection may not be suggested as an HPV's co-factor in the development of cervical AC.

This study supports the central role of HPV on the etiology of cervical adenocarcinoma. Our findings suggest that HSV-2 and CT infection has no effect on cervical adenocarcinoma risk. However, the impact of sexually transmitted diseases other than HPV in cervical carcinogenesis remains to be proved.

References

Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA. 2001 Jan 3;285(1):47-51.

Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of Chlamydia trachomatis cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1990 Sep;28(9):1968-73.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, 2006. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

Bray F, Carstensen B, Moller H, Zappa M, Zakelj MP, Lawrence G, Hakama M, Weiderpass E. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005Sep;14(9):2191-9.

Bulk S, Berkhof J, Bulkmans NW, Zielinski GD, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. Br J Cancer. 2006 Jan 16;94(1):171-5.

Bulk S, Visser O, Rozendaal L, Verheijen RH, Meijer CJ. Cervical cancer in the Netherlands 1989-1998: Decrease of squamous cell carcinoma in older women, increase of adenocarcinoma in younger women. Int J Cancer. 2005 Mar 1;113(6):1005-9.

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre CO. Endocervical adenocarcinoma in Porto Alegre and metropolitan region: morphology and prevalence. Revista AMRIGS 2005a jan-mar; 49(1): 27-33.

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre CO. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma.Pathol Oncol Res. 2005b;11(2):114-20.

Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients: assessing their roles as human papillomavirus cofactors. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):29-34.

Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. J Natl Cancer Inst. 2006 Mar 1;98(5):303-15.

Castellsagué X, Munoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis. Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):20-8.

Daling JR, Madeleine MM, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Ashley R, Schwartz SM, Beckmann AM, Hagensee ME, Mandelson MT, Galloway DA. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Jul;5(7):541-8.

Di Paolo JA, Woodworth CD, Coutlee F, Zimonic DB, Bryant J, Kessous A. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N subfragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. Int J Cancer. 1998 Jun 10;76(6):865-71.

Galloway DA, McDougall JK. Alterations in the cellular phenotype induced by herpes simplex viruses. J Med Virol. 1990 May;31(1):36-42.

Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. Gynecol Oncol. 2005 Jan;96(1):181-6.

Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Koranne RV, Mohan VP, Mittal A, Das BC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. Clin Microbiol Infect. 2000 Feb;6(2):88-93.

Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J, Ridgway G. PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3072-9.

Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J, Lehtinen M, Kauppila A. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. Br J Cancer. 2004 Mar 8;90(5):1025-9.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 1998 Feb 12;338(7):423-8.

Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003;(31):80-8.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (IARC). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. Int J Cancer. 2006 Mar 15;118(6):1481-95.

Kiviat NB, Paavonen JA, Brockway J, Critchlow CW, Brunham RC, Stevens CE, Stamm WE, Kuo CC, DeRouen T, Holmes KK. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. I. Epithelial and inflammatory cellular changes. JAMA. 1985 Feb 15;253(7):989-96.

Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E, Saikku P, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. Int J Cancer. 2000 Jan 1;85(1):35-9.

Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloigu A, Anttila T, Hallmans G, Luukkaala T, Thoresen S, Youngman L, Dillner J, Hakama M. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. Am J Epidemiol. 2002 Oct 15;156(8):687-92.

Lulitanond V, Chantratita W, Thammaprasert K, Nimmanahaeminda K, Matangkasombut P, Yoosook C. Detection of herpes simplex virus type 2 Bgl II N fragment in paraffin-embedded cervical tissue sections using nested polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1994 Dec;8(6):441-7.

Madhavan HN, Priya K, Bagyalakshmi R. Phenotypic and genotypic methods for the detection of herpes simplex virus serotypes. J Virol Methods. 2003 Mar;108(1):97-102.

Matsumoto K, Yasugi T, Oki A, Hoshiai H, Taketani Y, Kawana T, Yoshikawa H. Are smoking and chlamydial infection risk factors for CIN? Diffe

Perez LO, Barbisan G, Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. Herpes simplex virus and human papillomavirus infection in cervical disease in Argentine women. Int J Gynecol Pathol. 2006 Jan;25(1):42-7.
Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, Van Der Zee AG, Quint WG, Burger MP, Adriaanse AH. No association of anti-Chlamydia trachomatis antibodies and severity of cervical neoplasia. Sex Transm Infect. 2001 Apr;77(2):101-2.

Schmauz R, Okong P, de Villiers EM, Dennin R, Brade L, Lwanga SK, Owor R. Multiple infections in cases of cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. Int J Cancer. 1989 May 15;43(5):805-9.

Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States--a 24-year population-based study. Gynecol Oncol. 2000 Aug;78(2):97-105.

Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van Den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW; IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. Int J Cancer. 2004 Sep 1;111(3):431-9.

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsague X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. J Natl Cancer Inst. 2002 Nov 6;94(21):1604-13.

