



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**



**DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV E DO
POLIMORFISMO DA PROTEÍNA P53 EM PACIENTES COM
LESÕES CERVICAIS ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO CENTRO
DE CONTROLE DE ONCOLOGIA DO AMAZONAS.**

JÚNIA RAQUEL DUTRA FERREIRA

**MANAUS
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**



JÚNIA RAQUEL DUTRA FERREIRA

**DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV E DO
POLIMORFISMO DA PROTEÍNA P53 EM PACIENTES COM
LESÕES CERVICAIS ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO CENTRO
DE CONTROLE DE ONCOLOGIA DO AMAZONAS.**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Patologia Tropical da Universidade
Federal do Amazonas como parte do requisito
para obtenção de título de Mestre em Patologia
Tropical, área de concentração Diagnóstico e
Controle.**

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi-Filho.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Maria Borborema dos Santos.

**MANAUS
2007**

Ferreira, Júnia Raquel Dutra

F383d Detecção da infecção pelo HPV e do polimorfismo da proteína p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas / Júnia Raquel Dutra Ferreira . - Manaus: UFAM, 2007.

111 f.; il. algumas color.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi-Filho.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Maria B. dos Santos.

1. Câncer cervical 2. HPV 3. Oncologia I. Título

CDU 616-026.6(811.3)(043.3)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, que se empenharam em transmitir aos seus filhos muito mais do que palavras, mas exemplos de valores sólidos.

Ao meu querido Juninho, companheiro de todas as horas, apoio em todos os momentos, paciente em minhas ausências.

A toda a minha linda família, que eu levo sempre em meu coração, em especial à tia Lenita, minha querida madrinha.

Aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho e Prof^a. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, pelos ensinamentos, apoio, amizade, exemplo.

Às pacientes, pela colaboração no estudo mesmo em momentos difíceis.

A Deus, fonte de sabedoria e força, luz e amor.

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical, pela oportunidade de realizar esse mestrado.
- Ao professor Spartaco Astolfi Filho, exemplo de pesquisa e trabalho, Dra Cristina Maria Borborema dos Santos e Dr. Paulo José Benevides, pelo apoio em todas as etapas deste estudo, sempre confiantes e empenhados na missão de transmitir os ensinamentos, e pela amizade: MUITO OBRIGADA!
- À Dra. Júlia Salem, Dr. Luís Ferreira, Dr. Nelson Fraiji, Dr. Emersom Lima e a todos os professores do programa de mestrado, pela valiosa contribuição na construção do nosso aprendizado.
- À Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas, que possibilitou a realização deste estudo, principalmente ao Dr. João Baldino, Dr. Gilson José Correa, Dr. Luís Carlos Martins, Enfermeira Marília.
- Às auxiliares de enfermagem da FCECON-AM, Dilce, Bel, Ivaneide e D. Graça, pelo auxílio no recrutamento das pacientes e ao pessoal do arquivo, pela ajuda nas buscas das pacientes.
- Ao CEP-FCECON.
- Aos colegas de departamento, professores e técnicos administrativos, pelo apoio, auxílio e amizade.
- À professora Maria Rosa Lozzano Borrás, quem me iniciou na vida científica, agradeço enormemente pela amizade, carinho, inspiração, paciência e apoio.
- À professora Maria Elisa Freire Meneghini, a quem eu agradeço pelo incentivo, entusiasmo, alegria, disponibilidade e amizade.
- A todos os colegas dos laboratórios do CAM, pela amizade, apoio e convívio alegre.
- À Dra. Luciana Leomil, pela grande ajuda na elaboração do artigo.
- À Bel, pelo fornecimento dos primers e auxílio no material.
- Aos amigos do laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM: Norma Suely Freitas, Juliana Pereira, Cíntia Mara Oliveira, Francisca Dabella, Diego e Robertinho – as trocas de apoio, ansiedades, material, dicas, dúvidas num ambiente tão agradável nos permite trabalhar, mas ao mesmo tempo, ter momentos muito prazerosos.

- Aos queridos colegas do mestrado, muitos dos quais se transformaram em grandes amigos (Adriana, Gisele, Cláudio, Alita, Juliana), agradeço muito pelo nosso convívio! A força que trocamos durante todo esse período engrandeceu nossa amizade, que levaremos para a vida toda.
- À minha família, que sempre torceu por mim, agradeço de coração (Bina e Petit também)!
- Às minhas grandes amigadas em Minas, Ouro Preto, RS e por aí fora: obrigada pela força!
- Ao meu querido esposo, quem me acompanhou todos os dias deste trabalho, dando apoio, segurando apreensões, auxiliando nas decisões, todo o meu carinho e gratidão!
- E a todos que me ajudaram a concluir essa etapa, todos mesmo, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Foi realizado um estudo para analisar a infecção pelo HPV, a frequência do polimorfismo da p53 codon 72 e fatores sócio-econômicos-culturais em pacientes com lesão cervical pré-maligna ou maligna na Fundação CECON-AM, centro de referência em oncologia em Manaus, Amazonas. As pacientes foram submetidas à coleta de material cervical para detecção de HPV por reação da polimerase em cadeia (PCR) com *primers* MY09/MY11 seguido de *Nested*-PCR com GP5+/GP6+ e para determinar o polimorfismo da proteína p53. Das 164 pacientes participantes do presente estudo, 11 não apresentaram resultado histopatológico confirmatório. Nas 153 pacientes, observou-se o DNA do HPV em 94,7% (145), sendo 100% (n=3) em Adenocarcinoma, Câncer cervical (n=21) e LSIL (n=14), e 93% (n=115) em HSIL. Todos os tipos de HPV encontrados são considerados como de alto risco e alguns de provável alto risco oncogênico, com maior frequência do HPV-16, -33 e -18 (81,9%, 4,9% e 4,1%, respectivamente). As frequências gênicas da p53 evidenciadas na população (n=153) foram 0,63 para o alelo *Arg* e 0,37 para o alelo *Pro*, e as frequências genotípicas foram 61% *Arg/Pro*, 32% *Arg/Arg* e 7% *Pro/Pro*. Os fatores sócio-econômicos-culturais que apresentaram evidências de associação com as lesões estudadas foram idade (p=0,000), multiparidade (p=0,045), uso de anticoncepcional (p=0,003) e número de parceiros sexuais (p=0,021). O conhecimento da alta frequência de tipos de HPV de alto risco em lesões cervicais pré-malignas e malignas reforça a necessidade da melhoria do acesso da população feminina aos programas de prevenção e detecção precoce de lesões do colo do útero, ação que, no futuro, poderá ser aliada à vacinação contra o HPV, constituindo-se a melhor maneira de diminuição da morbimortalidade associadas à neoplasia cervical.

PALAVRAS-CHAVE: HPV; Câncer cervical; p53; polimorfismo.

ABSTRACT

To analyze HPV infection, the frequency of the p53 polymorphism at codon 72 and economic and cultural factors in patients with precancerous or cancerous cervical injuries, we conducted a study at Fundação CECON, cancer reference hospital, Manaus, Amazonas. All the patients had been submitted to a collection of cervical specimens for detection of DNA HPV by Nested-PCR using primers MY09/MY11 followed with GP5+/GP6+ and automated DNA sequencing to identify the HPV type and to determine the p53 codon 72 polymorphism by PCR. In 153 patients, 9.2% presented LSIL, 75.1% presented HSIL, 13.7% cervical cancer and 2% adenocarcinoma. DNA HPV was presented in 94,7% (145) of all patients, being 100% in adenocarcinoma, cervical cancer and LSIL and 93% (107) in HSIL. All the know high-risk HPV and some probably high-risk genotypes were detected, with HPV-16, -33 and -18 the most frequent (81,9%, 4,9% e 4,1%). Genotypes frequencies of p53 polymorphism (n=153) were 61% for ARG/PRO, 32% for ARG/ARG and 7% for PRO/PRO. The economic-cultural factors with evidences of association with the patients lesions had been age (p=0,000), multiparity (p=0,045) contraceptive use (p=0,003) and number of sexual partners (p=0,021). The knowledge of high frequency of HPV high risk types in cervical lesions strengthens the necessity of the improvement of women population access to the prevention and early detection of cervical cancer programs, wich, in the future, could be allied to a vaccination against the HPV - the best chance of decreasing the morbimortality associated with cervical neoplasia.

Key words: HPV, cervical cancer, PCR, p53, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colo do útero	16
Figura 2	Papilomavírus humano	23
Figura 3	Genoma do HPV	24
Figura 4	Mecanismo da oncogênese envolvendo as proteínas E6 e E7 do HPV	35
Figura 5	Proteína E6 do HPV de alto risco promove a degradação da p53 via ubiquitina	39
Figura 6	Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM	48
Figura 7	Esboço linear do genoma do HPV.....	51
Figura 8	Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% das amostras digeridas com TPK e extraídas pelo método fenol:clorofórmio	58
Figura 9	Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5%, da amplificação do HPV utilizando os oligonucleotídeos MY09 e MY11.....	59
Figura 10	Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% evidenciando fragmentos de 450 pb, resultantes da amplificação do HPV utilizando os oligonucleotídeos MY09 e MY11	60
Figura 11	Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% evidenciando fragmentos de 150 pb, resultantes da amplificação do HPV utilizando os oligonucleotídeos GP5+ E GP6+	60
Figura 12	Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% evidenciando fragmentos de 141 e 193 pb para Arginina e Prolina, respectivamente.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação das lesões intra-epiteliais cervicais e carcinoma invasor	18
Quadro 2	Classificação e tipos de HPV	22
Quadro 3	Genes relacionados ao HPV e funções	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição da população de estudo em relação aos tipos de lesão do colo do útero	57
Gráfico 2	Distribuição das pacientes HPVs positivas e negativas em relação às lesões do colo do útero	
Gráfico 3	Distribuição dos tipos de HPV na população de estudo	62
Gráfico 4	Distribuição dos tipos de HPV em relação às lesões do colo do útero da população de estudo.....	62
Gráfico 5	Distribuição do polimorfismo da proteína p53 na população de estudo.....	64
Gráfico 6	Box plot das idades das pacientes segundo o tipo de lesão	67
Gráfico 7	Distribuição segundo o nível de escolaridade da população de estudo em relação aos tipos de lesão.....	68
Gráfico 8	Box plot das idades na 1ª relação sexual das pacientes segundo o tipo de lesão.....	69
Gráfico 9	Box plot das idades na 1ª gravidez das pacientes segundo o tipo de lesão.....	70
Gráfico 10	Box plot do número total de partos segundo o tipo de lesão.....	70
Gráfico 11	Distribuição segundo à origem da população de estudo.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição da frequência de HPV na população de estudo em relação aos tipos de lesão.....	61
Tabela 2	Distribuição da frequência de HPV na população de estudo em relação aos tipos de lesão.....	61
Tabela 3	Distribuição das frequências gênicas dos alelos polimórficos da proteína p53 códon 72 na população de estudo.....	64
Tabela 4	Distribuição do polimorfismo da proteína p53 da população de estudo em relação aos tipos de lesão	65
Tabela 5	Distribuição do polimorfismo da proteína p53 da população de estudo em relação às pacientes HPV positivas e negativas	65
Tabela 6	Tabela 6 – Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas em relação ao tipo de lesão.....	66
Tabela 7	Tabela 7 – Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas em relação ao tipo de lesão.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

JEC	Junção escamo-colunar
ZT	Zona de transformação
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC I	Neoplasia intraepitelial cervical grau I, refere-se à LSIL
NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical grau II, refere-se à HSIL
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical grau III, refere-se à HSIL
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HPV	Papilomavírus humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
WHO	World Health Organization
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade
p53	Proteína 53
P53	Gene P53
L1	Região tardia ou <i>late</i> do genoma do HPV – proteína do capsídeo principal
L2	Região tardia ou <i>late</i> do genoma do HPV – proteína do capsídeo
E1-E7	Região precoce ou <i>early</i> do genoma do HPV
LCR	Região longa de controle presente no genoma do HPV
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo dos fragmentos de restrição
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ORF	<i>Open read frame</i> ou região aberta de leitura

G1	Gap 1 – Fase do ciclo celular
S	Síntese - Fase do ciclo celular
M	Mitose - Fase do ciclo celular
pRB	Proteína do Retinoblastoma
CDK	Ciclina dependente de quinase
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
KDa	KiloDaltons
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
E6AP	Proteína associada a E6
Arg	Arginina
Pro	Prolina
CGC	Citosina, Guanina, Citosina
CCC	Citosina, Citosina, Citosina
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O colo do útero	16
1.2 Lesões intra-epiteliais escamosas e câncer do colo do útero	17
1.3 Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical	19
1.3.1 O papilomavírus humano (HPV)	20
1.3.2 Classificação do HPV	21
1.3.3 Estrutura genômica	23
1.3.4 Transmissão	26
1.3.5 Epidemiologia	26
1.3.6 Ciclo de vida e oncogênese	29
1.3.6.1 Fase não-proliferativa ou manutenção do genoma	30
1.3.6.1.1 Amplificação do genoma viral	30
1.3.6.1.2 Síntese viral	31
1.3.6.2 Fase proliferativa	32
1.3.6.2.1 O papel das proteínas E6 e E7 na oncogênese	34
1.3.6.2.2 A proteína p53	37
2. OBJETIVOS	43
2.1 Geral	43
2.2 Específicos	43
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Modelo de Estudo	44
3.2 Universo de estudo	44
3.2.1 População de Referência	44
3.2.2 População de Estudo	44
3.2.3 Amostra	45
3.2.4 Cálculo da amostra	45
3.2.5 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão	46
3.2.5.1 Critérios de Inclusão	46
3.2.5.2 Critérios de Exclusão	46

3.3 Procedimentos	46
3.3.1 Coleta	46
3.3.2 Diagnóstico Molecular do HPV	47
3.3.2.1 Extração do DNA	48
3.3.2.2 Amplificação controle do DNA.....	48
3.3.2.3 Oligonucleotídeos (<i>Primers</i>).....	50
3.3.2.4 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico do HPV	51
3.3.2.6 Seqüenciamento das amostras e identificação do HPV.....	53
3.3.2.6.1Análise das seqüências nucleotídicas.....	54
3.3.3 Determinação do Polimorfismo da proteína p53 por PCR	54
3.4Análise dos resultados	55
4. RESULTADOS	57
4.1 Detecção e Identificação de HPV por PCR	58
4.1.1 PCR controle para DNA humano	58
4.1.2 Detecção do HPV por PCR	59
4.1.3 Reação de Sequenciamento	61
4.2 Polimorfismo da proteína p53	63
4.3 Fatores sócio-econômico-culturais.....	65
5.DISSCUSSÃO	73
6.CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES	103
ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 O colo do útero

A porção inferior do útero (Figura 1) que se localiza dentro da cavidade vaginal possui uma porção interna denominada canal cervical ou endocérvice. A endocérvice é revestida por uma camada única de células cilíndricas produtoras de muco (epitélio colunar simples), estendendo-se do orifício externo à junção do seu epitélio com o endométrio. A parte externa, denominada ectocérvice, é revestida por um epitélio de várias camadas de células planas (epitélio escamoso estratificado), estendendo-se do orifício externo à reflexão do epitélio da cérvice até o fórnice vaginal (MS, 2002; SILVA FILHO; LOGATO FILHO, 2000; VINHAES, 1997).

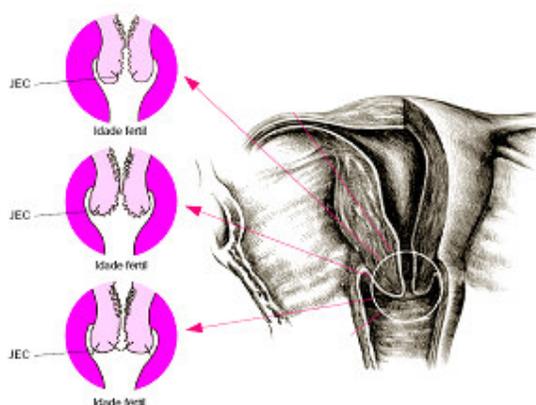


Figura 1: Colo do útero

Fonte: http://www.saude.pr.gov.br/Cancer/pdf/falando_cancer_colo_uterio.pdf. Acesso em: 28/03/2007

Entre a ecto e a endocérvice encontra-se a junção escamocolunar (JEC) (Figura 1), que corresponde à linha de demarcação entre os epitélios escamoso e colunar, a qual pode estar

localizada mais interna ou externamente, dependendo da situação hormonal da mulher (GROSS; BARRASSO, 1999; MS, 2002; VINHAES, 1997).

No período da menacme, quando ocorre produção estrogênica, a JEC situa-se ao nível do orifício externo ou para fora deste, entrando em contato com agentes agressores e/ou mutagênicos. Esta exposição gera um ambiente hostil às suas células, podendo ocorrer a transformação das células do epitélio colunar em escamosas, mais adaptadas, dando origem a um novo epitélio chamado a terceira mucosa ou zona de transformação (ZT). Nesse novo epitélio, área limítrofe entre epitélio glandular e escamoso, a possibilidade de ocorrer transformação atípica é grande. A ZT corresponde a mais de 90% dos cânceres do colo de útero e é a zona de, praticamente, todas as lesões precursoras deste câncer, área considerada como altamente suscetível à influência oncogênica (BEKKERS et al., 2004; LOGATO FILHO, 2000; MS, 2002; SILVA FILHO; VINHAES, 1997).

1.2 Lesões intra-epiteliais escamosas e câncer do colo do útero

A história natural do câncer cervical envolve alterações reversíveis no epitélio escamoso, com estágios variáveis que caracterizam os processos progressivos no desenvolvimento da neoplasia, onde lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau podem progredir a lesões de alto grau ou câncer invasor ou regredir para a condição normal (SCHIFFMAN; CASTLE, 2003; SCHLECHT et al, 2003).

O epitélio de revestimento do colo do útero é formado por várias camadas de células epiteliais pavimentosas ordenadas. As alterações nesse epitélio ocorrem desde as camadas mais basais deste epitélio até um grau de desarranjo intenso, com células alteradas invadindo o tecido conjuntivo do colo do útero no carcinoma invasor (MS, 2002).

Papanicolau e Traut foram os primeiros a demonstrar células malignas na citologia exfoliativa. Na década de 60, Richart sugeriu que o câncer cervical se desenvolveria de um estágio pré-maligno denominado neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (BEKKERS et al., 2004).

A classificação das lesões segundo a extensão do epitélio ocupada pelas células alteradas define os vários tipos de neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), cuja caracterização está representada no quadro 1.

CLASSIFICAÇÃO	ANORMALIDADES EM CÉLULAS ESCAMOSAS EPITELIAIS
NICI ou Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) ou Displasia Leve	Células epiteliais neoplásicas ocupam somente a camada basal do epitélio.
NICII ou Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) ou Displasia Moderada	Células epiteliais neoplásicas ocupam metade da espessura epitelial, preservando as camadas mais superficiais.
NICIII ou Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) ou Displasia Acentuada	Desarranjo celular acomete praticamente todas as camadas do epitélio.
NICIII ou Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) ou Carcinoma <i>in situ</i>	Toda a espessura epitelial está ocupada por células indiferenciadas.
Carcinoma invasor	Células neoplásicas indiferenciadas alcançam o tecido conjuntivo do colo do útero, abaixo do epitélio.

Quadro 1: Classificação das lesões intra-epiteliais cervicais e carcinoma invasor

Fonte: SMITH, 2002; BEKKERS et al., 2004; MS, 2002; SILVA FILHO; LOGATO FILHO, 2000; VINHAES, 1997.

À medida que as lesões progridem, além da ocupação do epitélio pelas células neoplásicas, ocorrem alterações celulares como núcleos hipercondensados e atipias celulares, apresentando uma perturbação do processo de maturação ou diferenciação celular (BEKKERS et al., 2004; SILVA FILHO; LOGATO FILHO, 2000; VINHAES, 1997)

Lesões intraepiteliais escamosas são alterações precursoras para o desenvolvimento de câncer cervical e são causadas, primariamente, por HPV (papilomavírus humano), além de vários fatores externos e genéticos que possam interferir nesse processo (BASEMAN,

KOUTSKY, 2005; BOSCH et al., 2003; FLORES et al., 2006; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003).

1.3 Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical

O carcinoma cervical tem apresentado uma distribuição mundial, com aproximadamente 500.000 mulheres desenvolvendo esta patologia em todo o mundo, a cada ano. Em países em desenvolvimento, o carcinoma cervical é uma das primeiras causas de morte em mulheres, geralmente precedido por câncer de pele e de mama (IARC, 2007; INCA, 2005a; WHO, 2005).

Em 99% das vezes, o ácido desoxirribonucléico (DNA) do HPV encontra-se presente nas pacientes portadoras de câncer cervical, principalmente os de alto risco e suas variantes não-européias, sendo esta infecção considerada um fator crucial no desenvolvimento da malignidade do epitélio cervical (BOSCH et al., 2002; FERENCZY; FRANCO, 2002; LIU et al., 2004).

A carga viral parece ter relação com o risco de desenvolver as lesões malignas do colo do útero. Healey et al. (2001) concluíram que a associação entre HPV e lesão intraepitelial escamosa (SIL) aumenta quando ocorre aumento da carga viral em um estudo numa população aborígine canadense com altas taxas de câncer cervical.

Flores et al. (2006) encontraram relação entre a carga viral e o risco de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau em mulheres do México e Estados Unidos, empregando a reação da polimerase em cadeia em tempo real (*Real Time PCR*).

Porém, segundo Wang; Hildesheim (2003), a utilidade da medida da carga viral como ferramenta de diagnóstico continua em debate, pois os dados provenientes dos estudos

epidemiológicos ainda são considerados insuficientes para confirmar a associação entre a carga viral e o risco de lesão no colo do útero.

Além do tipo de HPV envolvido, sua variante e a carga viral, o desenvolvimento e progressão até o câncer parece ter interferência de vários fatores, tais como: a) fatores sócio-econômicos e culturais, como exposição hormonal (uso de anticoncepcional, número de gestações), a idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, fumo, dieta, outras doenças sexualmente transmissíveis, b) eficiência da resposta imune e c) fatores genéticos do hospedeiro, como o haplótipo do antígeno de histocompatibilidade leucocitário – HLA - e o polimorfismo da proteína guardião do genoma, p53, descritos como relevantes no carcinoma cervical (BASEMANN; KOUSTSKY, 2005; BOSCH et al., 2002; FERENCZY; FRANCO, 2002).

Em relação ao câncer cervical, esses fatores também podem estar relacionados, promovendo a progressão da doença causada pelo HPV. Várias revisões (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005; BOSCH et al., 2002; FERENCZY; FRANCO, 2002; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003; STOREY et al., 1998; VILLA, 1997) apresentam discussões sobre a influência desses fatores sócio-econômicos-culturais na relação HPV e carcinoma cervical.

1.3.1 O papilomavírus humano (HPV)

Papilomavírus (do latim, “papilla”: pústula e “oma”: tumor) são agentes que podem acometer epitélios de diferentes hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis, sendo que os papilomavírus são espécie-específicos e podem induzir papilomas e câncer nos hospedeiros suscetíveis (BOSCH et al., 2002; DE VILLIERS et al., 2004; SANCLEMENTE; GILL, 2002; VILLA, 1997).

No homem, esses DNA-vírus apresentam tropismo por células do epitélio cutâneo-mucoso, que são células de metabolismo elevado, acometendo principalmente o trato genital feminino e masculino. Os HPV são relacionados a lesões benignas e malignas em diversas partes do corpo (BEKKERS et al., 2004; GROSS; BARASSO, 1999).

1.3.2 Classificação do HPV

Os tipos de HPV são identificados pelo grau de similaridade de seus DNAs, baseados no gene L1, que é a porção mais conservada dentro do genoma dos papilomavírus. Os papilomavírus humanos são classificados, atualmente, segundo análise filogenética baseada na comparação entre os genes L1, onde os gêneros compartilham menos de 60% de identidade de nucleotídeos (23 a 43% quando se compara gêneros de famílias *Papillomaviridae*), espécies compartilham de 60 a 70% e os tipos presentes dentro de uma espécie apresentam de 71 a 89% de identidade de nucleotídeos, onde a seqüência do gene L1 é, pelo menos, 10% diferente dos outros tipos. Os subtipos apresentam de 2 a 10% de diferença dos tipos conhecidos, baseado na seqüência de L1. Atualmente, e devido a essa redefinição, os HPV 46, HPV 55 e HPV 64 são conhecidos como subtipos dos HPVs 20, 44 e 34, respectivamente (BERNARD, 2005; DE VILLIERS et al., 2004).

Variantes de HPV tipo 16 apresentam menos de 2% de variância de nucleotídeos. Tais variantes são referidas como européia, asiática, asiático-americana, africana-1 e africana-2, baseados na região longa de controle (LCR) e no gene E5, e ainda a variante protótipo (referida como o isolado original) européia e norte-americana, com base no seqüenciamento das regiões E2, E6, L2 e L1 (BERNARD, 2005; SWAN et al., 2005).

O tipo de HPV presente no organismo parece determinar sua manifestação clínica, história e evolução das lesões. Os HPVs podem ser divididos, de acordo com o seu tropismo,

em tipos mucosos, os quais são encontrados, principalmente, no epitélio mucoso da orofaringe e trato anogenital, e tipos cutâneos, que infectam, predominantemente, a pele (BEKKERS et al., 2004). Atualmente, mais de 100 tipos virais de HPV foram isolados, onde mais de 85 destes foram identificados devido ao seu grande interesse médico. Desses, mais de 40 tipos e subtipos distintos infectam a área anogenital (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005; BERNARD, 2005; DOORBAR, 2005; LIU et al., 2004).

Segundo Munoz et al. (2003a), baseados em dados de 11 estudos caso-controle de associação entre carcinoma cervical e infecção por HPV, os diversos tipos são classificados em alto risco (15 tipos), provavelmente de alto risco (3 tipos), risco indeterminado (3 tipos) e baixo risco (12 tipos), de acordo com seu potencial oncogênico (quadro 2).

CLASSIFICAÇÃO DE RISCO	TIPOS DE HPV
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Provável alto risco	26, 53, 66
Risco indeterminado	34, 57, 83
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

Quadro 2 – Classificação e tipos de HPV

FONTE: BASEMAN; KOUTSKI, 2005; MUNOZ et al., 2003 a,b.

Os papilomavírus humanos de baixo risco estão relacionados com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau no trato genital, com raras associações a processos carcinogênicos, e os de alto risco estão associados com lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma invasivo. Os HPVs de baixo risco são, geralmente, aqueles encontrados não integrados ao genoma da célula hospedeira (epissomais), e aqueles de alto risco, relacionados com a oncogênese genital, apresentam os vírions integrados ao genoma da célula parasitada. Porém, um estudo avaliando as variações da seqüência E2 do HPV 16 por polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) parece contradizer o fato que a integração do material genético do vírus seria o pré-requisito mais importante para o desenvolvimento do carcinoma

cervical invasivo, pois das 38 amostras positivas para a forma episomal do HPV 16, 30 (79%) foram amostras de câncer cervical invasivo (SATHISH et al., 2004).

Variantes de HPV tipo 16, as quais apresentam menos de 2% de variância de nucleotídeos, são consideradas relevantes para a história natural da infecção por este vírus (DE VILLIERS et al., 2004; SWAN et al., 2005; VILLA, 1997).

Xi et al. (1997), com a finalidade de determinar a associação entre variantes de HPV 16 e risco de desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical concluíram que variantes tipo não-protótipo têm maior risco quando comparados com as variantes protótipos. Hildesheim et al. (2001), num estudo de coorte com 10.000 mulheres, revelaram que diferentes variantes de HPV16 têm potencial oncogênico distinto, sugerindo que as pacientes portadoras da variante não – européia teriam 11 vezes mais chance de serem diagnosticadas com carcinoma cervical do que aquelas portadoras da variante protótipo.

1.3.3 Estrutura genômica do HPV

O papilomavírus humano (Figura 2) é um DNA-vírus não cultivável, pertencente à família *Papillomaviridae*, formado por um pequeno capsídeo icosaédrico sem envelope e 72 capsômeros, que contém uma única molécula circular de dupla hélice de DNA, com aproximadamente 8000 pares de bases (DE VILLIERS et al., 2004; MUNOZ et al., 2003a).

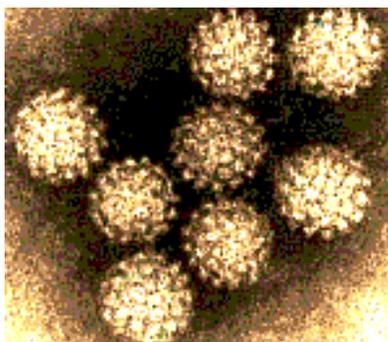


Figura 2: Papilomavírus humano.

FONTE: <<http://www.hpv.cervix.cz.charakteristika-viru.html>>.. Acesso em: 10/05/2007.

O tamanho do HPV, considerado pequeno, contrapõe-se ao seu complexo perfil molecular. Seu genoma (Figura 3), estudado a partir de HPVs de alto risco, principalmente o HPV 16, considerado causa primária de carcinoma cervical, está organizado em três regiões: uma região modulatória LCR (região longa de controle ou *long control region*), região precoce (E, *early*) e a região tardia (L, *late*). As regiões E e L foram assim designadas considerando suas expressões no ciclo de vida do vírus, onde a região E é responsável por processos iniciais, e L, responsável pelas etapas finais da replicação do vírus (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002; SCHIFFMAN et al., 2005; SOLIMAN et al., 2004).

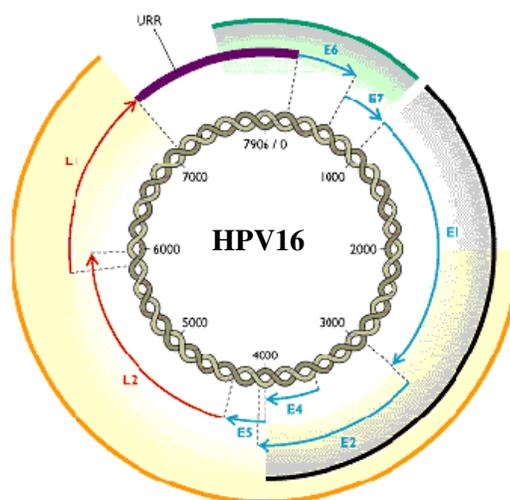


Figura 3: Genoma do HPV.

FONTE: <http://www.pkzr.ac.bialystok.pl/rysunki/genom.gif>. Acesso em: 02/05/2007.

A região LCR contém a origem de replicação viral e elementos responsivos transcricionais que regulam a expressão do gene do HPV. A região E contém 6 genes: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (Quadro 3). As proteínas E1 e E2 são codificadas pelos genes E1 e E2, que modulam a replicação e transcrição, sendo proteínas regulatórias, enquanto que os genes E6 e E7 são considerados como de potencial patogênico ligados a HPV de alto risco (DE VILLIERS et al., 2004; SOLIMAN et al., 2004; VILLA, 1997).

A região tardia apresenta dois genes, L1 e L2, com seqüências altamente conservadas em todos papilomavírus. As proteínas L1 e L2, codificadas, respectivamente, pelos genes L1 e

L2, constituem as proteínas estruturais, que compõem o capsídeo viral (Quadro 3) (de VILLIERS et al., 2004).

O DNA viral pode estar integrado ou não ao DNA da célula hospedeira, freqüentemente próximo de um proto-oncogene. Certas proteínas do interior do vírion, como E6 e E7, podem eliminar a repressão sobre os proto-oncogenes e promover a anarquia celular, determinando graves lesões epiteliais (DOORBAR, 2005; GROSS; BARASSO, 1999).

GENES	FUNÇÃO
E1	Atividade DNA helicase, atividade de ATPase, papel na replicação e na repressão da replicação
E2	Regulador da transcrição e replicação viral, controle da expressão do gene da região viral inicial, necessário para eficiente replicação viral, juntamente com E1.
E4	Expresso como gene tardio na diferenciação do epitélio, papel na infecção produtiva, associado com o citoesqueleto de queratina de células epiteliais cultivadas, etc.
E5	Provavelmente estimula proliferação inicial de células <i>in vivo</i> , mas pode ter papel na iniciação da carcinogênese.
E6	Papel no processo de transformação juntamente com E7. Propriedades de ativação transcricional. E6 de HPVs de alto risco inativa p53 por indução de sua degradação. Juntamente com E7, proporciona um ambiente para a replicação do DNA viral.
E7	Propriedades de transativação similares ao do promotor E2 do adenovírus, induz síntese de DNA em células quiescentes, papel na transformação celular em cooperação com o oncogene <i>ras</i> ativado. E7 se liga à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRB), resultando em sua inativação funcional, permitindo a progressão celular para a fase S do ciclo celular. Proteínas E7 dos HPVs de baixo risco tipo 6 e 11 se ligam menos eficientemente do que as proteínas E7 de HPVs de alto risco (tipos 16 e 18).
L1	Proteína do capsídeo principal.
L2	Proteína do capsídeo.

Quadro 3 – Genes relacionados ao HPV e funções.

FONTE: SANCLEMENT; GILL, 2002; SOLIMAN et al., 2004.

1.3.4 Transmissão do HPV

Estudos têm mostrado que a maioria das mulheres sexualmente ativas (acima de 50%) foi infectada por um ou mais tipos de HPV genital alguma vez (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005).

Os HPV anogenitais são reconhecidamente transmitidos via sexual, provavelmente através de gotículas microscópicas na superfície do epitélio durante a relação sexual, por contato epitélio-epitélio vaginal, oral ou anal (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003).

A transmissão também pode se dar por vias não-sexuais, como na transmissão vertical pela mãe-feto e durante o nascimento - responsável pela papilomatose do recém-nascido; a transmissão horizontal por outros membros da família, principalmente os que mantêm contato mais íntimo com crianças; autoinoculação de um sítio para outro e por fômites. Porém, tais rotas têm um impacto muito menor do que a via sexual (GROSS; BARASSO, 1999; KOSS; GOMPEL, 1997; RINTALA et al., 2005; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003; TSENG et al., 2002).

Contato íntimo não-sexual, atividade sexual não-penetrativa e uso de tampões também são propostos para infecção cervical por HPV (FRANCO et al., 1995).

1.3.5 Epidemiologia do HPV

Está bem estabelecido que o HPV esteja presente na maioria dos carcinomas cervicais e está associado a lesões pré-malignas (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005).

Considerando somente o HPV, este agente parece ser responsável por quase 11% de todos os casos de câncer femininos em todo o mundo, sendo que os casos de carcinoma associados ao HPV excedem a cifra de um milhão (MONSONEGO, 2005).

Estimativas para o futuro, em 2050, apontam para um quadro onde existirão 1.090.000 novos casos de câncer cervical por ano (WHO, 2005). Isso seria duplicar o número de casos anuais nos próximos 50 anos, se nada for feito para combater essa doença, sendo que a maioria desses novos casos será detectada nos países em desenvolvimento (MONSONEGO, 2005; SOLIMAN et al., 2004).

No mundo, o carcinoma cervical é a segunda causa mais comum de câncer feminino, com uma mortalidade de 288.000 mulheres por ano. Dessa totalidade, 80% das mortes estão concentradas em países em desenvolvimento, principalmente nas regiões mais pobres como África, América Latina e Ásia (IARC, 2007; WHO, 2005).

No Brasil, um estudo conduzido por Cavalcanti et al. (1999) analisou a presença de HPV pela técnica de hibridização *in situ* em biópsias de pacientes com carcinoma cervical e detectou a prevalência deste vírus em 55,2% das amostras. Nesse estudo, HPVs de alto risco foram detectados em 80,5% das pacientes com lesões progressivas acompanhadas durante 8 anos. Estudo multicêntrico realizado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) envolvendo o Brasil detectou de 75 a 100% de prevalência de DNA de HPV em amostras de câncer cervical, por técnica de reação da polimerase em cadeia, aumentando ainda mais a prevalência quando se utilizou oligonucleotídeos mais sensíveis (GP5+ e GP6+) (BOSCH et al., 1995).

O câncer cervical ocupa o terceiro lugar no Brasil, sendo superado somente pelo câncer de pele e de mama. Dentre os estados brasileiros, o Amazonas encontra-se em segundo lugar em taxas nacionais de mortalidade por câncer cervical, alteração maligna responsável por acometer mais de 50% dos casos de neoplasias em mulheres no estado (IARC, 2007; INCA, 2007; WHO, 2005).

Em Manaus, estudo de prevalência de HPV realizado por Castro (2002) detectou 32 amostras positivas (39,28%) para o DNA de HPV, através da PCR, utilizando os

oligonucleotídeos MY09 e MY11, em 83 pacientes com diagnóstico citológico sugestivo de lesões intra-epiteliais de baixo e alto grau e câncer invasor do colo uterino, atendidas na Fundação Centro de Oncologia do Amazonas (FCECON - AM).

Souza (2004), estudando mulheres HIV positivas atendidas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, detectou o DNA do HPV em 14,2% das amostras cervicais através da técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos MY09 e MY11 .

Estudo recente de Corrêa (2005) analisou amostras de mulheres com carcinoma cervical, encontrando 100% (n = 42) de prevalência do DNA do HPV. Esse estudo evidenciou tipos de HPV de alto risco em algumas amostras seqüenciadas, utilizando PCR com oligonucleotídeos MY09 e MY 11, seguido de *Nested-PCR* com oligonucleotídeos GP5+ e GP6+.

A infecção por HPV acomete, principalmente, mulheres jovens, com pico após iniciação sexual (mulheres com idade inferior a 25 anos), diminuindo a prevalência na faixa de 35–54 anos, e um segundo pico depois dos 55 anos, talvez por reativação de vírus latente (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005).

A incidência de HPVs de alto risco, considerados oncogênicos, parece ser maior do que com tipos de baixo risco (BASEMAN; KOUSTSKY, 2005; FRANCO et al., 1999). Um estudo realizado em São Paulo (FRANCO et al., 1999) encontrou resultados que confirmam o destaque da incidência viral para tipos de alto risco.

Em pacientes com carcinoma cervical, mais de 85% apresentam por volta de 15 tipos de HPVs, sendo os tipos 16 e 18 os mais identificados. Esses tipos, 16 e 18, representam 54% e 17% dos achados, respectivamente (MUNOZ et al., 2003a; BOSCH et al., 2002; ZEHBE; WILANDER; 1997). O estudo de Singh et al. (2004) encontrou 90% (n=50) dos tumores cervicais positivos para HPV, onde o HPV 16 foi encontrado em trinta amostras e HPV 18 em cinco. A associação entre o DNA do HPV em amostras cervicais e câncer cervical é uma das

mais fortes já observadas para o câncer humano, independente de outros fatores de risco e bastante consistente (BOSCH et al., 2002; FERENCZY; FRANCO, 2002; SINGH et al., 2004).

Infecções por HPV precedem lesões pré-malignas e câncer cervical por alguns anos. Porém, como somente algumas mulheres com infecção persistente por HPV irão desenvolver o câncer cervical, a infecção sozinha, provavelmente, não é uma condição precursora suficiente para o desenvolvimento da doença. A persistência viral associada a fatores sócio-econômicos, culturais, genéticos e imunológicos podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da malignidade (BOSCH et al., 2002; FERENCZY; FRANCO, 2002; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003; VILLA, 1997).

1.3.6 Ciclo de vida e oncogênese

A infecção pelo HPV ocorre através da penetração do vírus no epitélio, a partir de camadas basais e parabasais, o que, para alguns tipos de HPV, seria necessário um dano no epitélio estratificado, através de abrasões ou microtraumas, como no contato sexual (DOORBAR, 2005; GROSS; BARASSO, 1999).

A entrada do vírus nas células ocorre por ligações a receptores da superfície celular, onde se sugere que a α -6-integrina e o sulfato de heparan possam exercer papel importante nesta ligação (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

A liberação do HPV no interior da célula pode ser facilitada pela quebra das ligações dissulfídicas intracapsoméricas no meio ambiente reduzido da célula, permitindo o transporte do DNA viral para o núcleo (DOORBAR, 2005; LI et al., 2004).

Após penetração e liberação do vírus na célula infectada, o ciclo de vida do HPV pode apresentar fase não produtiva ou de manutenção do genoma, e fase produtiva ou

proliferativa, ligados à diferenciação dos queratinócitos (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

1.3.6.1 Fase não-proliferativa ou manutenção do genoma

Após a entrada do vírus na célula, ocorre a manutenção do genoma viral, o qual permanece na forma episomal e em pequeno número de cópias (10-200 cópias por célula) nas células basais e parabasais do epitélio (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

Nessa fase, o modelo de expressão genética viral não está bem definido, mas há consenso que as proteínas virais E1 e E2 seriam suficientes para manter o DNA viral na forma episomal (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

As células infectadas deixam a membrana basal para diferenciarem-se. Essa fase é conhecida como estágio proliferativo do ciclo de vida, ocorrendo da metade do epitélio até as camadas superficiais (DOORBAR, 2005).

1.3.6.1.1 Amplificação do genoma viral

A multiplicação celular impede a replicação autônoma do vírus. Num epitélio normal, as células basais cessam o ciclo celular, não mais se multiplicam, migrando para a camada suprabasal e chegando à superfície, em um processo de diferenciação terminal e queratinização (DOORBAR, 2005; MIDDLETON et al., 2003).

Para a produção de vírions infecciosos, o HPV necessita amplificar seu genoma viral, o que ocorre na camada média ou superior do epitélio, principalmente para o HPV 16 (DOORBAR, 2005). Para isso, ocorre um aumento da atividade do promotor tardio, o qual se encontra dentro da região aberta de leitura (ORF) do gene E7 e acredita-se que sua

superregulação conduza a um aumento na expressão de proteínas envolvidas na replicação do DNA viral (E1, E2, E4 e E5), sem necessariamente afetar a expressão de E6 e E7. A ligação de E2 à região regulatória do HPV se faz necessária para a replicação viral, recrutando a E1 DNA helicase para a origem viral de replicação. O complexo de iniciação E1-E2 se agrega na origem viral e permite a replicação do genoma viral sem que ocorra a síntese do DNA celular. Os mecanismos moleculares que levam à ativação do promotor tardio e superregulação da expressão de E1 e E2 ainda estão sendo desvendados, mas é possível que o promotor encontre-se ativo em todos os estágios durante o ciclo produtivo (DOORBAR, 2005; VILLA, 1997).

1.3.6.1.2 Síntese viral

Após a completa amplificação do genoma, o HPV codifica duas proteínas estruturais, L1 e L2, presentes somente na camada superficial do epitélio, nos queratinócitos diferenciados (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

As proteínas estruturais do capsídeo viral, L1 e L2, são produzidas na camada de células que expressam E4, sendo codificadas pelos genes L1 e L2 (DOORBAR, 2005; VILLA, 1997).

Após a síntese de L1 e L2, estas proteínas são direcionadas ao núcleo celular. A proteína do capsídeo principal, L1, é expressa posteriormente a L2, permitindo assim a agregação de partículas infecciosas na camada superior do epitélio (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

HPVs não são liberados até que as células epiteliais infectadas cheguem à superfície epitelial. O produto do gene E4 parece contribuir na maturação e liberação viral, onde as proteínas virais poderiam inibir a expressão de marcadores de diferenciação, prevenindo a

formação de escamas cornificadas normais, perturbando a integridade da queratina e afetando a agregação do envelope cornificado da camada do epitélio (DOORBAR, 2005; VILLA, 1997).

Papilomavírus não lisam as células infectadas e necessitam sair e sobreviver no meio extracelular antes de reinfectarem nova célula. A sobrevivência extracelular parece aumentar quando o HPV é liberado da superfície epitelial dentro de uma escama córnea (DOORBAR, 2005; VILLA, 1997).

1.3.6.2 Fase proliferativa

Em células basais, durante a infecção pelo HPV, E7 e talvez E6 são expressas nestas células, reprimindo o desenvolvimento do ciclo celular e retardando a diferenciação celular normal. Isso resulta em atraso na diferenciação celular, o que pode induzir hiperplasia e, em

No ciclo celular, quatro estágios estão presentes: Fase G1 (gap 1), com o aumento de tamanho celular; Fase S (Síntese), onde ocorre a replicação do DNA, com duplicação dos cromossomos; Fase G2 (gap 2): a célula prepara-se para a mitose; Mitose (M), ocorre a divisão celular, onde uma célula mãe divide-se em duas células filhas idênticas (CLARKE; CHETTY, 2001).

Nestes estágios do ciclo celular, proteínas atuam estimulando ou inibindo processos: as proteínas pRB (proteína do retinoblastoma), p53 (proteína responsável pela apoptose) e o p21 (ou waf-1) exercem papel de regular o ciclo celular, pelo controle da transcrição celular dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular e na proliferação celular, em geral (DOORBAR, 2005; SOLIMAN et al., 2004).

A proteína pRB, produto do gene RB, interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular, inibindo a transcrição induzida por E2F (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

A p53, produto do gene 53, impede a transcrição de alguns genes celulares. É chamada de guardião do genoma por seu efeito maior de supressão do tumor devido à ativação transcricional dos genes que mantêm a estabilidade genômica. Caso ocorra dano celular, a p53 ativa a expressão de proteínas como p21 e bax, levando a uma interrupção de G1 e deixando de induzir a apoptose (GROSS; BARASSO, 1999; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

A p21, também denominada waf-1 ou Cip-1, é uma proteína inibidora das CDKs (quinases ciclina-dependentes) necessárias para a progressão do ciclo celular, também interagindo com o antígeno de proliferação nuclear da célula (APNC). Tais interações bloqueiam a síntese replicativa do DNA, culminando com interrupção de G1, permitindo à célula reparar o DNA danificado, ou até induzindo a apoptose, segundo a expressão do gene BAX, ativado pela p53 (DOORBAR, 2005; SOLIMAN et al., 2004).

Um papel essencial na carcinogênese estimulada pelo HPV seria, mais do que a mutação dos genes RB e 53, a inativação do produto destes genes, ou seja, a inativação das proteínas nucleares pRB e p53, fazendo com que o ciclo celular não seja interrompido e não ocorra a apoptose (GROSS; BARASSO, 1999; SOLIMAN et al., 2004).

alguns casos associados a HPVs de alto risco, conduzir a crescimento celular anormal (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

Quando o HPV está associado com lesões benignas, geralmente o genoma viral encontra-se na forma episomal, replicando-se separadamente do DNA do hospedeiro. Porém, na maioria das lesões malignas, o DNA viral integra-se no genoma da célula hospedeira, resultando na persistência viral por anos, aumentando o risco de câncer, embora formas episomais e integradas possam coexistir (BOSCH et al., 2002; KNEBEL-DOEBERITZ, 2002; RIVOIRE et al., 2001; SANCLEMENTE; GILL, 2002; WANG; HILDESHEIM, 2003). Sathish et al. (2004) encontraram HPV na forma episomal em amostras com diagnóstico de carcinoma cervical invasivo, com a seqüência E2 intacta comparada com as amostras integradas. Esse fato sugere que a integração não deva ser o pré-requisito mais importante para conduzir à malignidade.

As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 de HPVs de alto risco estão diretamente envolvidas na transformação celular, onde variações no potencial carcinogênico são governados, principalmente, por estas proteínas. E6 e E7 interagem, alteram ou destroem moléculas regulatórias do ciclo celular viral (BOSCH et al., 2002; VILLA, 1997).

1.3.6.2.1 O papel das proteínas E6 e E7 na oncogênese

As proteínas E6 e E7 são produtos dos genes E6 e E7, respectivamente, sendo transcritos pelo mesmo promotor viral, originários de um ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) policistrônico. Ambos E6 e E7 apresentam funções que estimulam e regulam o ciclo celular (Figura 4) (DOORBAR, 2005; VILLA, 1997).

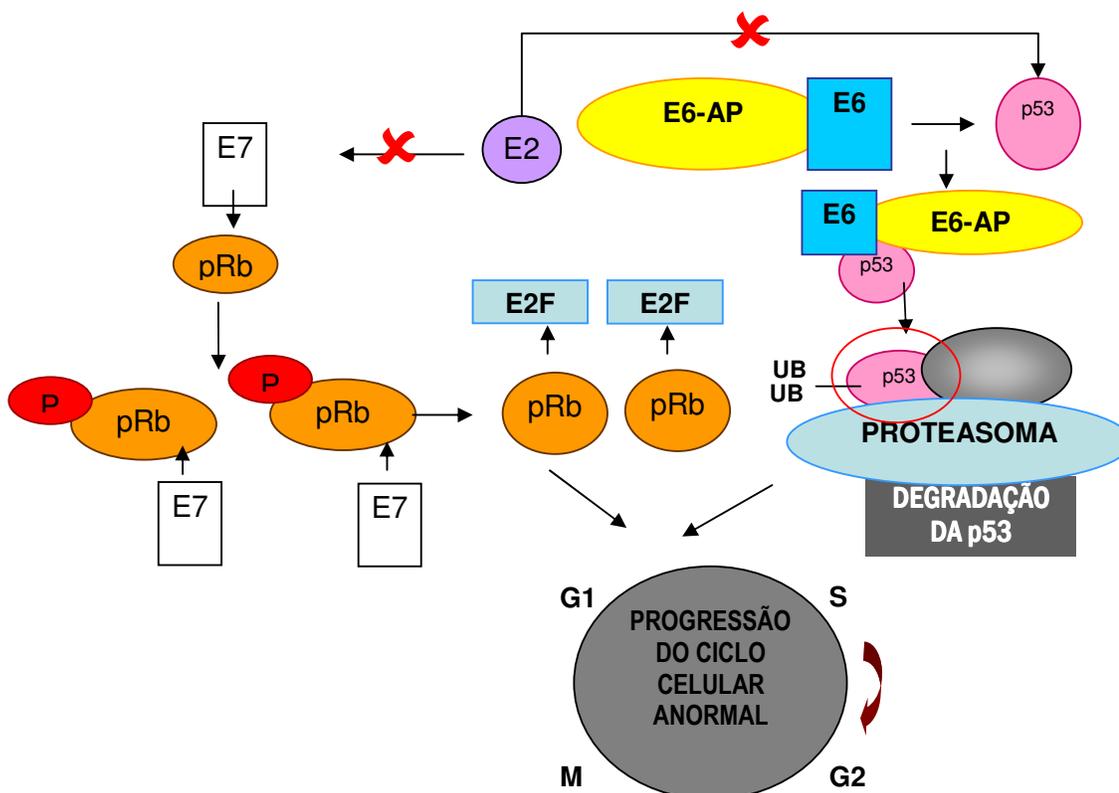


Figura 4: Mecanismo de oncogênese envolvendo as proteínas E6 e E7 do HPV
 FONTE: STERLING; TYRING, 2001.

A proteína E7 tem sido associada com alterações da replicação do DNA em células do hospedeiro, permitindo a síntese do DNA viral em células diferenciadas. Para tal, a expressão de E7 resulta na ativação de genes celulares que são regulados pela família de fatores de transcrição E2F, que incluem DNA polimerase- α , deidrofolato redutase, timidina cinase, ciclina E, dentre outras. Em células normais, a ativação do fator de regulação da E2F é regulada por um sistema de ciclinas cinases-dependentes, com fosforilação da pRb e outras proteínas, como p107 e p130. Com a ligação de E7 à pRB, fosforila-se a pRB, ocorre liberação do E2F do complexo repressor transcricional pRB/E2F, ativação da E2F como ativador transcricional de um grupo de genes necessários para a replicação do DNA, promovendo as células da fase G1 para a fase S do ciclo celular (KNEBEL-DOEBERITZ, 2002; DOORBAR, 2005).

No entanto, a ativação inapropriada da proliferação do ciclo celular dá início à maquinaria de morte celular e induziria à apoptose em células afetadas, resultando em multiplicação menos efetiva do HPV nas células do hospedeiro. Para contornar essa situação, o vírus desenvolveu uma maquinaria celular para fins de prevenir apoptose prematura, mediada pelo produto do gene E6, a proteína E6 (KNEBEL-DOEBERITZ et al., 2002).

Sendo assim, a proteína viral E6 complementa a função da proteína E7, prevenindo a indução de apoptose em resposta à entrada não-programada na fase S, mediada por E7 (DOORBAR, 2005).

As funções de transformação de E6 estão associadas com sua interação com uma variedade de produtos de genes celulares. O primeiro alvo identificado da proteína E6 viral foi a proteína p53 (BOSCH et al., 2002; DOORBAR, 2005).

A função principal da oncoproteína E6 é a destruição da p53, via ubiquitina, a qual, na célula normal, aumenta sua expressão após ocorrência de dano ao DNA, aprisionando o ciclo celular na fase G1 para reparo no material nucléico ou, se não for possível, morte programada – apoptose (DOORBAR, 2005; SOLIMAN et al., 2004). A proteína E6 do HPV 16 se liga a uma proteína celular de 100 kiloDaltons (kDa) denominada proteína associada a E6 (E6AP), a qual apresenta funções como uma proteína ligase de ubiquitina. O complexo E6/E6AP se liga à região central da p53, a qual se torna rapidamente ubiquitinizada e sinalizada para os proteasomas (figura 4). Como a p53 tem um papel importante na proteção da integridade do genoma, células que expressam E6 mostram instabilidade cromossômica, a qual aumenta enormemente a probabilidade que as células infectadas pelo HPV se tornem malignas (TOMASINO et al., 2003).

A proteína E6 também interage com fatores envolvidos na regulação da transcrição e replicação do DNA, na regulação da apoptose, com fatores que regulam a organização e

diferenciação do epitélio e com fatores envolvidos na interação célula-célula (KNEBEL-DOEBERITZ, 2002).

E6 também pode associar-se a outras proteínas pró-apoptóticas, como Bak e Bax, o que faz com seja considerada um fator predisponente ao desenvolvimento de câncer, permitindo a acumulação de possíveis erros que não são detectados na célula do hospedeiro (DOORBAR, 2005).

O desenvolvimento da malignidade parece ser consequência de uma interação aberrante entre vírus e hospedeiro, como na regulação da expressão de E6 e E7, onde, em lesões de baixo grau, a expressão destas proteínas é encontrada em células que estão se diferenciando. Já em lesões de alto grau e câncer cervical, a forte expressão de E6/E7 é encontrada nos compartimentos celulares em proliferação (BOSCH et al., 2002). O impacto do HPV na regulação do ciclo celular é devastador, resultando, segundo Clarke e Chetty (2001), em uma vantagem crescente e um desvio calculado de numerosos mecanismos de *feedback* regulatórios. A replicação viral e a expressão dos genes controlados pelo vírus resultam em imortalização dos queratinócitos com enfraquecimento dos pontos cruciais de regulação em G1-S e G2-M.

1.3.6.2.2 A proteína p53

Sherr (2004), em seu artigo sobre os princípios da supressão tumoral, faz uma revisão sobre o histórico das pesquisas envolvendo a proteína p53. O autor relata:

Linger e Lavine, Lane e Crawford, em 1979 foram os primeiros a detectar a p53 em complexos com antígenos SV40T.

Oren e Levine, em 1983, clonaram o DNA complementar (cDNA) da p53 das células transformadas SV40, e revelaram que esta proteína poderia colaborar com o mutante *Ras* para transformar fibroblastos embrionários de rato. Dessa forma, poder-se-ia concluir que a p53 seria um oncogene imortalizante, que como *Myc*, poderia colaborar com *Ras* para transformar células primárias de roedores.

Estudos conduzidos posteriormente encontraram a p53 inativada na eritroleucemia, sendo assim detectada em algumas doenças virais *in vivo*, embora ainda não houvesse maiores entendimentos sobre a implicação desta forma.

Esclarecimentos foram obtidos quando o cDNA da p53 de camundongo falhou em auxiliar *Ras* no ensaio de cotransformação, e, quando mutada, formou foco de células transformadas.

Finlay e seus colaboradores, em 1989, demonstraram que a p53 agiria como supressora de transformação, na sua forma selvagem, normal.

Análises dos alelos em alguns tipos de câncer sugeriram que mutações poderiam diminuir a força de direcionamento da proteína, bem como ser um fator genético causal.

Posteriormente, revelou-se que a p53 selvagem seria uma seqüência específica de ligação ao DNA, sendo induzida no dano ao material genético, causando o aprisionamento do ciclo celular na fase G1. Essa proteína exerceria função de controle, livrando a célula de lesão genotóxica.

Atualmente, a p53 é considerada como fator de transcrição homotetramérico, sendo ativada em resposta a muitas formas de estresse, como irradiação, hipóxia, dano genotóxico induzido por drogas e ativação oncogênica, contrariando a proliferação celular e, mais dramaticamente, induzindo a apoptose (CHO et al., 2003; SHERR, 2004, TOMASINO et al., 2003).

Mutações no gene P53 são encontradas em mais de 50% dos casos de câncer humano resultando em falhas na produção normal da proteína p53 (KAELIN JR, 1999; THOMAS et al, 1999b). As referidas mutações apresentam vários padrões como *missense*, resultando na

produção da proteína alterada, mutação em *clusters*, entre aminoácidos 130 e 290 e mutações *hot spots*, afetando resíduos 175, 248 e 273 (LEVINE et al., 1991).

O gene P53 está comumente no tipo selvagem em carcinomas cervicais, indicando que a inativação da p53 pela E6 do HPV provavelmente exerça um papel crucial no desenvolvimento da malignidade, sugerindo que o efeito de E6 na proteína é análogo a uma mutação inativante, ou seja, ambos os mecanismos produzem à ausência de função do produto do gene P53 (CHO et al., 2003; SHERR, 2004, THOMAS et al., 1999a; TOMASINO et al., 2003).

Nas infecções pelo HPV, a proteína E6 viral tem a função de se ligar à proteína supressora de tumor p53, degradando-a via ubiquitina (Figura 5) (BRENNNA et al., 2004; DOORBAR, 2005; TOMASINO et al., 2003). A p53 é um ponto de controle que regula a divisão celular, assegurando a conclusão de eventos dependentes e providenciando mais tempo para o reparo do DNA antes da sua replicação e mitose. Essa é uma das mais importantes proteínas no sistema de defesa humano contra o desenvolvimento do tumor, sendo que algumas variantes do HPV 16 estão sendo associadas a maior habilidade de degradação da p53 (BRENNNA et al., 2004; CHO et al., 2003; SETTHEETHAN-ISHIDA et al., 2004; TOMASINO et al., 2003).

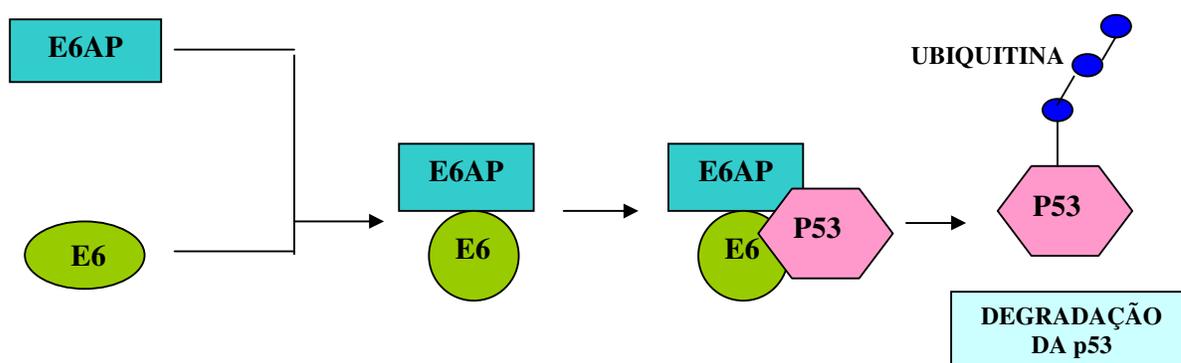


Figura 5: A proteína E6 do HPV de alto risco promove a degradação da p53 via ubiquitina.
 FONTE: TOMASINO et al., 2003.

Uma substituição de base no códon 72 da p53 resultando em ou arginina (*Arg* - CGC) ou prolina (*Pro* - CCC) foi identificada como sendo um polimorfismo na população humana, sendo ambas as formas detentoras de atividade biológica. No entanto, foi proposto que as duas variações da p53 no códon 72 contribuíssem distintamente para o desenvolvimento do câncer cervical, pois diferenças bioquímicas e biológicas entre as proteínas p53 polimórficas indicam presença de interações distintas entre estas e a proteína E6 do HPV (THOMAS et al., 1999b; TOMASINO et al., 2003).

Dumont et al. (2003), estudando linhagens celulares com proteínas p53 polimórficas, constataram que as variantes contendo arginina induziam apoptose mais eficientemente que as

varinates prolina, reforçando a diferença na função entre as formas polimórficas, o que pode ter impacto no risco de câncer e no tratamento.

Na população, a distribuição do polimorfismo da proteína p53 códon 72 parece apresentar uma frequência relacionada à etnia, mantida por seleção natural, segundo Beckman et al. (1994), onde negros americanos, africanos e indianos apresentaram frequência do polimorfismo Pro acima de 60% e caucasianos apresentaram maior frequência do polimorfismo Arg.

No Brasil, Drummond et al. (2002), num estudo em pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral, encontraram 40,2% de Arg/Arg, 54,8% Arg/Pro e 4,9% Pro/Pro; Brenna et al. (2004) revelou uma frequência predominante de 67% para o homozigoto Arg/Arg e 33% para o polimorfismo Arg/Pro. Santos (2007) encontrou a frequência de 37,9% Arg/Arg, 37,9% Arg/Pro e 24,2% Pro/Pro num estudo caso controle em Manaus, Amazonas, analisando o polimorfismo da proteína p53 em pacientes com câncer da cavidade oral.

Estudos *in vitro* realizados por Storey et al. (1998) demonstraram que a forma Arg homozigota da p53 foi 7 vezes mais suscetível de ser degradada pela proteína E6 do HPV quando comparada com a forma Pro, onde a inativação da p53Arg ocorre mais facilmente.

Vários estudos descritos a seguir revelaram o polimorfismo Arg/Arg como de risco aumentado para o desenvolvimento do câncer cervical.

Zehbe et al. (1999), em dois estudos europeus distintos do tipo coorte, considerando mulheres com lesão de baixo grau, alto grau e carcinoma cervical invasor, onde foram analisadas 94 italianas e 170 suíças, reportaram uma associação significativa da p53 Arg/Arg com o risco de infecção persistente pelo HPV e câncer cervical.

Estudo caso controle realizado na Grécia (AGORASTOS et al., 2000), com 88 mulheres com lesão de alto grau e carcinoma invasor comparadas com mulheres saudáveis

mostrou forte evidência que p53 *Arg/Arg* códon 72 possa conferir maior suscetibilidade a lesão de alto grau e carcinoma invasivo associados ao HPV. Similarmente, o estudo de Dokianakis; Spandidos (2000) sugeriu que a homozigotidade da p53 *Arg* poderia representar potencial fator de risco para a tumorigênese da cérvix. No Brasil, um estudo caso controle conduzido em João Pessoa, Paraíba (MAKNI et al., 2000) revelou um risco de câncer cervical aumentado em mulheres com p53 *Arg/Arg*. Esse risco aumentou principalmente após exclusão de todos os diagnósticos discordantes, já que estavam avaliando a variação interlaboratorial da determinação do polimorfismo da p53. Essa variação laboratorial, conforme Makni et al. (2000) foi apontada como possível forma de mascarar ou subestimar a associação entre o polimorfismo da p53 e o câncer induzido por HPV, devido ao erro de classificação da variação do aminoácido desta proteína.

Vários outros estudos (ARBEL-ALON et al., 2002; KLUG et al., 2001; ZEHBE et al., 2001) corroboram com os resultados dos estudos mencionados anteriormente.

Uma metanálise conduzida por Jee et al. (2004) analisou 37 estudos caso controle para verificar a relação entre o polimorfismo da proteína p53 e o câncer cervical entre os anos de 1998 e 2002. Segundo o estudo, a forma homozigota *Arg/Arg* da proteína p53 códon 72 foi associada com, aproximadamente, 20% de risco para carcinoma cervical quando comparada com *Pro/Arg*. Em relação ao adenocarcinoma, o risco aumentou para 50% quando comparado com o polimorfismo *Pro/Pro*, fato que não foi confirmado em análises anteriores.

Outras pesquisas (HAWS et al., 2005; LI et al., 2004; KIM et al., 2000; TANARA et al., 2003; WONG et al., 2000) obtiveram resultados que não apontaram o polimorfismo da p53 como fator de risco para o câncer cervical associado ao HPV.

Desta forma, o conhecimento de fatores sócio-econômico-culturais e genéticos da população poderia contribuir para melhor entendimento da infecção pelo HPV e da

suscetibilidade para o câncer cervical, o que poderia ser investigado na nossa região, a qual apresenta o câncer cervical como a primeira causa de câncer entre as mulheres.

2. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o polimorfismo da proteína p53 e a infecção pelo HPV em pacientes com lesões cervicais pré-cancerosas ou cancerosas atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas, Manaus.

3.2 Objetivos específicos:

- 3.2.1 Estudar a frequência de HPV nas pacientes estudadas.
- 3.2.2 Identificar o tipo de HPV infectante.
- 3.2.3 Estudar o polimorfismo da proteína p53.
- 3.2.4 Analisar a distribuição do polimorfismo da proteína p53 na população estudada.
- 3.2.5 Levantar os fatores sócio-econômico-culturais que possam estar relacionados às lesões cervicais e ao câncer nas pacientes estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo de Estudo

Estudo descritivo transversal, que visou investigar a frequência do polimorfismo da proteína p53 e da infecção pelo HPV em pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON-AM), em Manaus.

3.2 Universo de estudo

3.2.1 População de Referência

O estudo teve como alvo a população de mulheres residentes no estado do Amazonas (AM), atendidas na rede pública de referência para lesões pré- malignas ou malignas do colo do útero, FCECON-AM.

3.2.2 População de Estudo

Foram estudadas mulheres com suspeita citológica e clínica, posteriormente confirmada por diagnóstico histopatológico de lesão pré-maligna ou maligna do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor e Adenocarcinoma) que foram atendidas na triagem do Serviço de Ginecologia da FCECON-AM localizada na cidade de Manaus, Amazonas, no período de janeiro de 2006 a julho de 2006. As mulheres foram convidadas a participar do estudo, recebendo explicações sobre os objetivos, benefícios e riscos da pesquisa e, as que

concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e responderam ao questionário (Apêndice B).

3.2.3 Amostra

Foi coletado o material cervical de todas as mulheres participantes do presente estudo, no período de janeiro a julho de 2006, totalizando 164 mulheres.

3.2.4 Critérios de Elegibilidade

3.2.4.1 Critérios de Inclusão

Mulheres residentes no Estado do Amazonas há, pelo menos, dois anos.

Mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão pré-malignas ou malignas do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor e Adenocarcinoma).

Mulheres que aceitaram participar da pesquisa através da assinatura do TCLE.

3.2.4.2 Critérios de Exclusão

Mulheres que já fizeram conização ou histerectomia total.

Mulheres indígenas.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Coleta

A coleta do material cervical das pacientes com lesão pré-malignas ou malignas do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor ou Adenocarcinoma) foi realizada na FCECON-AM, sendo executada por um médico ginecologista, após concordância da paciente e assinatura do TCLE (Apêndice A), as quais foram previamente submetidas às perguntas do questionário (Apêndice B). As amostras foram coletadas da endocérvice das mulheres participantes com escova cervical descartável tipo *cito-brush*, sendo transferidas para um microtubo descartável de 1,5 mL contendo 400 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM), o qual foi hermeticamente fechado. As amostras foram mantidas em banho de gelo até serem encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sendo armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA e execução dos procedimentos da PCR.

As coletas das amostras do presente estudo somente iniciaram após a aprovação no Comitê de Ética da FCECON-AM (ANEXO 2), obedecendo à legislação que estabelece as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, a Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 e suas atualizações.

Os resultados do diagnóstico molecular do HPV e o polimorfismo da p53 foram encaminhados ao médico responsável pela paciente.

3.3.2 Diagnóstico Molecular do HPV

As etapas executadas no laboratório de Diagnóstico Molecular estão organizadas no fluxograma a seguir:

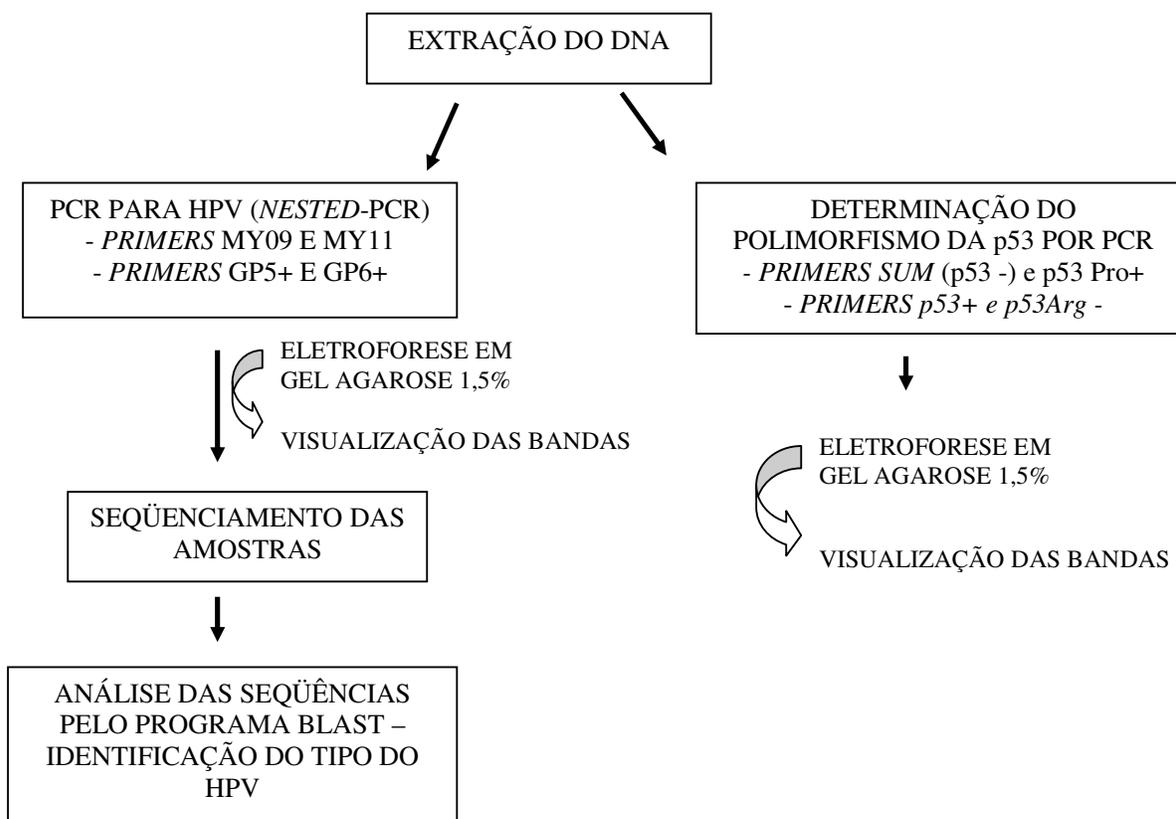


Figura 6: Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM.

3.3.2.1 Extração do DNA

As amostras mantidas a -20°C foram colocadas à temperatura ambiente para a posterior execução da extração do DNA. Para a extração do DNA, foram adicionados $400\ \mu\text{L}$ de TPK em cada microtubo de cada amostra coletada. A solução de TPK consistiu em uma mistura de $900\ \mu\text{L}$ de TE, $100\ \mu\text{L}$ de Tween 20 a 20% e $20\ \mu\text{L}$ de proteinase K $10\ \text{mg/mL}$. Essa mistura foi levada ao banho-maria a 55°C por 1 hora e depois fervida por 10 minutos (BAUER; MANOS, 1998). Em seguida, as amostras contendo sangue foram submetidas à extração por fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Após o procedimento de extração, as amostras foram processadas para o diagnóstico molecular ou mantidas a -20°C .

3.3.2.2 Amplificação controle do DNA

Para confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado nas amostras para as reações de PCR, foi utilizado um par de oligonucleotídeos que amplificam uma região microsatélite $(\text{GATA})_{13}$ do cromossoma 15 humano – ISO5G (PONTES, 2003).

O sistema de reação foi composto de: $2,2\ \mu\text{L}$ de água Milli-Q; $2,5\ \mu\text{L}$ de Tp 10x ($500\ \text{mM KCl}$ e $100\ \text{mM Tris-HCl}$ (pH 8,5)); $2,5\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 $50\ \text{mM}$; $2,5\ \mu\text{L}$ de dNTP ($10\ \text{mM}$); $5,0\ \mu\text{L}$ do iniciador ISO5P $5\ \text{pmol}$ (PONTES, 2003); $0,3\ \mu\text{L}$ da Enzima *Taq* polimerase $5\text{U}/\mu\text{L}$ e $5,0\ \mu\text{L}$ da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de $20\ \mu\text{L}$.

As reações de PCR foram realizadas com 35 ciclos de amplificação em aparelho *Eppendorf - Mastercycler Gradient*, conforme o seguinte programa: um minuto à 95°C para

desnaturação, um minuto à 55°C para anelamento e um minuto à 72°C para a síntese. Após os 35 ciclos, seguiram-se cinco minutos a 72°C para extensão.

Após a amplificação com ISO5G, uma banda correspondente a 270 pb (PONTES, 2003) foi visualizada em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (1µg/mL) e revelado por luz UV.

3.3.2.3 Oligonucleotídeos (*Primers*)

Para o diagnóstico do HPV, a reação de PCR utilizada é denominada *Nested-PCR*, que consiste em duas etapas de amplificação consecutivas. A primeira etapa foi realizada com 40 ciclos, utilizando-se o par de oligonucleotídeos MY09 e MY11. O produto da primeira reação foi submetido a uma segunda etapa de amplificação, com um par de oligonucleotídeos localizados internamente (GP5+/GP6+) à seqüência de nucleotídeos da primeira amplificação (Figura 5) (HAWS et al., 2004, REMMERBACH et al., 2004). As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão apresentadas abaixo:

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA (5'→3')
MY09	CGTCCMAARGGAWACTGATC
MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC

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

Os oligonucleotídeos MY09 e MY11 têm como alvo a região L1, porção altamente conservada de diversos tipos de HPV (BAUER, MANOS, 1998).

Conforme Donmez et al. (1997), tais oligonucleotídeos promovem a amplificação de fragmentos de 450 pares de bases de pelo menos 25 tipos distintos de HPV que infectam o trato genital.

A segunda reação utilizou os oligonucleotídeos GP5+ e GP6+, os quais também têm como alvo a região conservada L1 do HPV, porém mais interna (figura 5), aumentando a sensibilidade e promovendo detecção de HPVs não tão comuns (HAWS et al., 2004; REMMERBACH et al., 2004; DE RODA HUSMAN et al., 1995).

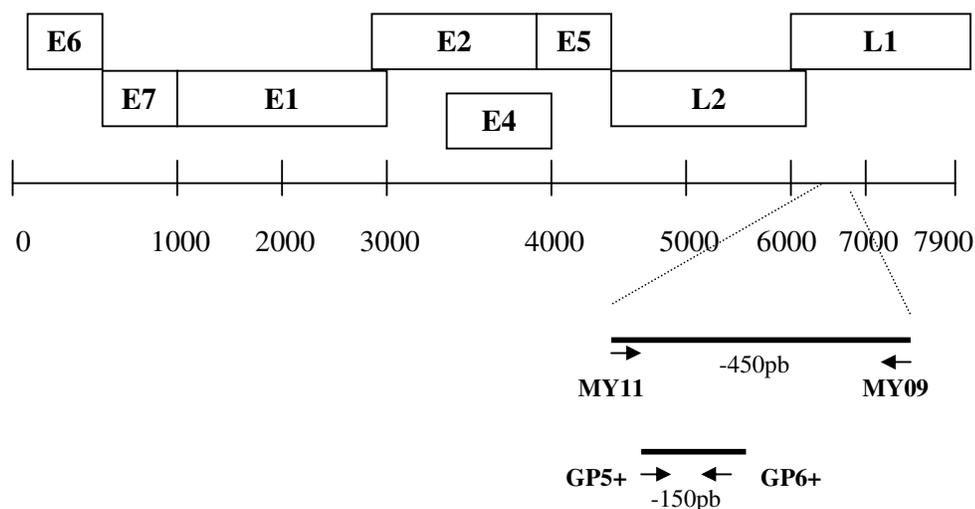


Figura 7: Esboço linear do genoma do HPV, indicando as regiões E (*early*) e L (*late*). Os oligonucleotídeos MY09/MY11 e GP5+/GP6+ estão representados de acordo com os respectivos tamanhos de seus fragmentos amplificados.

FONTE: MOLIJN et al., 2005.

3.3.2.4 Amplificação do DNA (PCR) para diagnóstico do HPV

- Oligonucleotídeos MY09/MY11

A reação de PCR foi processada no equipamento *Eppendorf - Mastercycler Gradient*. O sistema utilizado para a PCR era composto por 5 µL de DNA da amostra; 5 µL do tampão 10x; 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL do *primer forward* MY09 (5 pmol); 5 µL do *primer reverse* MY11 (5 pmol); 1,0 µL de dNTP 10 mM; 0,5 µL de *Taq* polimerase 5U/µL e 27 µL de água Milli-Q para completar o volume de 50 µL. Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (água MilliQ) e um controle positivo com uma amostra positiva para HPV (seqüenciada) do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

O equipamento foi programado para executar o seguinte termociclo:

<i>ETAPAS</i>	<i>TEMPERATURA</i>	<i>TEMPO</i>	
Desnaturação	95°C	60 segundos	
Desnaturação	95°C	60 segundos	} 40 CICLOS
Anelamento	55°C	60 segundos	
Extensão	72°C	60 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Tempo indefinido	

As amostras foram submetidas ao próximo passo do procedimento ou armazenadas a -20°C em congelador para amostras amplificadas.

- Eletroforese em gel de agarose 1,5%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, nas seguintes condições: 70 Volts até a entrada da amostra no gel, aumentando a voltagem para 110 Volts até a amostra chegar no final da corrida com duração de, aproximadamente, duas horas. Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas correspondentes a 450 pb foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

- Oligonucleotídeos GP5+/GP6+

Os produtos da PCR obtidos com os oligonucleotídeos MY09 e MY11 foram utilizados como amostra, sendo manipulados em outro ambiente laboratorial. O sistema utilizado para a PCR era composto por 1 µL de DNA da amostra; 5 µL do tampão 10x; 1,5µL

de $MgCl_2$ (50 mM), 5 μ L do *primer* GP5+ (5 pmol); 5 μ L do *primer* GP6+ (5 pmol); 1,0 μ L de dNTP (10 mM); 0,5 μ L de *Taq* polimerase 5U/ μ L e 31 μ L de água MilliQ para completar o volume de 50 μ L. Para controle da reação, utilizamos um branco (água Milli-Q) e um controle negativo com uma amostra conhecida positiva para HPV (seqüenciada) do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

Após o preparo do sistema para cada amostra, as amostras foram encaminhadas ao termociclador *Eppendorf - Mastercycler Gradient*, utilizando-se a mesma programação descrita para os oligonucleotídeos MY09/11.

Terminada a reação de amplificação, as amostras foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% ou armazenados para posterior procedimento.

- Eletroforese em gel de agarose 2,5%

Os produtos amplificados correspondentes ao *Nested-PCR* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, seguindo os mesmos procedimentos descritos para as amostras da primeira PCR. O fragmento amplificado foi correspondente a 150 pb.

3.3.2.6 Seqüenciamento das amostras e identificação do HPV

Todas as amostras amplificadas foram purificadas com o sistema que utiliza as enzimas *Exo-Sap*. Após a etapa de purificação, as amostras foram submetidas a uma reação de PCR com um dos oligonucleotídeos cuja reação foi positiva. Em seguida, ocorreu a precipitação do DNA das amostras, as quais foram, logo após, submetidas aos procedimentos de seqüenciamento automático do DNA, utilizando-se os oligonucleotídeos MY09 (5 pmol)

ou MY11 (5 pmol) ou GP5+ (5 pmol) ou GP6+ (5 pmol). O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador *MegaBace 1000* (Amersham BioSciences - Pharmacia), utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis System* – Amersham Biosciences, seguindo as instruções do fabricante (ANEXO 1).

3.3.2.6.1 Análise das seqüências nucleotídicas

Para confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada uma comparação das amostras seqüenciadas com as seqüências depositadas no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – GenBank, utilizando-se o programa BLAST/BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) através do site: www.ncbi.nlm.nih.gov. Foram consideradas válidas as homologies das seqüências com *e-value* menor que e^{-10} .

3.3.3 Determinação do Polimorfismo da proteína p53 por PCR

O DNA extraído das amostras cervicais (item 3.3.2.1) foi utilizado para detecção do polimorfismo da proteína p53 através da reação da PCR. A amplificação do material genético para determinar o alelo específico da proteína p53 foi realizada conforme Storey et al (1998) e modificado por Summersgill et al. (2000) utilizando-se os oligonucleotídeos p53+ e p53Arg- para arginina e p53- e *SUM* para prolina, cujas seqüências estão representadas abaixo.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA (5'→3')
<i>SUM</i> (p53 Pro+)	CCTCAGGGCAACTGACCGTG
p53-	CGTGCAAGTCACAGACTT
p53+	TCCCCCTTGCCGTCCCAA
p53Arg-	CTGGTGCAGGGGCCACGC

As reações foram realizadas em dois microtubos diferentes para cada amostra, sendo um para amplificação do fragmento da prolina e outro para arginina. Para o controle da reação, foi utilizado um branco e um controle positivo (amostra de indivíduo heterozigoto do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM).

A reação de PCR foi processada no equipamento termociclador *Eppendorf - Mastercycler Gradient*. O sistema utilizado para a PCR foi composto de:

<i>COMPONENTES</i>	<i>p53+ X p53Arg-</i>	<i>p53- X SUM</i>
Tampão 10X	2 µL	2 µL
MgCl ₂ 25 mM	2 µL	2 µL
Oligonucleotídeo forward 5 pmol	2 µL	2 µL
Oligonucleotídeo reverse 5 pmol	2 µL	2 µL
Dntp 2,5 mM	2,5 µL	2,5 µL
Taq DNA pol 50 U/ µL	0,2 µL	0,2 µL
Água Milli-Q	4,3 µL	4,3 µL
DNA	5,0 µL	5,0 µL
Total	20 µL	20 µL

Após o preparo do sistema para PCR, as amostras foram colocadas no termociclador, com o seguinte programa:

<i>ETAPAS</i>	<i>TEMPERATURA</i>	<i>TEMPO</i>	
Desnaturação	95°C	1'	
Desnaturação	95°C	50''	} 40 CICLOS
Anelamento	61,8°C	50''	
Extensão	72°C	1'	
Extensão final	72°C	2'30''	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C		

- Eletroforese em gel de agarose a 2%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos e visualizados sob luz UV,

onde foram visualizados fragmentos amplificados correspondentes a 141pb (p53+ X p53Arg-) e 193 pb (p53- X *SUM*) (SUMMERSGILL et al., 2000).

3.4 Análise dos resultados

O banco de dados foi construído na planilha Excel e as análises estatísticas foram feitas no R¹ e MINITAB² para microcomputador. O nível de 5% de significância foi usado em todos os testes.

Na análise estatística dos resultados, foram descritas as frequências das variáveis e a distribuição (média, mediana, moda, desvio padrão e o intervalo, quando aplicados) para as variáveis quantitativas idades (idade da paciente, idade na 1ª relação sexual, idade na 1ª gravidez e total de partos).

A variável resposta (tipo de lesão) foi categorizada e estudada em relação à distribuição das variáveis independentes. Referente ao teste de associações com as variáveis qualitativas (categóricas) “tipo de lesão” e sócio-demográficas, utilizou-se a técnica estatística não-paramétrica - Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas de contingências r x c (MEHTA, PATEL, 1986; AGRESTI, 1990). Para análise, os tipos de lesão foram agrupados em LSIL (NIC I), HSIL (NIC II e NIC III), Câncer e Adenocarcinoma, segundo a nomenclatura de Bethesda (SMITH, 2002). Para a análise do polimorfismo da proteína p53 em relação aos tipos de lesão também foi utilizado o Teste Exato de Fisher Generalizado.

Para as comparações de médias das idades, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis³ e, posteriormente, as comparações múltiplas (não paramétrica).

¹ R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Version 2.4.1 URL <http://www.R-project.org>.

² MINITAB for Windows release 14.1 2003/2004 <http://www.minitab.com> Copyright Inc.

³ Kruskal-Wallis - Teste não-paramétrico proposto pelos autores Kruskal e Wallis em 1952, como um competidor ou substituto do Teste F do campo paramétrico (CAMPOS, 1979, CONOVER, 1980).

4. RESULTADOS

As 153 participantes com resultado histopatológico confirmatório de lesão de colo do útero pré-maligna ou maligna foram analisados quanto ao diagnóstico molecular de HPV, polimorfismo da proteína p53 e dados sócio-econômico-culturais.

As participantes deste estudo tiveram a lesão do colo do útero confirmada pelo exame histopatológico, sendo que 3 (2,0 %) apresentaram adenocarcinoma, 21 (13,7%) carcinoma escamoso de colo de útero, 115 (75,1%) apresentaram HSIL e 14 (9,2%) LSIL, conforme Gráfico 1.

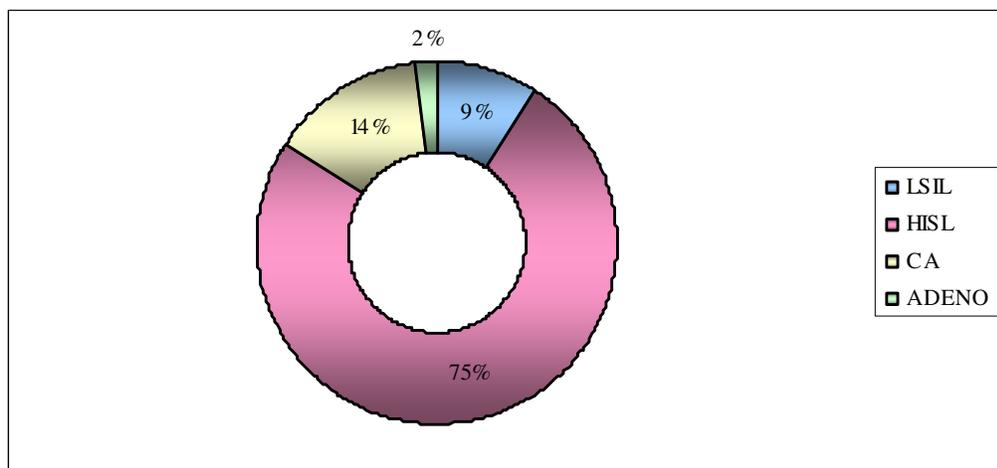


Gráfico 1. Distribuição da população de estudo em relação aos tipos de lesão do colo do útero. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau.

4.1 Detecção e Identificação de HPV por PCR

4.1.1 PCR controle para DNA humano

Para controle de extração do DNA humano íntegro, realizou-se a PCR com os oligonucleotídeos ISO5G. As amostras digeridas por TPK que não apresentaram positividade na reação de PCR controle foram extraídas pelo método Fenol:clorofórmio. Todas as amostras, após digestão com TPK e/ou Extração Fenol:clorofórmio, apresentaram positividade para DNA humano (Figura 8).

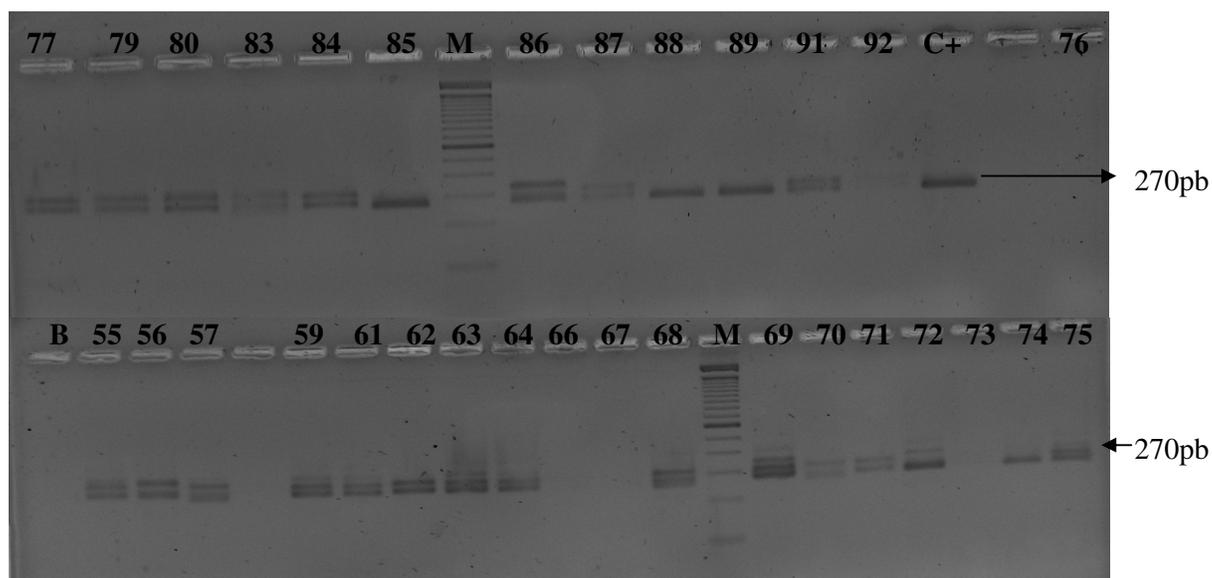


Figura 8 – Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (1µg/mL) das amostras digeridas com TPK e extraídas pelo método fenol:clorofórmio, sendo amplificadas com oligonucleotídeos ISO5G, evidenciando fragmentos em torno de 270 pb, correspondentes ao gene da golgina. B: Branco; C+: controle positivo; M: marcador de 100 pb, *Invitrogen Life Sciences*.

4.1.2 Detecção do HPV por PCR

As amostras coletadas das pacientes com lesão intra-epitelial escamosa de baixo e alto grau, carcinoma escamoso do colo uterino e adenocarcinoma foram examinadas e testadas para HPV, utilizando-se a reação de PCR denominada *Nested-PCR*, que consiste em duas etapas de amplificação consecutivas (Materiais e Método, item 4.3.2.3).

Das 153 amostras testadas para HPV, 94,7% (145) foram positivas (Tabela 1). Dentre estas, 32% (49 amostras) foram positivas na primeira reação usando os iniciadores consenso MY09 e MY11 (Figura 9 e 10). Todas as 145 amostras foram positivas com os oligonucleotídeos GP5+/GP6+ (Figura 11).

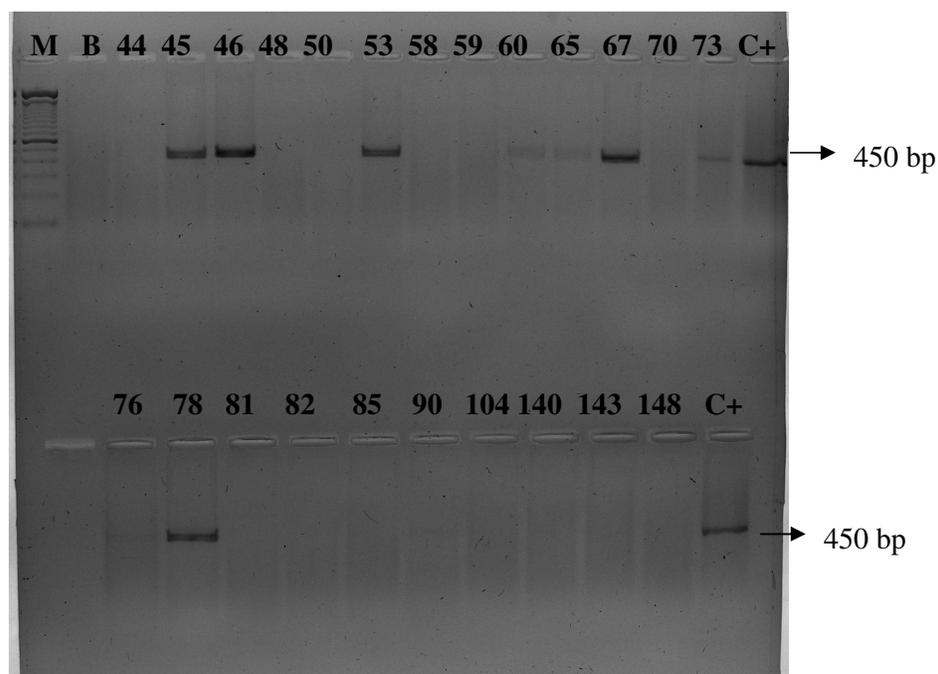


Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (1µg/mL) evidenciando fragmentos de 450 pb, resultantes da amplificação da região L1 do capsídeo viral do HPV, utilizando os oligonucleotídeos MY09 e MY11 (BAUER; MANOS, 1998). B: Branco; C+: controle positivo; M: marcador de 100 pb, *Invitrogen Life Sciences*.

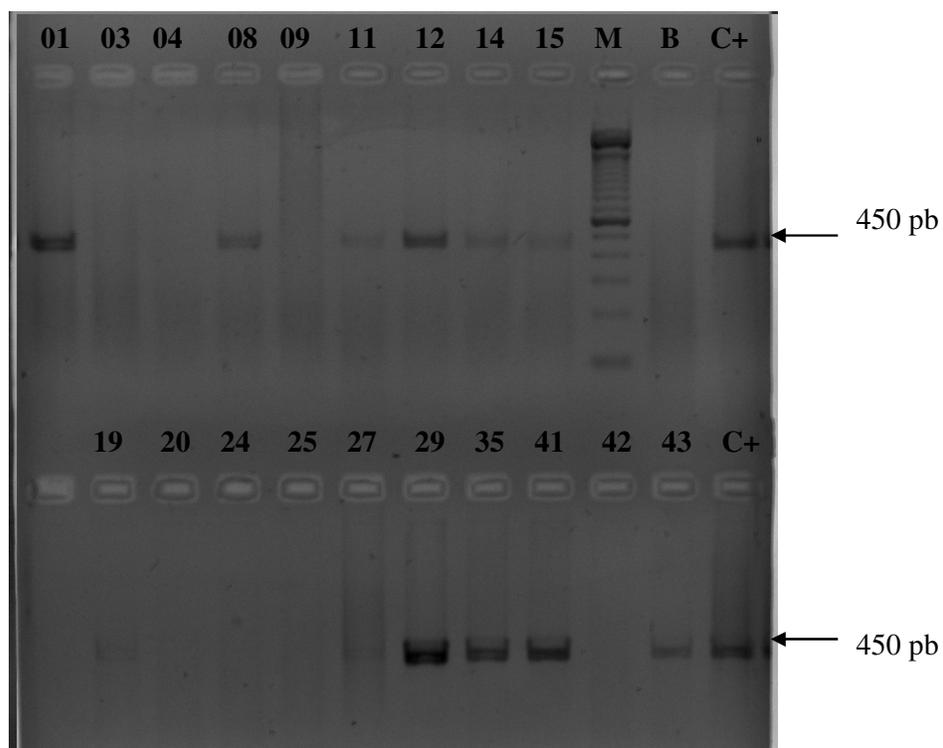


Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (1 μ g/mL) evidenciando fragmentos de 450 pb, resultantes da amplificação da região L1 do capsídeo viral do HPV, utilizando os oligonucleotídeos MY09 e MY11 (BAUER; MANOS, 1998). B: Branco; C+: controle positivo; M: marcador de 100 pb, *Invitrogen Life Sciences*.

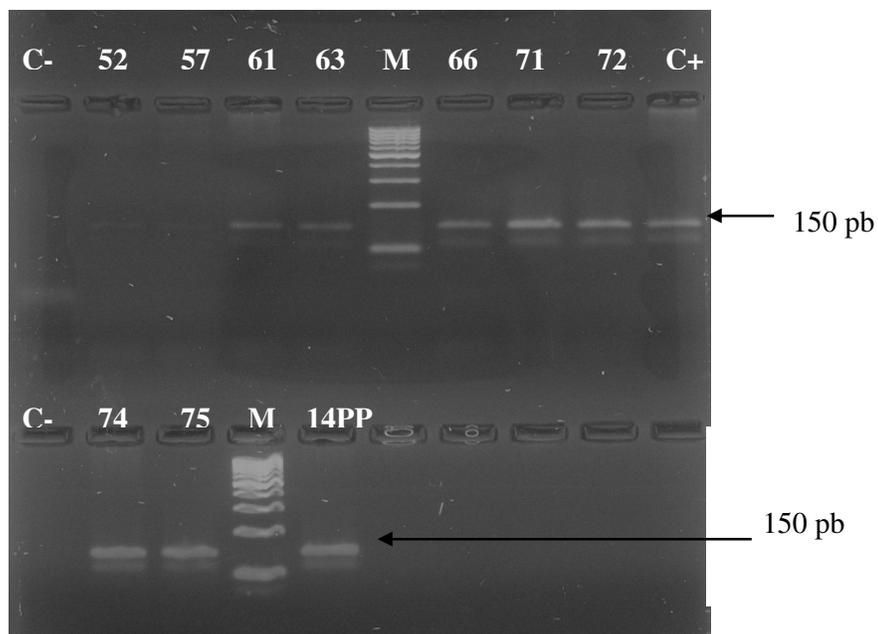


Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo (1 μ g/mL) evidenciando fragmentos de 150 pb, resultantes da amplificação da região L1 do capsídeo viral do

HPV, utilizando os oligonucleotídeos GP5+ e GP6+ (HAWS et al., 2004; REMMERBACH et al., 2004; DE RODA HUSMAN et al., 1995). B: Branco; C+: controle positivo; M: marcador de 100 pb, *Invitrogen Life Sciences*.

Não houve diferença estatisticamente significativa na análise entre a positividade do HPV e os tipos de lesão das pacientes estudadas (Tabela 1), inclusive quando se exclui a lesão adenocarcinoma (ADENO) deste cálculo, por possuir somente 3 pacientes. (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição da frequência de HPV na população de estudo em relação aos tipos de lesão.

Variável	Lesões								Total N = 153	Valor de p	
	ADENO n = 3		CA n = 21		HSIL n = 115		LSIL n = 14				
<i>Teste de HPV</i>											
Positivo	3	100,00%	21	100,00%	107	93,04%	14	100,00%	145	94,77%	0,618 **
Negativo	0	0,00%	0	0,00%	8	6,96%	0	0,00%	8	5,23%	

P-valor: (**) Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c; Percentual por coluna. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau.

Tabela 2 - Distribuição da frequência de HPV na população de estudo em relação aos tipos de lesão.

Variável	Tipo de Lesão						Total N = 150	Valor de p	
	CA n = 21		HSIL n = 115		LSIL n = 14				
<i>Teste de HPV</i>									
Positivo	21	100,00%	107	93,04%	14	100,00%	142	94,67%	0,551 **
Negativo	0	0,00%	8	6,96%	0	0,00%	8	5,33%	

P-valor: (**) Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c; Percentual por coluna. CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau.

4.1.3 Reação de Seqüenciamento

Foram seqüenciadas 122/153 amostras, o equivalente a 79,7% das amostras em geral e 84,14% das amostras positivas. As 122 seqüências de nucleotídeos foram comparadas com as seqüências depositadas no *GenBank*, por meio do programa BLAST, e identificou-se os tipos virais correspondentes.

Do total de 122 amostras, 100 (81,96%) correspondiam ao HPV 16, 6 (4,92%) ao HPV 33, 5 (4,1%) ao HPV 18, 4 (3,28%) HPV 31 e 2 (1,64%) ao

HPV 45 . As demais amostras (4,1%) foram positivas para os tipos 35, 53, 56, 58 e 66 (Gráfico 3).

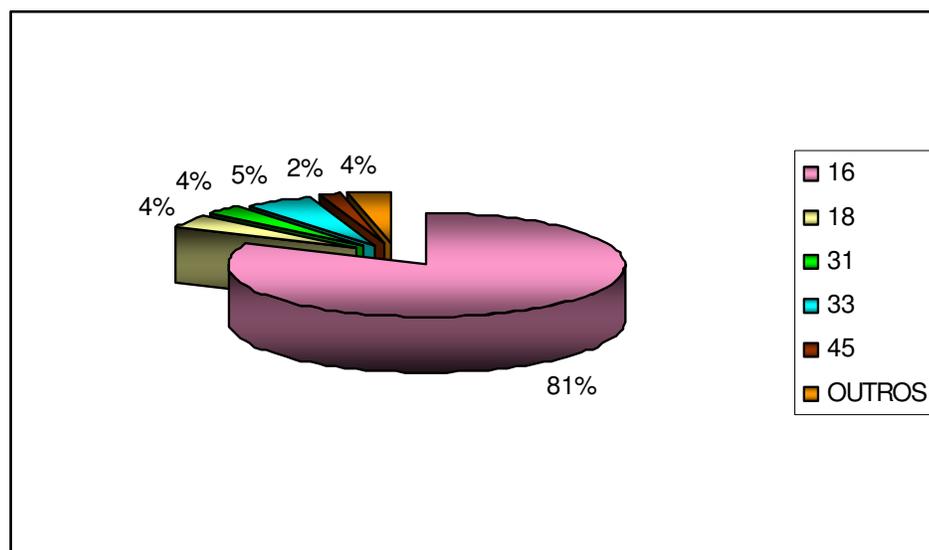


Gráfico 3. Distribuição dos tipos de HPV na população de estudo.

No gráfico 4 são apresentados os tipos mais prevalentes de HPV nas amostras de pacientes com lesões de baixo e alto graus, carcinoma escamoso e adenocarcinoma.

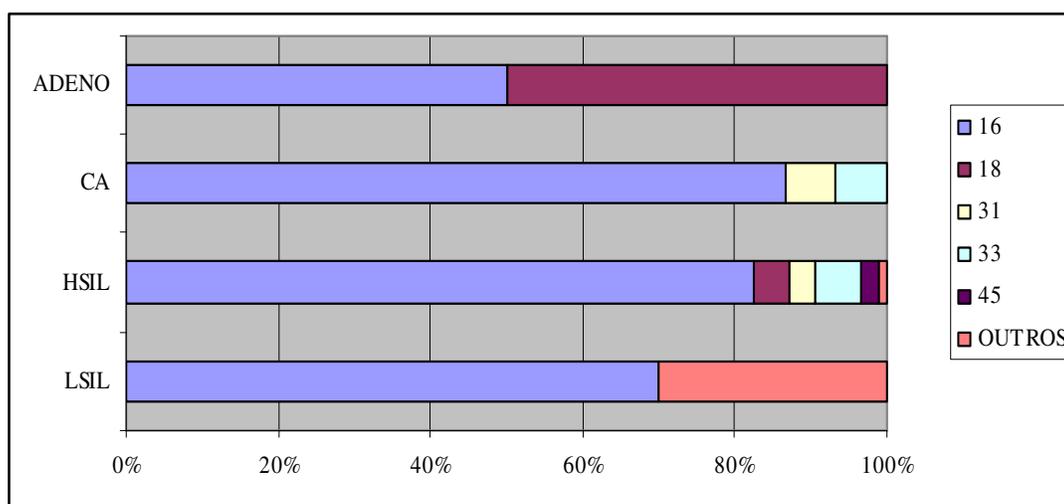


Gráfico 4. Distribuição dos tipos de HPV em relação às lesões do colo do útero da população de estudo. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau.

O polimorfismo da p53 códon 72 foi analisado em 153 pacientes. A Figura 12 mostra um dos géis de agarose com os resultados de amplificação por PCR dos alelos PRO (prolina) e ARG (arginina) com os oligonucleotídeos de Storey et al. (1998), modificados por Summersgill et al. (2000).

4.2 Polimorfismo da proteína p53

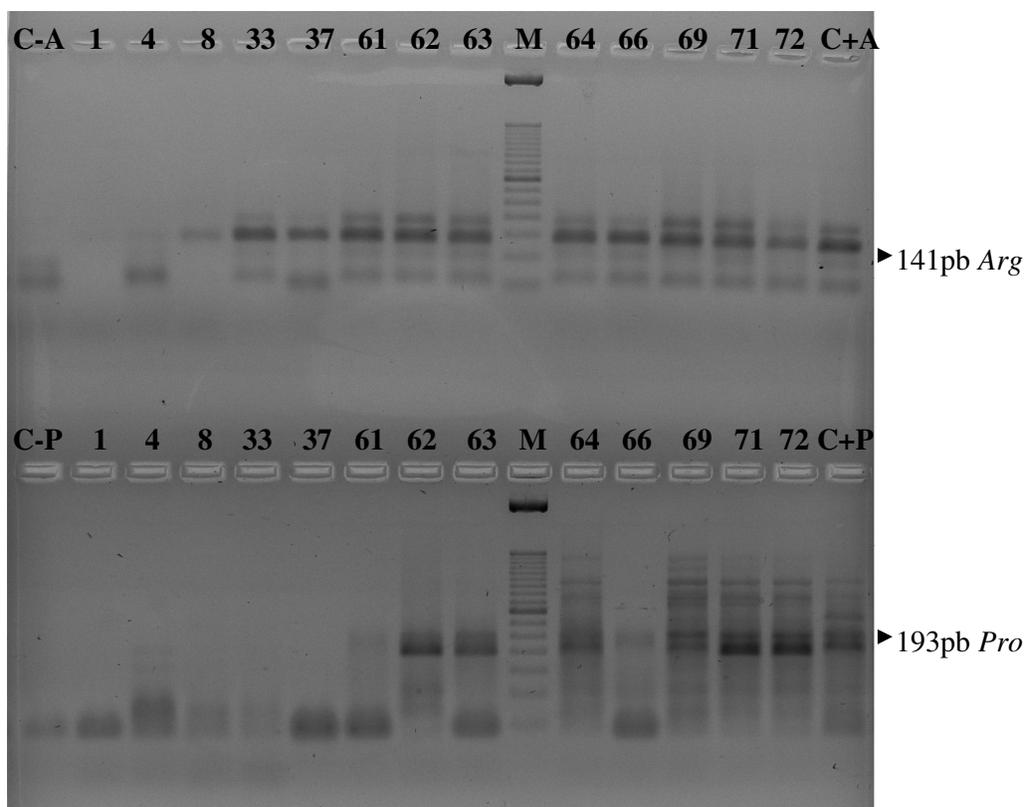


Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo (1µg/mL) evidenciando fragmentos de 141 e 193 pb para Arginina e Prolina, respectivamente. B: Branco; C+A: controle positivo para Arginina; C+P: controle positivo para prolina; M: marcador de 50 pb, *Invitrogen Life Sciences*.

As frequências genotípicas dos alelos polimórficos da proteína p53 códon 72 encontradas na população de estudo foram 61% para *Arg/Pro*, 32% para *Arg/Arg* e 7% para *Pro/Pro* (Gráfico 5).

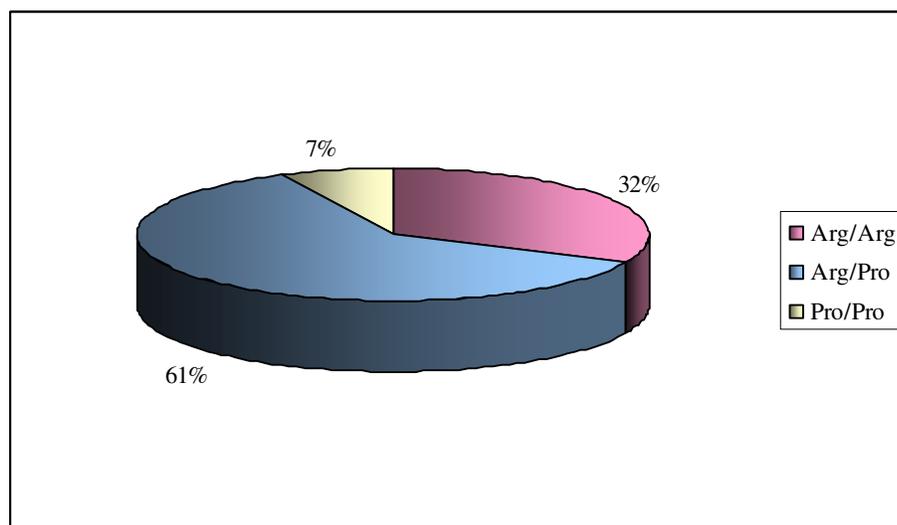


Gráfico 5. Distribuição do polimorfismo da proteína p53 na população de estudo.
Arg/Arg: Arginina, Arginina; Arg/Pro: Arginina, Prolina; Pro/Pro: Prolina, Prolina.

As frequências gênicas dos alelos polimórficos das mulheres participantes do estudo em relação às lesões podem ser vistos na tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição das frequências gênicas dos alelos polimórficos da proteína p53 códon 72 na população de estudo.

Variável	Total
	N = 153
<i>p53</i>	
Arg	0,63
Pro	0,37

Arg: Arginina; Pro: Prolina

Em relação às lesões estudadas, o alelo polimórfico Arg/Pro da proteína p53 apresentou uma maior frequência entre as pacientes, sendo 66,67% em câncer, 61,74% em HSIL e 57,14% em LSIL, com exceção do grupo

adenocarcinoma (Tabela 4). A proporção dos polimorfismos da proteína p53 quando comparada às lesões não foi estatisticamente significativa ($p=0,127$).

Tabela 4 - Distribuição do polimorfismo da proteína p53 da população de estudo em relação aos tipos de lesão.

Variável	Lesões								Total N = 153	Valor de <i>p</i>	
	ADENO		CA		HSIL		LSIL				
	n = 3		n = 21		n = 115		n = 14				
<i>p53</i>											
Arg/Arg	2	66,67%	5	23,81%	38	33,04%	4	28,57%	49	32,03%	0,127 **
Arg/Pro	0	0,00%	14	66,67%	71	61,74%	8	57,14%	93	60,78%	
Pro/Pro	1	33,33%	2	9,52%	6	5,22%	2	14,29%	11	7,19%	

P-valor: (**) Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c; Percentual por coluna. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau.

As frequências genótípicas dos alelos polimórficos da proteína p53 códon 72 em pacientes HPV positivas e negativas são representadas na tabela 5. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade pelo HPV e as frequências polimórficas da p53 na população estudada.

Tabela 5 - Distribuição do polimorfismo da proteína p53 da população de estudo em relação às pacientes HPV positivas e negativas.

Variável	HPV				Total N = 153		Valor de <i>p</i>
	Positivo		Negativo				
	n = 145		n = 8				
<i>P53</i>							
Arg/Arg	48	33,10%	1	12,50%	49	32,03%	0,135 **
Arg/Pro	88	60,69%	5	62,50%	93	60,78%	
Pro/Pro	9	6,21%	2	25,00%	11	7,19%	

Alelos: Arg (Arginina), Pro (Prolina).

4.3 Fatores sócio-econômico-culturais

Os dados obtidos através do questionário foram tabulados e expostos nas tabelas 6 e 7.

Uma segunda análise, retirando os casos de adenocarcinoma (ADENO), foi processada a fim de excluir a interferência deste grupo com número reduzido de pacientes, porém não houve alteração estatisticamente significativa.

Tabela 6 – Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas em relação ao tipo de lesão.

Variável	Lesões				Total	Valor de <i>p</i>
	ADENO	CA	HSIL	LSIL		
	n = 3 (1,96%)	n = 21 (13,73%)	n = 115 (75,16%)	n = 14 (9,15%)	N = 153	
<i>Idade (anos)</i>						
Média ± Desvio padrão	54,33 ± 12,34	47,43 ± 12,02	37,25 ± 10,06	36,21 ± 10,29	38,89 ± 11,11	0,000 *
Intervalo	44 - 68	22 - 73	17 - 72	23 - 57	17 - 73	
<i>Idade na 1ª relação sexual</i>						
Média ± Desvio padrão	24,00 ± 7,81	16,19 ± 2,54	16,04 ± 2,71	17,43 ± 3,82	16,34 ± 3,12	0,209 *
Intervalo	15 - 29	12 - 22	12 - 30	15 - 28	12 - 30	
<i>Idade na 1ª gravidez</i>						
Média ± Desvio padrão	22,50 ± 9,19	18,95 ± 3,35	17,96 ± 2,95	19,31 ± 4,23	18,30 ± 3,23	0,416 *
Intervalo	16 - 29	14 - 26	12 - 28	15 - 31	12 - 31	
<i>Total de partos</i>						
Média ± Desvio padrão	4,33 ± 3,79	5,52 ± 3,23	4,05 ± 2,65	2,86 ± 2,11	4,15 ± 2,75	0,045 **
Intervalo	0 - 7	1 - 14	0 - 12	0 - 8	0 - 14	
<i>Estado Civil</i>						
Solteira	0 0,00%	2 9,52%	16 13,91%	5 35,71%	23 15,03%	0,448 **
Casada	3 100,00%	17 80,95%	85 73,91%	7 50,00%	112 73,20%	
Divorciada/separada	0 0,00%	2 9,52%	11 9,57%	1 7,14%	14 9,15%	
Viúva	0 0,00%	0 0,00%	3 2,61%	1 7,14%	4 2,61%	
<i>Escolaridade</i>						
Analfabeta	0 0,00%	2 9,52%	3 2,61%	0 0,00%	5 3,27%	0,435 **
1º grau	3 100,00%	12 57,14%	70 60,87%	8 57,14%	93 60,78%	
2º grau	0 0,00%	6 28,57%	38 33,04%	4 28,57%	48 31,37%	
3º grau	0 0,00%	1 4,76%	4 3,48%	2 14,29%	7 4,58%	
<i>Renda familiar</i>						
<= 1	3 100,00%	12 57,14%	71 61,74%	10 71,43%	96 62,75%	0,610 **
2 - 4	0 0,00%	9 42,86%	35 30,43%	3 21,43%	47 30,72%	
5 ou +	0 0,00%	0 0,00%	9 7,83%	1 7,14%	10 6,54%	
<i>Usa anticoncepcional</i>						
Sim	0 0,00%	5 23,81%	66 57,39%	10 71,43%	81 52,94%	0,003 **
Não	3 100,00%	16 76,19%	49 42,61%	4 28,57%	72 47,06%	
<i>Fumo</i>						
Fuma	0 0,00%	2 9,52%	17 14,78%	3 21,43%	22 14,38%	0,686 **
Nunca	1 33,33%	13 61,90%	66 57,39%	9 64,29%	89 58,17%	
Ex	2 66,67%	6 28,57%	32 27,83%	2 14,29%	42 27,45%	

Nota: Valor de *p*: (*) teste de Kruskal -Wallis, (**) Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c. Valor em negrito indica diferença estatística significativa ao nível de 5% (Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%). Com exceção do percentual dado em negrito no início da tabela (dado por linha) os demais são por coluna. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau.

A faixa etária média, em geral, das mulheres estudadas em relação ao tipo de lesão foi de 38,89 (DP: 11,11) anos, sendo 54,33 (DP: 12,34) para adenocarcinoma, 47,43 (DP: 12,02) para câncer, 37,25 (DP: 10,06) para mulheres com HSIL e 36,21 (DP: 10,29) para LSIL. A idade mínima registrada foi de 17 anos - uma mulher portadora de lesão escamosa de alto grau (HSIL), e a idade máxima de 73 anos - uma mulher com carcinoma invasor. A mediana encontrada foi de 36 anos. Tanto na análise dos dados da idade média quanto da mediana em relação aos grupos de lesões analisados, houve relação estatisticamente significativa, ou seja, os dados sugerem evidências de que os tipos de lesões ou alguns deles podem estar relacionados com a idade da paciente. Para confirmar a diferença significativa entre as idades e o(s) tipo(s) de lesão (ões) aplicou-se o teste de comparações múltiplas entre elas (Gráfico 6).

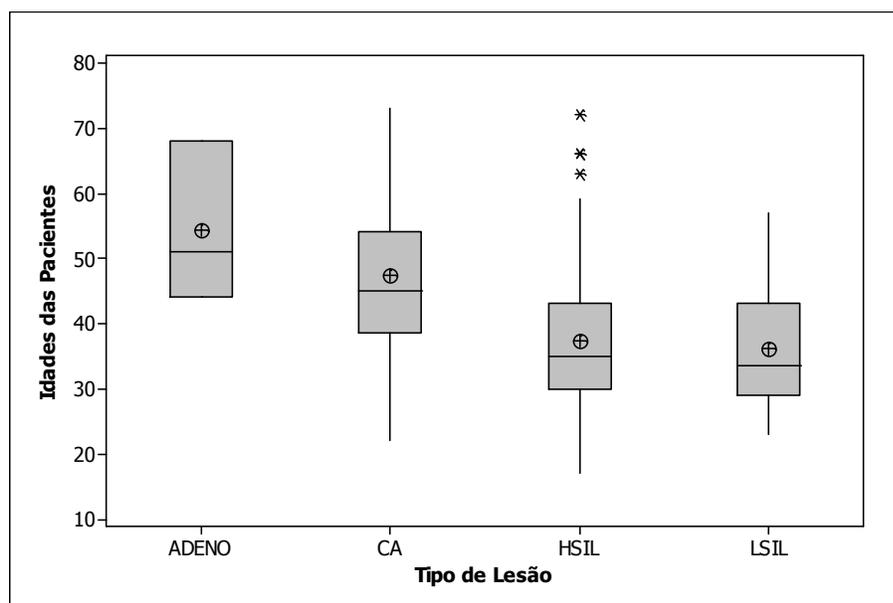


Gráfico 6 – Box plot das idades das pacientes segundo o tipo de lesão. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau. Nota: (Φ) média das idades das pacientes. (*) Dados atípicos.

O tipo de lesão adenocarcinoma (Adeno) apresentou a maior média em relação à variável idade das pacientes ($54,33 \pm 12,34$), não diferindo de nenhum dos outros tipos de lesão. No entanto, o tipo de lesão câncer (CA) ($47,43 \pm 12,02$) diferiu significativamente dos

tipos “HSIL” (37,25±10,06) e “LSIL” (36,21±10,29). Os tipos de lesão “HSIL” e “LSIL” não diferiram entre si. Portanto, há evidências que o tipo de lesão câncer (CA), seria o responsável pela significância estatística do teste empregado anteriormente quando se compara tipos de lesão com a idade das pacientes.

Segundo o estado civil, das 153 pacientes, 112 (73,20%) eram casadas ou relataram união estável.

Em relação ao nível de escolaridade, 93 (60,78%) pacientes tinham cursado ou concluído o ensino fundamental. O nível de escolaridade mais elevado encontrado foi o ensino superior (4,58%) (Gráfico 7).

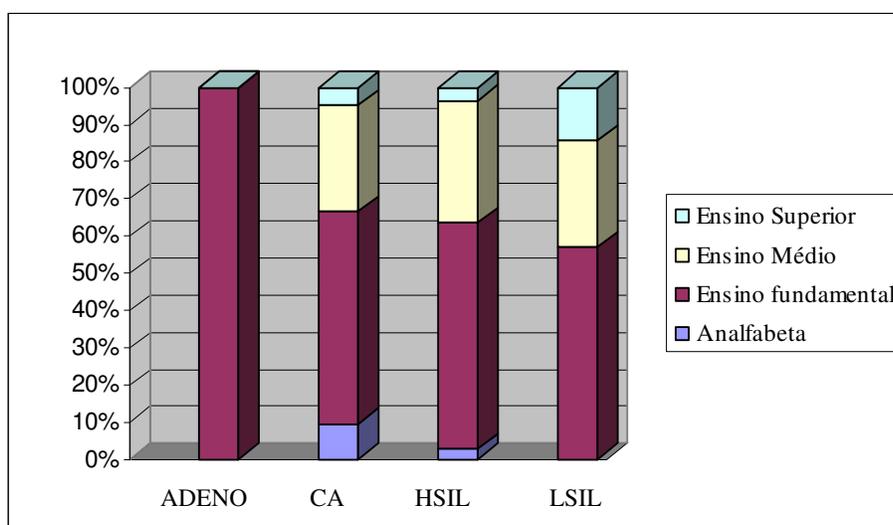


Gráfico 7. Distribuição segundo o nível de escolaridade da população de estudo em relação aos tipos de lesão. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau.

A renda familiar de 96 pacientes (62,75%) foi menor ou igual a um salário mínimo - R\$ 350,00 (trezentos e cinquenta reais). Somente 6,54% das pacientes relatou renda familiar superior a 5 salários mínimos.

Nos dados apresentados, verificou-se que a média de idade das pacientes na primeira relação sexual foi de 16,34 anos. A idade mínima foi de 12 anos (3 pacientes). Para confirmar

a ausência de diferença significativa entre a idade na primeira relação sexual e o(s) tipo(s) de lesão (ões) aplicou-se o teste de comparações múltiplas entre elas (Gráfico 8). Decorrente desta análise, observa-se que as participantes do grupo adenocarcinoma (ADENO) apresentam maior variabilidade, o que deve ser atribuído ao número reduzido de pacientes neste grupo. Em relação às outras lesões, verifica-se homogeneidade entre estas e as suas respectivas médias sugerem equivalência.

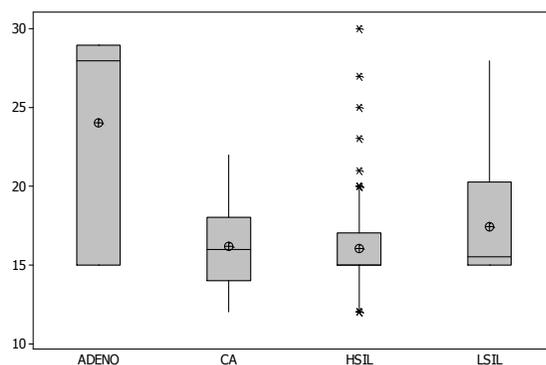


Gráfico 8 – Box plot das idades na 1ª relação sexual das pacientes segundo o tipo de lesão. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau. Nota: (⊕) média das idades das pacientes; (*) Dados atípicos.

Do total de pacientes do estudo, 146 (95,4%) tiveram gestação, sendo que a média da idade na primeira gestação foi de 18,3 anos. A idade mínima foi de 12 anos (Tabela 6). As comparações múltiplas entre os grupos de lesões e a idade na primeira gravidez revelaram que estas idades e as médias são praticamente homogêneas entre as pacientes das lesões, com exceção das pacientes com adenocarcinoma (ADENO) (Gráfico 9).

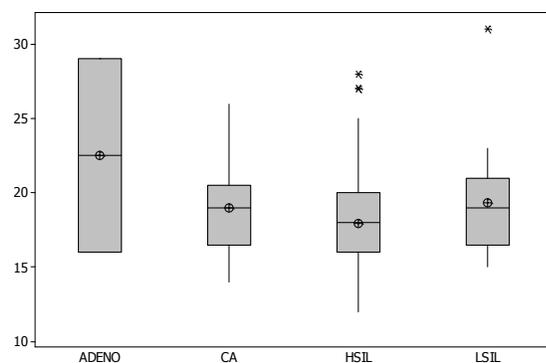


Gráfico 9 – Box plot das idades na 1ª gravidez das pacientes segundo o tipo de lesão. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau. Nota: (⊕) média das idades das pacientes; (*) Dados atípicos.

Segundo o número de partos, a média foi de 4,15. Sete mulheres nunca engravidaram. Houve relação estatisticamente significativa entre as lesões e o total de partos ($p=0,045$). As comparações múltiplas entre os grupos de lesões e o número total de partos evidenciaram que, no grupo com carcinoma escamoso (CA), as pacientes têm maior variabilidade com uma média maior do que nos outros grupos (Gráfico 10).

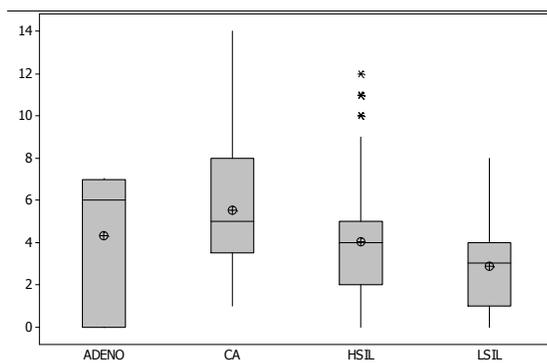


Gráfico 10 – Box plot do número total de partos segundo o tipo de lesão. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau. Nota: (⊕) média das idades das pacientes; (*) Dados atípicos.

Segundo a utilização de anticoncepcional, verificou-se que 52,94% das participantes utilizaram anticoncepcional hormonal nos últimos dez anos. Nas mulheres com câncer do colo do útero, 76,16% relataram não ter utilizado anticoncepcional nos últimos 10 anos, situação contrária às portadoras de LSIL, onde 71,43% utilizaram anticoncepcional neste período. Existe relação estatisticamente significativa ($p=0,003$) entre o uso de anticoncepcional hormonal e as lesões pré-malignas e malignas do colo do útero.

Em relação ao tabagismo, os dados são relativos às pacientes fumantes, ex-fumantes e que nunca fumaram em relação às lesões pré-malignas e malignas do colo do útero. De 153 pacientes entrevistadas, 58,17% relataram que nunca utilizaram cigarros, mantendo a mesma porcentagem entre as pacientes portadoras de lesão intra-epitelial cervical de baixo e alto graus e câncer de colo de útero.

Tabela 7 – Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas em relação ao tipo de lesão.

Variável	Lesões								Total N = 153	Valor de <i>p</i>	
	ADENO		CA		HSIL		LSIL				
	n = 3	n = 21	n = 115	n = 14							
<i>Nº. de parceiros sexuais</i>											
1	2	66,67%	6	28,57%	24	20,87%	1	7,14%	33	21,57%	0,021 **
2	0	0,00%	7	33,33%	22	19,13%	5	35,71%	34	22,22%	
3	0	0,00%	6	28,57%	13	11,30%	2	14,29%	21	13,73%	
4 ou +	1	33,33%	2	9,52%	56	48,70%	6	42,86%	65	42,48%	
<i>Teste de HIV</i>											
Positivo	0	0,00%	0	0,00%	3	2,61%	0	0,00%	3	1,96%	0,186 **
Negativo	1	33,33%	6	28,57%	64	55,65%	9	64,29%	80	52,29%	
Nunca fez	2	66,67%	15	71,43%	48	41,74%	5	35,71%	70	45,75%	
<i>Local onde nasceu</i>											
Manaus	0	0,00%	4	19,05%	38	33,33%	6	42,86%	48	31,58%	0,117 **
Interior do estado do AM	2	66,67%	16	76,19%	53	46,49%	5	35,71%	76	50,00%	
Outro estado	1	33,33%	1	4,76%	23	20,18%	3	21,43%	28	18,42%	
Sem informação					1				1		

Nota: Valor de *p*: (**) Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c. Valor em negrito indica diferença estatística significativa ao nível de 5%. Percentual por coluna. ADENO: adenocarcinoma; CA: carcinoma escamoso; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau.

Quanto ao número de parceiros sexuais, 65 pacientes (42,48%) tiveram quatro ou mais parceiros sexuais até o presente estudo. Há uma relação estatisticamente significativa entre o número de parceiros sexuais e as lesões pré-malignas e malignas do colo do útero ($p=0,021$) na população estudada.

Segundo a origem, 76 (50,0%) pacientes eram do interior do estado do Amazonas, 48 (31,58%) da cidade de Manaus e 28 (18,42%) provenientes de outros estados, porém com moradia fixa em Manaus há mais de 2 anos (Gráfico 11).

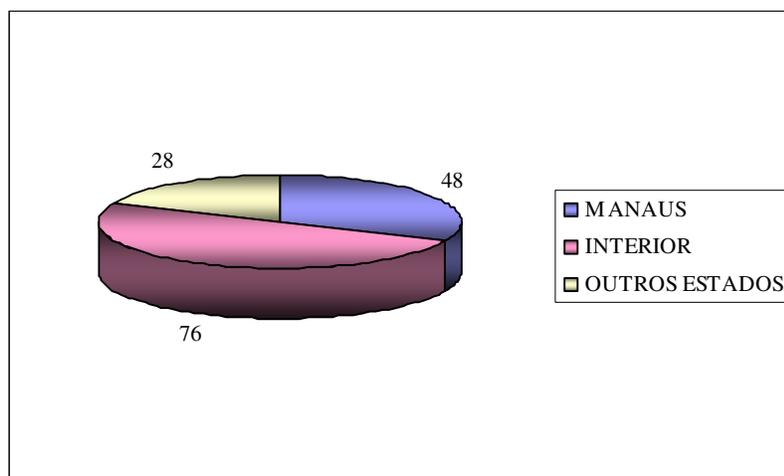


Gráfico 11. Distribuição segundo a origem da população de estudo.

Em relação ao diagnóstico de HIV, 52,29% das pacientes relataram resultado negativo. Porém, 45,75% delas afirmaram nunca ter realizado esse exame.

Três pacientes relataram ser HIV positivas (3,06%), todas elas portadoras de HSIL. Todas as 03 pacientes apresentaram HPV 16, tipo considerado de alto risco.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisadas 153 mulheres portadoras de lesão cervical pré-maligna ou maligna do colo do útero encaminhadas ao serviço de triagem da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON-AM).

A FCECON é uma instituição pública de referência em Oncologia da Amazônia Ocidental, atendendo a população do estado do Amazonas, sul do Pará, Roraima, Rondônia e Acre, além de ser referência e local único para radioterapia na região Norte entre instituições públicas e privadas.

A FCECON é responsável pela coordenação estadual do Programa Viva Mulher, vinculado ao Ministério da Saúde e implantado em 62 municípios amazonenses. Este programa trabalha na implementação de ações preventivas através da educação e disponibilidade de exames precoces contra o câncer de colo de útero e mama, como o Papanicolaou e o exame clínico de mama (INCA, 2007).

Em relação às lesões da população estudada, obtivemos, por demanda espontânea, um grande número de casos de HSIL em detrimento de LSIL, câncer e adenocarcinoma. Esse fato poderia ser justificado pelo encaminhamento de pacientes com LSIL para postos que mantêm atendimento especializado para estas lesões (PAM Codajás), aonde se concentraria um maior número desses casos. Quanto aos casos de câncer, os dados do programa SISCOLO (INCA, 2007), relataram 2,44% casos em 2006. No presente estudo, os casos de câncer obtidos totalizaram 14% da amostra e ainda três casos de adenocarcinoma foram incluídos, tipo maligno de rara frequência (BERTRAND, 2002).

A frequência de HPV encontrada nas pacientes foi de 94,7%, no geral, resultado este encontrado na literatura, que detecta cifras de 75 a 100% de HPV em pacientes com câncer de colo de útero (BEKKERS et al., 2004; BOSCH et al., 2002).

Nas pacientes com lesão do colo uterino, este estudo encontrou 100% de positividade para HPV nos casos de adenocarcinoma, câncer cervical e LSIL e 93,04% nos casos de HSIL.

As 122 (79,7%) amostras seqüenciadas evidenciaram dez tipos de HPV presentes na população de estudo: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 53, 56, 58 e 66. Dentre os tipos encontrados, com exceção do tipo 53 e 66, todos os outros são classificados como alto risco, segundo Baseman; Koutsky (2005) e Munoz et al. (2003 a,b).

Tanto nas amostras de câncer cervical deste estudo, quanto nas de LSIL e HSIL, a frequência de HPV 16 foi maior ou igual a 80%. Foram encontrados frequências de 5,9% em câncer cervical e 5,4% em HSIL para HPV 33 e 4,4% em HSIL para HPV 18. Nos casos de adenocarcinoma (n=3), duas amostras foram identificadas como HPV 16 e HPV 18 e uma amostra apresentou seqüenciamento com *e-value* maior que e^{-10} , sendo considerada inválida.

Os tipos 53 e 66 são considerados de provável alto risco por terem sido encontrados em poucos casos de câncer e em nenhum controle (MUNOZ et al., 2003). O HPV tipo 66, também detectado por Chen et al. (2006) em amostras de pacientes com HSIL, foi encontrado, na nossa população estudada, em amostra de lesão intra-epitelial de alto grau, reforçando, a sugestão de incluir este tipo no grupo de HPV de alto risco. O tipo 53 foi encontrado em uma paciente portadora de LSIL.

Huang et al. (2006), comparando os testes de captura híbrida tipo II e HPV Blot, encontraram HPV 53 em amostras de pacientes apresentando citologia normal, ASCUS e LSIL. Hammouda et al. (2005) encontraram o HPV 53 associado aos tipos 66 e 44 em paciente com carcinoma cervical de células escamosas, utilizando oligonucleotídeos GP5+/GP6+ e hibridização dos produtos positivos através do método de enzimaímmunoensaio

e *southern blot*. Liu et al. (2004) relataram a presença do HPV 53 em associação com os tipos 45 e 16 em uma paciente australiana com câncer cervical invasor, utilizando a reação de *Nested-PCR* com os oligonucleotídeos MY09/11 e GP5+/6+. O método utilizado neste trabalho, ou seja, *Nested-PCR* seguido de seqüenciamento, não possibilita a detecção de mais de um tipo viral, limitando-se a detectar o tipo mais prevalente.

Munoz et al. (1992), num estudo realizado na Colômbia e na Espanha com 436 casos de câncer cervical e 387 controles, relataram forte associação entre HPV e câncer cervical. O tipo 16 foi o mais comumente encontrado entre casos e controles.

Num estudo multicêntrico realizado por Bosch et al. (1995), o DNA do HPV foi detectado em 93% das pacientes com câncer cervical, não havendo variação significativa entre os países estudados. Dentre os tipos de HPV identificados, o HPV 16 estava presente em 50% das amostras, HPV 18 em 14%, HPV 45 em 8% e HPV 31 em 5%. O HPV 18 predominou em adenocarcinomas.

Zehbe; Wilander (1997) detectaram 43 de 45 biópsias positivas para HPV, sendo o HPV 16 o tipo mais prevalente em câncer cervical. Os tipos 18 e 45 foram frequentes em adenocarcinoma. Todos os tipos encontrados eram considerados de alto risco.

Vários estudos (HAMMOUDA, 2005; HEALEY et al., 2001; LIU et al., 2004; MUNOZ et al., 2003a) foram realizados em diversos países do mundo reforçando a alta prevalência de HPV em amostras de câncer cervical e lesões cervicais pré-malignas e a maior frequência do tipo 16 nestas amostras, seguido do tipo 18.

Segundo Clifford (2003) e Hammouda (2005), a alta frequência do HPV 16 em grande parte das amostras é registrada na Europa, Estados Unidos da América (EUA), norte da África, Américas Central e do Sul. Outros tipos encontrados com frequência são 18, 45, 31 e 33 (BOSCH, 1995; BOSCH et al., 2002).

O presente estudo encontrou os mesmo tipos frequentemente relatados na literatura, com grande número de amostras positivas para o HPV 16 (81%).

Franceschi et al. (2003), na Índia, também encontraram 100% e 99,4% das amostras de adenocarcinoma e câncer cervical, respectivamente, positivas para HPV empregando-se oligonucleotídeos GP5+/GP6+ e hibridização dos produtos de PCR em um ensaio imunoenzimático com sondas que detectam 36 tipos distintos de HPV, sendo o HPV 16 o tipo mais freqüente. Já na Indonésia, o HPV 18 é o tipo mais identificado em amostras de câncer cervical, segundo Bosch (1995) e Chang et al. (2005).

Carrillo et al. (2004), utilizando *Nested-PCR* (MY09/MY11 e GP5+/GP6+) combinado com LC1 e LC2, oligonucleotídeos que reconhecem diferentes regiões do gene L1, encontraram freqüência de 95,5% para HPV em casos de câncer cervical invasor, 91,6% em HSIL e 66,7% em LSIL numa população mexicana.

Klug et al. (2001) encontraram 94,1% de amostras de câncer cervical positivas para HPV em mulheres no Peru, com maior freqüência dos tipos 16, 18, 31, 35, 45 e 52, todos classificados como alto risco.

A detecção de HPV em lesões cervicais de baixo e alto grau foi estudada por Zehbe et al. (1996), que encontrou freqüências em LSIL de 93% e 96% em HSIL. Segundo esse estudo, o HPV 16 foi o tipo de maior prevalência. Outro destaque importante desse estudo seria que quanto maior a severidade da lesão cervical, maior positividade para HPV, conclusão também encontrado por Lizano et al. (2006).

Não houve, no presente estudo, variação de detecção de HPV em relação às lesões, principalmente se levarmos em consideração a detecção deste vírus na lesão de baixo grau (100%) e a presença de tipos de alto risco ou provável alto risco em todas elas. Porém, o número de pacientes com alguns tipos de lesões (como LSIL) foi pequeno, o que pode

explicar nossos achados discordantes da literatura, onde não detectamos a crescente positividade pelo HPV quando aumenta a severidade da lesão.

No Brasil, Cavalcanti et al. (1999) analisaram 514 biópsias cervicais em mulheres do estado do Rio de Janeiro detectando frequências de HPV, pela técnica de hibridização *in situ*, de 85,6%, 73,6% e 55,2% em LSIL, HSIL e câncer cervical, respectivamente.

No Rio de Janeiro, um estudo retrospectivo (CARVALHO et al., 2005) envolvendo 788 mulheres atendidas num laboratório encontrou HPV de alto risco em 63,2% das pacientes com LSIL e 100% com HSIL, utilizando a técnica de captura híbrida.

Borges (2001), em Minas Gerais e Vargas (2003), no Rio Grande do Sul, encontraram 77,3% e 82,9% de amostras com citologia anormal positivas para HPV, respectivamente. Em ambos os estudos, a conclusão do aumento da detecção do HPV com o aumento da severidade da lesão foi destacada, sendo que o primeiro estudo utilizou a técnica da captura híbrida II e o segundo, oligonucleotídeos MY09/11 e MY11/GP6+ para aumentar a sensibilidade do teste. Anschau, Schmitt e Gonçalves (2004) também encontraram um crescimento na prevalência de HPV proporcional à gravidade da lesão cervical, com frequências de 40%, 83% e 82% para LSIL, HSIL e câncer cervical, respectivamente, utilizando PCR com oligonucleotídeos MY09/11.

Silva et al. (2005) detectaram por meio de reação da PCR com oligonucleotídeos MY 09 e MY 11, em amostras de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical atendidas em Pernambuco, 48,5% de positividade para o HPV com alta prevalência do tipo 16.

No Amazonas, Castro (2001) e Souza (2004) detectaram HPV na cérvix uterina de mulheres. O primeiro estudo utilizou 144 mulheres, onde 61 apresentaram citologia normal, com taxas de positividade para HPV de 6,6%, com tipos 33, 66, e 16; 83 pacientes com lesão do colo do útero, com 38,6% de positividade para HPV, com tipos 13, 33, 58, 16 e 68. A

segunda pesquisa avaliou o HPV em cérvix uterina de mulheres HIV positivas, encontrando taxa de 14,2% de positividade.

As baixas positivities destacadas em estudos citados (CASTRO, 2001; SILVA et al., 2005; SOUZA, 2004) poderiam ser explicadas pelo emprego da técnica de PCR em uma única etapa utilizando os oligonucleotídeos MY 09 e MY 11. Evander et al. (1992), De Roda Husman (1995) e Remmenbach (2004) destacaram o uso de oligonucleotídeos GP5+ e GP6+ numa reação de *Nested-PCR* para aumentar a detecção de HPV DNA em amostras cervicais, possibilitando a detecção a partir de poucas cópias do material genômico viral. Bosch et al (2002) ressalta que o uso dos oligonucleotídeos GP5+/GP6+ aumenta em 20% a detecção do material nucléico do HPV.

No presente estudo, 49 amostras (32%) foram positivas para HPV com os oligonucleotídeos MY 09/11. A técnica de *Nested-PCR* detectou as 145 amostras positivas para HPV, inclusive as amostras detectadas com MY 09/11. Utilizando-se somente a primeira reação, 96 amostras resultariam em um diagnóstico falso-negativo, confirmando a necessidade de empregar-se uma técnica que aumente a detecção do HPV.

A técnica de captura híbrida II, mais sensível que a versão anterior (I), que detectava nove tipos de HPV, é um sistema comercial que utiliza sondas de RNA contra o DNA genômico do HPV, detectando 13 tipos de HPVs de alto risco com sensibilidade e reprodutibilidade comparadas à detecção por PCR (HUANG et al., 2006; CLAVEL et al., 1998). Porém, a técnica de *Nested-PCR*, utilizada no presente estudo, promove a amplificação de pelo menos 25 tipos distintos de HPV que infectam o trato genital, quando utilizamos o primeiro par de oligonucleotídeos (MY09/11), e aumenta a sensibilidade e promove detecção de HPVs não tão comuns quando utilizamos os oligonucleotídeos GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN et al., 1995; DONMEZ et al. 1997; HAWS et al., 2004; REMMERBACH et al., 2004).

Correa (2005), verificando a frequência de HPV em pacientes de Manaus com HSIL e câncer cervical invasivo encontrou 100% de positividade utilizando a técnica de *Nested-PCR*, com maior frequência de HPV 16.

O presente estudo, além de confirmar a alta positividade de HPV encontrada em casos de câncer cervical, destaca a presença de HPV em 100% de amostras LSIL e 93,4% em HSIL.

Conforme descrito na literatura (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; BOSCH et al., 2002; CASTELLSAGUÉ, 2002; MONSONEGO, 2005; SCHIFFMAN; CASTLE, 2003) os HPV de alto risco são considerados fatores causais para o desenvolvimento de lesões e neoplasias cervicais.

No presente estudo, das 122 amostras seqüenciadas, dez tipos de HPV foram detectados, sendo sete tipos classificados como de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 45, 56, 58) e dois tipos de provável alto risco (53, 66) segundo classificação de Munoz et al. (2003a,b).

Chen et al. (2006) afirma ser importante o conhecimento da distribuição dos tipos de HPV nas mulheres por razões étnicas e para a futura utilização da vacina profilática tipo-específica para HPV.

Em relação às lesões de baixo e alto grau, a grande positividade de HPV de alto risco encontrada em nossas pacientes sugere o alto risco de desenvolvimento de câncer cervical, conforme destacado por Bekkers et al. (2004) e Bosch et al.(2002).

Segundo Bosch et al. (2002), HPV 16 e 18 são os tipos mais comuns em amostras de câncer cervical e representam 50% e 10% dos tipos envolvidos, respectivamente. HPV 16, 18 e 31 seriam encontrados em mais de 80% de todos os cânceres cervicais.

No presente estudo, os HPV 16, 18 e 31 perfazem 89,38% dos tipos encontrados nas lesões cervicais pré-malignas e malignas estudadas.

Schiffman et al. (2005) alertam para a necessidade de uma maior atenção em relação ao achado do HPV 18 nas lesões de colo de útero, pois este tipo apresenta associação estabelecida com lesões glandulares, as quais são difíceis de serem detectadas pela citologia.

A detecção de infecções por múltiplos tipos de HPV e a carga viral seriam importantes para associar o vírus com a presença ou o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero (BEKKERS et al., 2004; BOSCH et al., 2002). Outro fator relevante citado pela literatura (LIZANO et al., 2006; SWAN et al., 2005) é a detecção das variantes do HPV 16, que poderiam degradar a proteína E6 do HPV com graus de eficiência distintos, pois mostram diferentes potenciais onco-patogênicos. Nossa metodologia não objetivou esse tipo de estudo. Porém, Wang; Hildesheim (2003) comentam a falta de padronização dos testes empregados para detectar variantes e carga viral e a deficiência de validação clínica destes possíveis marcadores para estabelecer relação com o risco de progressão da infecção pelo HPV para neoplasia intraepitelial cervical.

Em relação ao grupo diagnosticado com adenocarcinoma, nosso estudo obteve somente três casos, todos positivos para HPV. Destes três casos, dois foram identificados, sendo um tipo encontrado HPV 16 e o outro, HPV 18.

Adenocarcinomas representam apenas 5% dos cânceres cervicais (BERTRAND, 2002). Nessa neoplasia, o HPV 18 é o tipo mais encontrado em diversos estudos, com razão desconhecida para esta especificidade, seguido do HPV 16 (BOSCH et al., 2002; BOSCH, 1995; ZEHBE et al., 1996).

No presente estudo, as lesões do tipo adenocarcinoma representaram 1,96% (3/153) do total de lesões.

Bosch et al. (2002) e Castellsagué et al. (2006) reforçam a relação causal existente também entre HPV e adenocarcinoma, considerando este vírus fator de risco chave para este câncer.

Analisando oito estudos caso-controle envolvendo casos de adenocarcinoma no Norte da África, América do Sul e Sudeste da Ásia, Castellsagué et al. (2006) revelaram que os tipos de HPV 18 e 16 foram os mais comumente detectados, com predominância do HPV 18 somente nos casos de adenocarcinoma no Sudeste da Ásia. Nenhuma das 146 (93%) amostras positivas para HPV desse estudo apresentava tipos de baixo risco.

Hammouda et al. (2005) e Franceschi et al. (2003) também encontraram frequências de HPV 18 e 16 em estudos envolvendo amostras de pacientes com adenocarcinoma.

Em relação ao polimorfismo da proteína p53 códon 72 na população estudada, as frequências alélicas encontradas foram de 0,63 para ARG (arginina) e 0,37 para PRO (Prolina).

As frequências alélicas encontradas pelo presente estudo se assemelham às descritas por Santos (2007) em pacientes com lesão bucal atendidas em Manaus, por Drummond et al. (2002) em Belo Horizonte (Minas Gerais) e Cortezzi et al. (2004) em São Paulo.

Makni et al. (2000), avaliando o polimorfismo da p53 em relação ao câncer cervical e os efeitos da variação interlaboratorial em João Pessoa (Paraíba), encontraram frequências gênicas para ARG entre 0,56 e 0,70 para casos. Brenna et al. (2004), num estudo do valor prognóstico do polimorfismo da p53 em câncer cervical em São Paulo, encontraram uma frequência gênica de 0,84 para ARG.

Segundo Beckmann et al. (1994), a frequência de arginina parece aumentar proporcionalmente à latitude e a frequência de prolina teria o efeito inverso. Nos estudos apresentados envolvendo o Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil, a frequência do alelo arginina parece predominar nesta parte da população brasileira, o que contradiz a relação do alelo ARG e PRO com a latitude sugerida.

A associação entre a homozigossidade para arginina e o risco de câncer cervical foi observada em vários estudos (AGORASTOS et al., 2000; ARBEL-ALON et al., 2002;

DOKIANAKIS; SPANDIDOS, 2000; GUDLEVICIENCE et al., 2006; MAKNI et al., 2000; KLUG et al., 2001; ZEHBE et al. 1999; ZEHBE et al., 2001). Outras pesquisas (HAWS et al., 2005; KIM et al., 2000; LI et al., 2004; TANARA et al., 2003; WONG et al., 2000) não conseguiram estabelecer essa associação.

Makni et al. (2000) atribuiu o possível insucesso de tais associações devido a diferentes técnicas e o material amostral utilizado. Porém, segundo Beckman (1994), parece haver uma variação geográfica e étnica do polimorfismo da proteína p53.

No presente estudo, objetivamos detectar somente a frequência do polimorfismo da proteína p53 nas pacientes com diferentes graus de lesão intraepitelial cervical. O genótipo ARG/PRO teve a maior frequência entre as pacientes do estudo (60,78%) e entre as lesões LSIL, HSIL e câncer. Não houve significância estatística entre o polimorfismo e as lesões estudadas ($p=0,127$), mas observa-se que a maior frequência do genótipo heterozigoto nas nossas pacientes diverge das encontradas num estudo na Paraíba realizado por Makni et al. (2000) em pacientes com câncer cervical, mas encontra-se em conformidade com os resultados de Haws et al. (2005), que descrevem baixa frequência de PRO/PRO e alta frequência de ARG/PRO em pacientes da fronteira entre EUA e México com infecção por HPV de alto risco (16 e 18) e com anormalidades citológicas, o qual sugeriu que o polimorfismo da p53 não parece ser um fator primário na oncogênese.

Chosdol et al. (2002) também relatou maior frequência do genótipo heterozigoto em quatro das cinco etnias estudadas, descartando a maior suscetibilidade de câncer cervical relacionada ao homozigoto ARG, resultado relatado também por Settheetham-Ishida et al. (2006), em pacientes com lesão intraepitelial cervical.

Santos (2007), analisando amostras de câncer bucal em Manaus, Amazonas, encontrou igual frequência genotípica de ARG/ARG e ARG/PRO em pacientes caso e maior frequência de ARG/PRO em indivíduos sadios.

Conforme concluiu Jee et al. (2004), em um trabalho de metanálise avaliando o polimorfismo da proteína p53 códon 72 e o câncer cervical, o risco varia por país, por tipo celular e por tipo de HPV. Mas, no geral, o gene p53 esteve associado com o aumento do risco para o câncer cervical invasor.

Mesmo com um grande número de estudos realizados em relação ao polimorfismo da proteína p53 e o risco de câncer cervical, dados sobre o valor prognóstico das variantes desta proteína no desenvolvimento da doença neoplásica cervical ainda são escassos (BRENNAN et al., 2004).

O desafio em relação à proteína p53 está em estabelecer seu valor como um possível marcador do câncer, já que a inativação desta proteína representa uma etapa chave na carcinogênese. Ao mesmo tempo, a tentativa de restaurar sua função contra o câncer encontra limites, já que sua atividade diminuída possibilita o desenvolvimento da neoplasia e seu aumento pode acelerar o processo de envelhecimento (LANE, 2004; TOMASINO et al., 2003).

O desenvolvimento do câncer cervical é um processo de várias etapas, envolvendo vários fatores ambientais, virais e genéticos (TOMASINO et al., 2003).

Dentre os fatores envolvidos na carcinogênese cervical, este estudo encontrou evidências de associação entre a idade média, o total de partos, o uso de anticoncepcional e o número de parceiros sexuais em relação ao tipo de lesão (adenocarcinoma, câncer, HSIL e LSIL).

A população de estudo, em geral, apresentou média de idade igual a 38,89. Quando se relacionou média de idade das pacientes com as lesões, houve evidências de associação entre estas. As comparações múltiplas apontaram também a diferença de idade entre pacientes com câncer, com média de idade superior às do grupo LSIL e HSIL, cuja análise sugere médias equivalentes.

Importante notar que as médias das idades das pacientes com LSIL e HSIL, lesões que geralmente precedem o câncer, são mais baixas que a média das pacientes com câncer. A média de idade do grupo com câncer (CA) foi de 47,43 anos, com diagnósticos estabelecidos em pacientes com idades de 22 até 73 anos, o que se encontra de acordo com dados brasileiros (INCA, 2007), onde a incidência por câncer do colo do útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico na faixa de 45 a 49 anos. Segundo o INCA (2007), uma redução de 80% na mortalidade por câncer do colo do útero poderia ser alcançada através de rastreamento, por teste de Papanicolaou, em mulheres na faixa etária de 25 a 59 anos, faixa esta que englobaria grande parte das pacientes do presente estudo, nas diversas lesões.

A incidência de câncer cervical em países desenvolvidos revela um perfil onde as taxas aumentam entre 25 e 30 anos, com novo pico entre 45 e 50 anos (BOSCH; SANJOSE, 2003). Em relação às neoplasias intraepiteliais cervicais grau III e carcinoma *in situ*, a idade de incidência encontra-se entre 20 e 30 anos, segundo dados de Bosch et al. (2002), Bosch; Sanjose (2003) e Baseman; Koutsky (2005).

No presente estudo, as pacientes com lesões de baixo e alto graus apresentaram idade média de 36,21 e 37, 26, respectivamente.

Bosch; Sanjose (2003) relataram a incidência de HSIL/Câncer *in situ* entre 20 e 30 anos, intervalo inferior ao encontrado no nosso estudo.

Schiffman; Castle (2003) reforçam a idade média de 30 anos para HSIL, com tendência de casos de câncer ocorrerem uma década mais tarde.

Misra et al. (2006), num estudo acompanhando pacientes com HSIL durante vários anos na Índia, relataram um aumento da porcentagem de casos de HSIL com o aumento da faixa etária, sendo que 47,8% (273/571) das pacientes apresentaram idade igual ou superior a

40 anos, 32,3% das pacientes apresentavam idade entre 31 e 40 anos, 19,1% delas tinham idade entre 21 e 30 anos e 0,7% apresentavam idade inferior a 20 anos.

Correa (2005) encontrou média de idade de 40,8 anos para pacientes com HSIL/ Carcinoma invasivo em estudo conduzido em Manaus, Amazonas, dado próximo da média encontrada para esse grupo no presente estudo.

Na presente investigação, 60,78% das pacientes com lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero cursaram ou concluíram o ensino fundamental e 62,75% tinham renda familiar igual ou abaixo de um salário mínimo (R\$ 350,00). Vale ressaltar que o público atendido na FCECON é oriundo de postos de saúde destinados aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), população de baixa renda, o que poderia representar um viés na interpretação destes dados. Porém, tivemos 31,37% das pacientes com ensino médio completo ou em curso e 4,58% de pacientes com ensino superior.

A baixa renda das pacientes deste estudo pode interferir no estado nutricional, contribuindo para deficiências na resposta imune e combate do organismo ao desenvolvimento de lesões e câncer cervical.

Em revisão de literatura, Castellsagué et al. (2002) revelaram que o aumento na ingestão de frutas e vegetais estão associados com menor risco para desenvolvimento do câncer cervical. Vitaminas B6, B12, C, E e folatos, quando ingeridos em quantidades suficientes para suprir as necessidades orgânicas, parecem oferecer risco reduzido para o desenvolvimento de câncer cervical (GOODMAN et al., 2001).

A média do número total de partos revelado por este estudo foi de $4,15 \pm 2,75$, havendo evidências de associação entre esta característica e as lesões estudadas ($p=0,045$). Após comparações múltiplas, observou-se a maior variabilidade apresentada pelas pacientes com câncer cervical, as quais apresentaram maior média ($5,52 \pm 3,23$).

Bosch et al. (2002), numa análise de vários estudos que envolviam fatores de risco no câncer cervical e HPV, sugeriram risco quatro vezes maior de desenvolvimento neoplásico entre mulheres que tinham tido sete ou mais gestações quando comparadas com nulíparas HPV positivas e duas vezes maior quando comparadas com aquelas pacientes HPV positivas que tiveram 2 a 3 partos. Porém, em Honduras, um país com alto índice de mulheres multíparas, os efeitos da paridade não foram significantes entre casos HPV positivos e controles.

Munoz et al. (2002) encontraram uma associação direta entre o número de gestações e o risco de câncer escamoso cervical, relação não observada nos casos de adenocarcinoma.

Segundo Autier et al. (1996), o aumento do número de partos mantém a ZTT na ectocérvice por muitos anos, conferindo maior risco ao desenvolvimento de lesões. Além disso, outros mecanismos sugeridos seriam exposição hormonal, traumas e resposta imune durante a gravidez, que poderiam explicar a associação entre paridade e neoplasia cervical. Mas, devido aos estudos que reforçam a hipótese da influência hormonal de anticoncepcionais sobre o risco de câncer cervical, esta deve ser a maior influência da multiparidade neste contexto (CASTELLSAGUÉ; MUNOZ, 2003).

O uso de anticoncepcional hormonal também evidenciou associação em relação às lesões analisadas neste estudo, onde 52,94% das pacientes relataram seu uso nos últimos 10 anos.

Moreno et al. (2002) concluíram, numa revisão envolvendo pacientes com câncer cervical *in situ* e invasor, que o uso de anticoncepcional hormonal por longo período (acima de 10 anos) seria um risco desenvolvimento de câncer cervical em pacientes HPV positivas.

Skegg (2002), num comentário sobre as pesquisas envolvendo anticoncepcional e multiparidade, observou que os estudos não fazem distinção entre a composição e combinação

de hormônios nos anticoncepcionais, sendo que aqueles compostos por progesterona não teriam evidências de apresentar risco ao desenvolvimento de lesões e câncer cervical.

Outro viés sugerido por Ferenczy; Franco (2002) em relação à associação de anticoncepcional e risco de desenvolver câncer cervical seria o maior acesso de pacientes usuárias de anticoncepcionais aos serviços de saúde, as quais participariam dos estudos envolvendo fatores de risco.

Castellsagué; Munoz (2003) constataram que o uso de anticoncepcionais orais por períodos prolongados e multiparidade seriam cofatores que poderiam modular o risco de progressão da infecção pelo HPV para HSIL e câncer cervical.

Num recente estudo, Syrjanen et al. (2006) acompanharam 3.187 mulheres divididas em relação ao uso de anticoncepcional e avaliadas quanto ao desenvolvimento de HSIL e persistência/*clearance* de HPV de alto risco, onde se sugeriu que o início da doença cervical e a infecção pelo HPV não estariam relacionados com o uso de anticoncepcional.

Em relação ao comportamento sexual das mulheres participantes do estudo, 42,48% relatou apresentar número de parceiros sexuais maior ou igual a quatro, com média de idade na primeira relação sexual de $16,34 \pm 3,12$ anos. Evidências significativas entre a associação do número de parceiros sexuais e lesões foram apontadas na análise realizada ($p=0,021$).

O número de parceiros sexuais, antigamente relacionado diretamente com o risco de neoplasia, encontra-se atualmente atribuído à maior probabilidade de exposição ao HPV e a vários tipos oncogênicos, aumentando o risco de lesões e câncer cervical (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; BOSCH et al, 2002).

O hábito de fumar não mostrou evidências de associação com as lesões das pacientes, onde 58,17% das participantes revelaram nunca ter fumado.

A importância do fumo em relação ao desenvolvimento de lesões e câncer cervical foi analisada por Prokopczyk et al. (2001), que verificou a presença de um carcinógeno

específico do tabaco, o NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butadona), que seria metabolizado pelo tecido cervical humano em produtos genotóxicos e carcinogênicos, reforçando os achados epidemiológicos de que o tabaco e o HPV teriam ação sinérgica no desenvolvimento de lesões e câncer cervical (CASTELLSAGUÉ et al., 2002).

Efeitos indiretos do tabaco, como diminuição das células de Langerhans e outros marcadores da resposta imune e diminuição dos antioxidantes ingeridos também foram destacados como mecanismos pelos quais o fumo poderia afetar a progressão para a neoplasia maligna do colo uterino (BOSCH et al., 2002; CASTELLSAGUÉ et al., 2002).

O HPV é considerado necessário, mas não suficiente causa de câncer cervical. É provável que fatores adicionais (ambientais, genéticos) combinados com fatores virais corroborem para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas cervicais (BOSCH et al., 2002; HEILMANN; KREIENBERG, 2002).

A alta frequência de tipos de HPV de alto risco encontrados nas pacientes estudadas serve de alerta para que ocorra a melhoria do acesso da população feminina aos programas de prevenção e detecção precoce de lesões do colo do útero, principalmente em relação às pacientes do interior do estado do Amazonas, que representaram 50% das pacientes com lesão no presente estudo, o que parece ser a melhor estratégia na diminuição do câncer do colo uterino, resultado registrado em países desenvolvidos (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; FRANCESCHI, 2005). Além disso, uma prevenção bem estabelecida aliada a uma vacinação contra o HPV seria a melhor maneira de diminuição da morbidade e mortalidade associadas com a neoplasia cervical e outras neoplasias associadas ao HPV (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; BEKKERS et al., 2004).

6. CONCLUSÃO

- A frequência de HPV nas pacientes com lesão de colo de útero estudadas foi de 94,7% (145/153), sendo 32% (49/153) positivas na reação com oligonucleotídeos MY09/11 e 94,7% (145/153) positivas com oligonucleotídeos GP5+/GP6+, na reação de *Nested-PCR*.
- 79,7% (122/153) das amostras seqüenciadas foram positivas para HPV. Destas, 81,9% (100/122) correspondiam ao HPV 16, 4,9% (6/122) ao HPV 33, 4,1% (5/122) ao HPV 18, 3,3% (4/122) ao HPV 31 e 1,6% (2/122) ao HPV 45. As demais amostras (4,1%) foram positivas para os tipos 35, 53, 56, 58 e 66.
- Dentre os tipos de HPV descritos na população estudada, destaca-se o 18, o qual não tinha sido identificado por nenhum estudo realizado em Manaus até o presente momento.
- Em relação aos tipos de HPV identificados, nas pacientes com lesão LSIL (n=10), 80% das delas eram portadoras do HPV 16, 10% HPV 53 e 10% HPV 56. Nas pacientes com lesão HSIL (n=86), os tipos de HPV presentes foram 16 (81,40%), 33 (5,81%), 18 (4,65%), 31 (3,49%), 45 (2,33%), 58 (1,16%) e 66 (1,16%). Nas pacientes portadoras de câncer cervical (n=15), os tipos de HPV identificados foram 16 (86,67%), 31 (6,67%) e 33 (6,67%). Em pacientes com adenocarcinoma (n=2), foram identificados HPVs 16 e 18.
- A frequência genotípica ARG/ARG descrita na literatura como cofator para o desenvolvimento do câncer de colo de útero parece não justificar a maior prevalência desta patologia nas pacientes estudadas, as quais apresentaram maior frequência de ARG/PRO.

- Na análise dos fatores sócio-econômico-culturais, o número total de partos, o uso de anticoncepcional, o número de parceiros sexuais e a idade das pacientes apresentaram significância estatística, sugerindo evidências de associação entre estes fatores e as lesões estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGORASTOS, T.; LAMPROPOULOS, A.F.; CONSTANTINIDIS, T.C.; KOTSIS, A.; BONTIS, J.N. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and invasive cervical neoplasia in greek women. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 9, n.2, p. 113-118, 2000.

AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. New York: Wiley. Páginas 59–66, 1990.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SHAFFER, A.A.; HANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, n.25, p. 3389-3402, 1997.

ANSCHAU, F; SCHMITT, V.M.; GONÇALVES, M.A.G. Análise da prevalência do papilomavírus em relação ao grau de lesão cervical. **Scientifica Medica**, v.14, n.2, p. 111-116, 2004.

AUTIER, P.; COIBION, M.; HUET, F.; GRIVEGNEE, A.R. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. **Br J Cancer**, n. 74, v. 3, p. 488-490, 1996.

ARBEL-ALON, S.; MENEZER, J.; FELDMAN, N.; GLEZERMAN, M.; YEREMIN, L.; FRIEDMAN, E. et al. Codon 72 polymorphism of p53 in Israeli Jewish cervical cancer patients and healthy women. **Int J Gynecol Cancer**, v. 12, p. 741-744, 2002.

BASEMANN, J.G.; KOUSTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S16-S24, 2005.

BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR detection of genital human papillomavirus. **Applications – Viral Pathogens**, p. 407-413, 1998.

Brak **połączenia** **z** **bazą** **danych.** **Disponível** **em:**
< <http://www.pkzr.ac.bialystok.pl/rysunki/genom.gif> > Acesso em: 02 de maio de 2007.

BECKMAN, G.; BIRGANDER, R.; SJALANDER, A.; SAHA, N.; HOLMBERG, P.A.; KIVELA, A.; BECKMAN, L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? **Hum hered**, v. 44, p. 266-270, 1994.

BEKKERS, R.L.M.; MASSUGER, L.F.A.G.; BULTEN, J.; MELCHERS, W.J.G. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. **Rev Med Virol**, v. 14, p. 95-105, 2004.

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

BERTRAND, M. A. **Adenocarcinoma of the cervix – Recognition and special Considerations**. In: Proceedings of the XI International Congress of Cervical Pathology and

Colposcopy. Editors: BORDOY, J e Nicolau, R. Barcelona, Spain, June 9-13, 2002.

BORGES, S.C.V. **Diagnóstico da infecção pelo papilomavírus humano através da captura híbrida II em mulheres portadoras de neoplasia intraepitelial cervical de baixo e alto grau.** 2001. Dissertação (Medicina – Obstetrícia e Ginecologia) – Universidade Federal de Minas Gerais.

BOSCH, F.X.; MANOS, M.M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M.H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K.V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.

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

BOSCH, F.X.; SANJOSE, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n.31, p. 3-13, 2003.

BRENNA, S.M.F.; SILVA, I.D.C.G.; ZEFERINO, L.C.; PEREIRA, J.S.; MARTINEZ, E.Z.; SYRJANEN, K.J. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. **Gynecologic Oncology**, v.93, p. 374-380, 2004.

CAMPOS, H. **Estatística Experimental Não-Paramétrica.** São Paulo: FEALC, 3 ed., 1979.

CARRILLO, A.; MOHAR, A.; MENESES, A.; FRÍAS-MENDIVIL, M.; SOLORZA, G.; LIZANO, M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. **Salud Pública de México**, v.46, n. 1, 7-15, 2004.

CARVALHO, M.O.O.; CARESTIATO, F.N.; PERDIGÃO, P.H.; XAVIER, M.P.P.T.; SILVA, K.C.; BPTELHO, M.O.; OLIVEIRA, L.H.S.; CAVALCANTI, S.M.B. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 5, 2005.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F.X.; MUNOZ, N. Review: Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, n. 89, p. 191-199, 2002.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUNOZ, N. Chapter 3: Cofactors in Human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n.31, p. 20-31, 2003.

CASTELLSAGUÉ, X.; DIAZ, M.; SANJOSE, S.; MUNOZ, N.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S.; PEELING, R.W.; ASHLEY, R.; SMITH, J.S.; SNIJERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M.; BOSCH, F.X. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 5, p. 303-315, 2006.

CASTRO, M.M. **Detecção do papilomavírus humano – HPV em esfregaços endocervicais de mulheres que procuraram o serviço de citologia em Manaus.** 2002. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos e Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; PASSOS, M.R.L.; OLIVEIRA, L.H.S. Infecções causadas por papilomavírus e desenvolvimento de câncer: aspectos virológicos e epidemiológicos. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 11, n. 4, p. 10-14, 1999.

CHANG, C.H.; CHEN, T.H.; HSU, R.C.; CHOU, P.H.; YANG, J.J.; HWANG, G.Y. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 33-37, 2005.

CHEN, C.A.; LIU, C.Y.; CHOU, H.H.; CHOU, C.Y.; HOJJ, C.M.; TWU, N.F.; KAN, Y.Y.; CHUANG, M.H.; CHU, T.Y.; HSIEH, C.Y. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: a Taiwan cooperative oncologic group study. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, p. 1801-1808, 2006.

CHO, N.H.; LIM, S.Y.; KIM, Y.T.K.; KIM, D.; KIM, Y.S.; KIM, J.W. G2 checkpoint in uterine cervical cancer with HPV 16 E6 according to p53 polymorphism and its screening values. **Gynecologic Oncology**, v. 90, p. 15-22, 2003.

CHOSDOL, K.; AHUJA, A.; RATHORE, A.; MISRA, A.; MIR, S.H.; CHATTOPADHYAY, P.; SINHA, S. Study of p53 codon 72 polymorphism in various ethnic groups of North India. **Current Science**, v. 82, n. 10, p. 1253-1255, 2002.

CLARKE, B.; CHETTY, R. Review: Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, v. 82, p. 238-246, 2001.

CLAVEL, C.; MASURE, M.; PUTAUD, I.; THOMAS, K.; BORY, J.P.; GABRIEL, R.; QUEREUX, C.; BIREMBAUT, P. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papilomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. **J Clin Pathol**, v. 51, p. 737-740, 1998.

CLIFFORD, G.M.; SMITH, J.S.; PLUMMER, M.; MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, n. 88, v. 1, p. 63-73, 2003.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistic**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2th edition, 1980.

CORRÊA, G.J. **Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres portadoras de lesão intra-epitelial escamosa cervical e câncer invasor**. 2005. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas, Universidade do Estado do Amazonas.

CORTEZZI, S.S.; PROVAZZI, P.J.; SOBRINHO, J.S.; MANN-PRADO, J.C.L.; REIS, P.M.P.; FREITAS, S.E.N.; GÓIS FILHO, J.F.; FUKUYAMA, E.E.; CORDEIRO, J.A.; CURY, P.M.; MANIGLIA, J.V.; VILLA, L.L.; TAJARA, E.H.; RAHAL, P. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 150, n. 1, p. 44-49, 2004.

DE RODA HUSMAN, A.M.; WALBOOMERS, J.M.M.; VAN DER BRULE, A.J.C.; MEIJER, C.J.L.M.; SNIJDERS, P.J.F. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at

their 3'ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 4, p. 1057-1062, 1995.

DE VILLIERS, E-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H-U.; zur HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DOKIANAKIS, D.N.; SPANDIDOS, D.A. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated cervical cancer. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 3, p. 111-114, 2000.

DONMEZ, H.; MENEVSE, S.; GUNER, H.; MENEVNESE, A. Deteccion and typing of human papillomavirus DNAs by restriction endonucleases: mapping of the PCR products. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 12, p. 789-793, 1997.

DOORBAR, J. Review: The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S7-S15, 2005.

DUMONT, P.; LEU, J.I.; PIETRA, A.C.D.; GEORGE, D.L.; MURPHY, M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potencial. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 357-365, 2003.

DRUMMOND, S.N.; DE MARCO, L.; PORDEUS, A.I.; BARBOSA, A.A.; GÓMEZ, R.S. TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, v.22, p. 3379-3381, 2002.

EVANDER, M.; EDLUND, K.; BODÉN, E.; GUSTAFSSON, A.; JONSSON, M.; KARLSSON, R.; RYLANDER, E.; WADELL, G. C omparison of a one-step and a two step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n. 4, p. 987-992, 1992.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **The Lancet**, v. 3, p. 11-16, 2002.

FLORES, R.; PAPENFUSS, M.; LIMECKI, W. T.; GIULIANNI, A. R. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Cancer**, 118, 1187-1193, 2006.

FRANCESCHI, S.; RAJKUMAR, T.; VACCARELLA, S.; GAJALAKSHMI, V.; SHARMILA, A.; SNIJDERS, P.J.F.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.L.M.; HERRERO, R. Human Papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: a case-control study. **Int J Cancer**, v. 107, p. 127-133, 2003.

FRANCESCHI, S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. **Recent Results Cancer Res**, n.166, p. 277-297, 2005.

FRANCO, E.; VILLA, L.L.; RUIZ, A.; COSTA, M.C. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogênico risk types. **The Journal of Infectious Disease**, v. 172, p. 756-762, 1995.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P.; PRADO, J.M.; ROUSSEAU, M-C; DÉSY, M.; ROHAN, T.E. Epidemiologic of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **Journal of Infectious Disease**, v. 180, p. 1415-1423, 1999.

GOODMAN, M.T.; MCDUFFIE, K.; HERNANDEZ, B.; WILKENS, L.R.; BERTRAM, C.C.; KILLEEN, J.; MARCHAND, L.L.; SELHUB, J.; MURPHY, S.; DONLON, T.A. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 1275-1280, 2001.

GROSS, G. E.; BARASSO, R. **Infecção por HPV: Atlas clínico de HPV**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda., 1999.

GUDLEVICIENE, Z.; DIDZIAPETRIENE, J.; RAMAEL, M.; ULECKIENE, S.; POVILAS, K.; VALUCKAS, P. Human papillomavirus and p53 polymorphism in lithuanian cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 102, p. 530-533, 2006.

HAMMOUDA, D.; MUNOZ, N.; HERRERO, R.; ARSLAN, A.; BOUHADEF, A.; OUBLIL, M.; DJEDEAT, B.; FONTANIERE, B.; SNIJERS, P.; FRANCESCHI, S. Cervical carcinoma in Algiers, Algeria: Human papillomavirus and lifestyle risk factors. **Int J Cancer**, v. 113, p. 483-489, 2005.

HAWS, A.L.F.; HE, Q.; RADY, P.L.; ZHANG, L.; GRADY, J.; HUGHES, T.K.; STISSER, K.; KONIG, R.; TYRING, S.K. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 87-93, 2004.

HAWS, A.L.F.; SABINE, W.; GOMEZ, M.; GARZA, N.; GOMEZ, Y.; RADY, P.; HE, Q.; ZHANG, L.; GRADY, J.J.; McCORMICK, J.B.; FISCHER-HOCH, S.P.; TYRING, S.K. Human papillomavirus infection and p53 codon 72 genotypes in a hispanic population at high-risk for cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 77, p. 265-272, 2005.

HEALEY, S.M.; ARONSON, K.J.; MAO, Y.; SCHLECHT, N.F.; MERY, L.S.; FERENCZY, A.; FRANCO, E.L. Oncogenic human papillomavirus infection and cervical lesions in aboriginal women of Nunavut, Canada. **Sex Transm Dis**, v. 28, p. 694-700, 2001.

HEILMANN, V.; KREIENBERG, R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. **Current Women's Health Reports**, v. 2, p. 27-33, 2002.

HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.; BROMLEY, C.; WACHOLDER, S.; HERRERO, R.; RODRIGUEZ, A.C.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E.; SCARPIDIS, U.; LIN, Q.Q.; TERAJ, R.L.B.; BUETOW, K.; APPLE, R.J.; BURK, R.D. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, n. 4, v. 93, p. 315-318, 2001.

HPV asociované cervikálne léze. Disponível em: <<http://www.hpv.cervix.cz.charakteristika-viru.html>>. Acesso em 10 de maio de 2007.

HUANG, S.L.; CHAO, A.; HSUEH, A.; CHAO, F.Y.; HUANG, C.C.; YANG, J.E.; LIN,

C.Y.; YAN, C.C.; CHOU, H.H.; HUANG, K.G.; HUANG, H.J.; WU, T.I.; TSENG, M.J.; QIU, J.T.; LIN, C.T.; CHANG, T.C.; LAI, C.H. Comparison between the hybrid capture II test and SPF1/GP6+ PCR-based assay for detection of human papillomavirus DNA in cervical swab samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1733-1739, 2006.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Screening Group – cervical research studies**. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php?lang=1> Acesso em: 05/10/2007.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=140 Acesso em: 08/10/2005a.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Manaus, 1999. Incidência, segundo localização primária do tumor, por faixa etária, em mulheres.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/incid tumor.asp?sexo=F&ID=9> Acesso em: 11/01/2005. b

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Programa nacional de controle de câncer do colo do útero e de mama – Viva Mulher**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=140 Acesso em: 27/04/2007.

JEE, S.H.; WON, S.Y.; YUN, J.E.; LEE, J.E.; PARK, J.S.; JI, S.S. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. **Int J Gynecol Obstet**, v. 85, p. 301-308, 2004.

KAELIN JR, W.G. The emerging p53 gene family. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 7, 1999.

KIM, J.W.; ROH, J.W.; PARK, N.H.; SONG, Y.S.; KANG, S.B.; LEE, H.P. Polymorphism of TP53 codon 72 and risk of cervical cancer among Korean women. **Am J Obstet Gynecol**, v.184, n. 2, p. 55-58, 2000.

KLUG, S.J.; WILMOTTE, R.; SANTOS, C.; ALMONTE, M.; HERRERO, R.; GUERRERO, I.; CACERES, E.; PEIXOTO-GUIMARAES, D.; LENOIR, G.; HAINAUT, P.; WALBOOMERS, J.M.M., MUNOZ, N.. TP53, HPV infection and risk of cervical cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 1009-1012, 2001.

KNEBEL-DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2229-2242, 2002.

KOSS, L.G.; GOMPEL, C. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. 1ed. São Paulo: Manole, 1997.

LANE, D. Clinical implications of basic research: Curing cancer with p53. **N Engl J Med**, v. 350, n. 24, p. 2711-2712, 2004.

LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, v. 351p.453-456, 1991.

LI, C.Y.; LIU, J.H.; HUANG, B.J. Correlation between P53 codon 72 polymorphism and

tumorigenesis of cervical cancer. **Ai Zheng**, v. 23, n. 11, p. 1396-1399, 2004.

LIMA, G. R.; GEBRIM, L. H.; CINTRA E OLIVEIRA, V.; MARTINS, N. V. **Ginecologia Oncológica**. São Paulo: Livraria Atheneu, 1999.

LIU, J.; ROSE, B.; HUANG, X.; LIAO, G.; CARTER, J.; WU, X.; THOMPSON, C. Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high- versus low-incidence regions. **Gynecologic Oncology**, v. 94, p. 803-810, 2004.

LIZANO, M.; CRUS-HERNANDEZ, E.; CARRILO-GARCIA, A.; GARCIA-CARRANCA, A.; LEON-ROSALES, S.; DUENAS-GONZALEZ, A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, D.; MOHAR, A. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions and cervical cancer in a Mexican population. **Gynecologic Oncology**, v. 102, p. 230-235, 2006.

MAKNI, H.; FRANCO, E.L.; KAIANO, J.; VILLA, L.L.; LABRECQUE, S.; DUDLEY, R.; STOREY, A.; MATLASHEWSKI, G. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. **Int J Cancer**, v. 87, p. 528-533, 2000.

MEHTA, C. R.; PATEL, N. R. Algorithm 643. FEXACT: A Fortran subroutine for Fisher's exact test on unordered $r \times c$ contingency tables. **ACM Transactions on Mathematical Software**, v. 12, p. 154-161, 1986.

MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN, S.; GRIFFIN, H.; SOTLAR, K.; NAKAHARA, T.; EL-SHERIF, A.; MORRIS, L.; SETH, R.; HIBMA, M.; JENKINS, D.; LAMBERT, P.; COLEMAN, N.; DOORBAR, J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p. 10186-10201, 2003.

MINITAB for Windows release 14.1 2003/2004 [http:// www.minitab.com](http://www.minitab.com) Copyright Inc.

MISRA, J.S.; DAS, V.; SRIVASTAVA, A.N.; SINGH, U.; CHHAVI. Role of different etiological factors in progression of cervical intraepithelial neoplasia. **Diagnostic Cytopathology**, n. 10, v.34, p. 682-685, 2006.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Falando sobre câncer do colo de útero**. Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/Cancer/pdf/falando_cancer_colo_uterio.pdf. Acesso em: 28/03/2007

MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT, W.; van DOORN, L-J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S43-S51, 2005.

MONSONEGO, J. HPV infections and cervical cancer prevention. Priorities and new directions. Highlights of EUROGIN 2004 International Expert Meeting, Nice, France, October 21-23, 2004. **Gynecologic Oncology**, v. 96, p. 830-839, 2005.

MORENO, V.; BOSCH, X.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.L.M.; SHAH, K.V.; WALBOOMERS, J.M.M.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. Effect of contraceptives on

risk of cervical cancer in women with papillomavirus infection:the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, 2002.

MUNOZ, N.; BOSCH, F.; SANJOSE, S.; TAFUR, L.; IZARZUGAZA, I.; GILI, M.; VILADIU, P.; NAVARRO, C.; MARTOS, C.; ASCUNCE, N. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. **Int J Cancer**, v. 11, n. 5, p. 743-749, 1992.

MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J.S.; SHAH, K.V; MEIJER, C.J.L.M.; BOSCH, F.X. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v.359, 2002.

MUNOZ, N.; BOSCH, F.; XAVIER, F.; SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N England J Med**, v. 348, n.6, p. 518-527, 2003. a

MUNOZ, N.; BOSCH, F.; XAVIER, F.; SNIJDERS, P.J.F. Classification of human papillomavirus: correspondence. **N Engl J Med**, v. 348, n. 20, p. 2040-2041, 2003. b

PONTES, I.M. **Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos**. 2003. 57f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas/ Universidade Federal de São Carlos.

PROKOPCZYK, B.; TRUSHIN, N.; LESZCZYNSKA, J.; WAGGONER, S.E.; EL-BAYOUMY, K. Human cervical tissue metabolizes the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, via α -hydroxylation and carbonyl reduction pathways. **Carcinogenesis**, v.22, n.1, p. 107-114, 2001.

R Development Core Team (2006). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Version 2.4.1 URL <http://www.R-project.org>.

REMMERBACH, T.W.; BRINCKMANN, U.T.; HEMPRICH, A.; CHEKOL, M.; KUHNDEL, K.; LIEBERT, U.G. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY 09/11 and GP5+/6+ primer sets. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p. 302-308, 2004.

RINTALA, M.A.M.; GRÉNMAN, S.E.; PURANEN, M.H.; ISOLAURI, E.; EKBLAD, U.; KERO, P.O.; SYRJANEN, S.M. Transmission of high-risk human papillomavirus between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.1, p. 376-381, 2005.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.V.E.; SILVA, I.S.B. Bases moleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

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

SANCLEMENTE, G.; GILL, D.K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venerology**, v. 16, p. 231 – 140, 2002.

SANTOS, P. J. B. **Detecção da infecção pelo vírus do Papiloma Humano (HPV) em lesões de câncer bucal e sua relação com o polimorfismo do códon 72 de p53 em pacientes atendidos na FCECON, Manaus, Amazonas.** 2007. 155f. Tese - Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas.

SATHISH, N.; ABRAHAM, P.; PEEDICAYIL, A.; SRIDHARAN, G.; SHAJI, R.V.; CHANDY, G. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. **Gynecologic Oncologic**, v. 95, p. 363-369, 2004.

SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; HILDESHEIM, A.; WACHOLDER, S.; RODRIGUEZ, A.C.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E.; MORALES, J.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; WRIGHT, T.C.; SOLOMON, D.; CHEN, Z.; SCHUSSLER, J.; CASTLE, P.E.; BURK, R.D. et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, v. 337, p. 76-84, 2005.

SCHLECHT, N.F.; PLATT, R.W.; DUARTE-FRANCO, E.; COSTA, M.C.; SOBRINHO, J.P.; PRADO, J.C.M.; FERENCZY, A.; ROHAN, T.E.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 95, n. 17, 2003.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E. Human papillomavirus: Epidemiology and public health. **Arch Pathol Lab Med**, v. 127, p. 930-934, 2003.

SETTHEETHAN-ISHIDA, W.; SINGTO, Y.; YUENYAO, P.; TASSANEEYAKUL, W.; KANJANAVIROJKUL, N.; ISHIDA, T. Contribution of epigenetic risk factors but not p53 codon 72 polymorphism to the development of cervical cancer in Northeastern Thailand. **Cancer Letters**, v.210, p. 205-211, 2004.

SETTHEETHAM-ISHIDA, W.; YUENYAO, P.; TASSANEEYAKUL, W.; KANJANAVIROJKUL, N.; THAWMOR, A.; KULARBKAEW, C.; HAHVAJANAWONG, C.; SETTHEETHAM, D.; WATTANATHORN, J.; KASHISMA, T.; ISHIDA, T. Selected risk factors, human papillomavirus infection and the P53 codon 72 polymorphism in patients with squamous intraepithelial lesions in Northeastern Thailand. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 113-118, 2006.

SHERR, C.J. Principles of tumor suppression. **Cell**, v. 116, p. 235-246, 2004.

SKEGG, D.C.G. Commentary: Oral contraceptives, parity and cervical cancer. **The Lancet**, v. 359, p. 1080-1081, 2002.

SILVA, T.T.; GUIMARÃES, M.L.; BARBOSA, M.I.C.; PINHEIRO, M.F.G.; MAIA, A.F. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 5, p. 285-291, 2005.

SILVA FILHO, A. M.; LOGATO FILHO, A. **Colo uterino e vagina: processos**

inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

SINGH, A.; SHARMA, H.; SALHAN, S.; GUPTA, S.D.; BHATLA, N.; JAIN, S.K.; SINGH, N. Evaluation of expression of apoptosis-related proteins and their correlation with HPV, telomerase activity and apoptotic index in cervical cancer. **Pathobiology**, v. 71, p. 314-322, 2004.

SMITH, J.H.F. Review: Bethesda 2001. **Cytophotology**, v. 13, n. 4, p. 4-10, 2002

SOLIMAN, P. T.; SLOMOVITZ, B.M.; WOLF, J.K. Mechanisms of cervical cancer. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.1, n. 2, 2004.

SOUZA, P.M. **Detecção do papilomavírus humano (HPV) na cérvix uterina de mulheres HIV positivas e em portadoras de Aids atendidas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.** 2004. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas, Universidade do Estado do Amazonas.

STERLING, J.C.; TYRING, S.K. **Woman papillomavirus: clinical and scientific advances.** A. Hodder Arnold Publication, 2001.

STOREY, A; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I.M.; MATLASHEWSKI, G. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus -associated cancer. **Nature**, v. 393, p. 229-234, 1998.

SUMMERSGILL, K.F.; SMITH, E.M.; KIRCHNER, L.; HAUGEN, T.H.; TUREK, L.P. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 90, p. 334-339, 2000.

SWAN, D.C.; RAJEEVAN, M.; TORTOLERO-LUNA, G.; FOLLEN, M.; TUCKER, R.A.; UNGER, E.R. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. **Gynecologic Oncology**, v. 96, p. 695-700, 2005.

SYRJANEN, K.; SHABALOVA, I.; PETROVICHEV, N.; KOZACHENKO, V.; ZAKHAROVA, T.; PAJANIDI, J.; PODISTOV, J.; CHEMERIS, G.; SOZAEVA, L.; LIPOVA, E.; TSIDAEVA, I.; IVANCHENKO, O.; PSHEPURKO, A.; ZAKHARENKO, S.; NEROVJNA, R.; KLJUKINA, L.; EROKHINA, O.; BRANOVSKAJA, M.; NIKITINA, M.; GRUNBERGA, V.; GRUNBERG, A.; JUSCHENKO, A.; SANTOPIETRO, R.; CINTORINO, M.; TOSI, P.; SYRJANEN, S. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. **Anticancer Res**, v. 26, n. 6C, p. 4729-4740, 2006.

TANARA, G.; FALUGI, C.; CESARIO, A.; MARGARITORA, S.; RUSSO, P.; COSIMI, A. TP53 codon 72 polymorphism does not affect risk of cervical cancer in patients from The Gambia. **Int J Biol Markers**, v. 18, n. 4, p. 280-283, 2003.

THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular

pathogenesis of HPV. **Oncogene**, v. 18, p. 7690-7700, 1999a.

THOMAS, M.; KALITA, A.; LABRECQUE, S.; PIM, D.; BANKS, L.; MATLASHEWSKI, G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n. 2, 1999b.

TOMASINO, M.; ACCARDI, R.; CALDEIRA, R.; DONG, W.; MALANCHI, I.; SMET, A.; ZEHBE, I. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. **Human Mutation**, v. 21, p. 307-312, 2003.

TSENG, C.J.; LIN, C.Y.; CHEN, L.J.; CHANG, Y.L.; HSIEH, T.T.; PAO, C.C. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. **Am J Obstet Gynecol**, v.166, p. 35-40, jan 2002.

VARGAS, V.R.A. **Detecção de papilomavírus humano por reação em cadeia da polimerase em amostras citológicas