Tran-Thanh D, Provencher D, Koushik A, Duarte-Franco E, Kessous A, Drouin P, Wheeler CM, Dubuc-Lissoir J, Gauthier P, Allaire G, Vauclair R, Dipaolo JA, Gravitt P, Franco E, Coutlee F. Herpes simplex virus type II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. Am J Obstet Gynecol. 2003 Jan;188(1):129-34.

Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. Int J Cancer. 1998 Feb 9;75(4):536-45.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T, Anttila T, Bergman F, Hallmans G, Ikaheimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl U, Paavonen J, Dillner J. A population-based prospective study of

ANEXO 1- Casos e Métodos

I Delineamento

- Estudo de série de casos para determinar o objetivo primário.

- Estudo transversal para determinar o objetivo secundário.

II Descrição da Amostra

A avaliação da prevalência da infecção por HSV-2 e CT em adenocarcinoma de cérvice uterina e sua associação com a infecção pelo HPV, foi realizada em casos de adenocarcinoma de cérvice uterina utilizados em um estudo realizado nesta mesma instituição, que avaliou a relação da expressão de Ki-67 e lesões intraepiteliais escamosas em adenocarcinoma endocervical associado ao HPV (Cambruzzi, 2005).

A amostra consiste em 206 casos de adenocarcinoma endocervical primários, fixados em formalina a 10% e incluídas em parafina, diagnosticados no período de 1995 a 2003, provenientes do arquivo do laboratório de patologia de um hospital público de Porto Alegre. Os espécimes de cérvice uterina consistiam de biópsia convencional, conização, produto de curetagem uterina (somente canal cervical), histerectomia simples e pan-histerectomia. Foram excluídos da análise os casos de adenocarcinoma *in situ*, neoplasias metastáticas em cérvice uterina, neoplasias estromais e demais tumores epiteliais do colo uterino. A avaliação microscópica das lesões do colo uterino foi realizada através da observação de cortes histológicos de 03 micrômetros de espessura e corados por hematoxilina-eosina. Todos os diagnósticos foram revisados por dois patologistas individualmente e em conjunto havendo uma concordância de 100% entre o diagnóstico prévio e os dados obtidos pelo estudo (razão do teste de Kappa igual a +1).

De cada caso (bloco de parafina), foram selecionadas áreas especificas por meio de dissecção microscópica, que continham somente células glandulares tumorais. Obtiveram-se cortes de 10 micrômetros de espessura, sendo alocados em tubos de *eppendorf*. Procedeu-se extração do DNA a qualidade do DNA extraído foi verificada pela amplificação do gene da beta-globina humana. A identificação do HPV foi realizada através da técnica de PCR, que utilizou os *primers* GP5+/GP6+, que amplificam um fragmento de 140 pares de base na região L1. *Primers* específicos para as seqüências de oligonucleotídeos das proteínas E6 e E7 foram utilizados para a diferenciação entre os tipos de HPV (HPV-16 e HPV-18). A infecção pelo HPV foi identificada em 79.48% dos casos. Destes, o HPV 18 foi encontrado em 51.09% e o HPV 16 em 34.06% dos casos. Os casos restantes (14.85%) correspondem a outros tipos HPV.

III Extração do DNA

Para a realização do presente estudo, procedeu-se nova extração de DNA das 206 amostras de adenocarcinoma de cérvice uterina. Os espécimes foram inicialmente desparafinizados com xileno seguido por etanol, o DNA foi isolado com a utilização do *kit* específico para este fim, QIAamp Tissue Kit (QIAGEN Inc., Santa Clarita, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído em 100 µl de solução tampão e 10 µl foram utilizados para a realização da reação de amplificação. Em todas as amostras, a qualidade do DNA extraído foi avaliada através da amplificação por PCR de um segmento de 268 pares de bases do gene da beta-globina humana (Bauer, 1991; Coutleé, 1999).

IV Critérios diagnósticos de co-infecção

a. Vírus Herpes Simples Tipo 2

A técnica de PCR foi realizada conforme descrito por Madhavan e colaboradores em 2003. Os *primers* utilizados foram HSV-5'-ATG GTG AAC ATC GAC ATG TAC GG-3' e HSV-2'-CCT CCT TGT CGA GGC CCC GAA AC-3', que amplificam um fragmento de 391 pares de bases e identificam o HSV-2 (Invitrogen do Brasil, São Paulo, Brasil). Para a amplificação, em 80 µmol de dNTP

foram colocados 1 μmol de cada *primer*, 10 mM de Tris HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 unidade de *Taq* polimerase e 1 μg de DNA da amostra. O perfil térmico do termociclador foi ajustado em um programa que consistia em desnaturação inicial a 94ºC por dois minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94ºC por 45 segundos, anelamento a 60ºC por 45 segundos e extensão a 72ºC por 45 segundos. Controles positivos e negativos para HSV-2 e água foram utilizados. O produto obtido após a passagem pelo termociclador (alíquota 10 μl) foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 0.5 μg/ml de brometo de etídio. O resultado considerado positivo foi a identificação das bandas de 391 pares de base equivalente ao fragmento descrito.

b. *Chlamydia trachomatis* (CT)

Foram utilizados dois *primers* específicos para CT. Os *primers* CT05 (5'-GAT AGC GAG CAC AAA GAG AGC TAA-3') e CT06 (5'-TTC ACA TCT GTT TGC AAA ACA CGG TCG AAA ACA AAG-3'), que amplificam um segmento de 281 pares de bases (Bobo, 1990), e os *primers* CH1 5'- ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G-3' and CH2 5'- CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA - 3', que amplificam um segmento de 603 pares de bases (Hartley, 2001) para confirmar a identificação da CT. As reações de PCR foram realizadas em um volume de PCR 50 μl contendo 20 nmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl, 3.0 (para CH1 e CH2) e 2,5 mmol/L MgCl2 (para CT05 e CT06), 200 μmol/L dNTP, 2.5 U de Taq DNA polimerase *platinum* (INVITROGEN, Grand Island, NY, USA), e 25 pmol dos *primers*. A reação de PCR foi realizada em termociclador (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) em um programa que consisitia de pré-incubação a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 20 segundos a 72°C. A extensão final foi realizada durante 4 minutes a 72°C. O produto obtido ap[os a amplificação (alíquota 20μl) foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 2%. Controles negativos e positivos para CT e água para controle de contaminação foram utilizados O resultado considerado positivo foi a identificação das bandas equivalentes aos fragmentos descritos.

V Análise dos Resultados

Os dados são descritos quanto às suas medidas de freqüências, tendência central e dispersão. A associação entre a prevalência das infecções com a freqüência do HPV é descrita através da razão de prevalência.

VI Considerações Éticas

Conforme as normas do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Irmandade Santa Casa de Misericórdia, o estudo foi submetido à sua apreciação. Por tratar-se de um estudo envolvendo material biológico conservado em parafina, o consentimento informado não foi aplicado. O material genético extraído das amostras será utilizado somente para análise dos agentes infecciosos estudados. Os resultados encontrados serão utilizados somente para os fins propostos no estudo, ficando à disposição para eventuais consultas na biblioteca da Instituição. Este estudo foi aprovado em 4 de maio de 2004, parecer co-substanciado número 141/04 (anexo 2).

VII Referências Bibliográficas Específicas

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. JAMA. 1991 Jan 23-30;265(4):472-7.

Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of Chlamydia trachomatis cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1990 Sep;28(9):1968-73.

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre CO. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma.Pathol Oncol Res. 2005b;11(2):114-20.

Coutleé F, Gravitt P, Richardson H, Hankins C, Franco E, Lapointe N, Voyer H. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. The Canadian Women's HIV study group. J Clin Microbiol. 1999 Jun;37(6):1852-7.

Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J, Ridgway G. PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3072-9.

Madhavan HN, Priya K, Bagyalakshmi R. Phenotypic and genotypic methods for the detection of herpes simplex virus serotypes. J Virol Methods. 2003 Mar;108(1):97-102.

ANEXO 2 - Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

ANEXO 3 - Figuras

Figura 1: Amplificação por PCR do DNA do HSV-2 (linha 1 marcador de peso molecular 100 pares de bases; linhas 2 e 3 amostras de adenocarcinoma de cérvice uterina; linas 4 e 5 controles positivos para HSV-2 e linha 6 controle negativo).

1 2 3 4 5 6

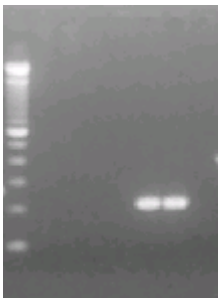
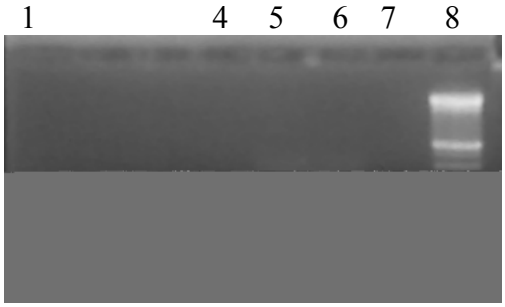


Figura 2: Amplificação por PCR de um segmento de 603 pares de base do DNA da CT (linhas 1 a 30 amostras de adenocarcinoma de cérvice uterina; linhas 31 e 32 controles positivos para CT; linha 33 controle negativo e linha 34 marcador de peso molecular 100 pares de bases).

Figura 3: Amplificação por PCR de um segmento de 281 pares de bases do DNA da CT (linhas 1 a 4 amostras de adenocarcinoma de cérvice uterina; linhas 5 e 6 controles positivos para CT; linha 7 controle negativo e linha 8 marcador de peso molecular 100 pares de bases).



Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo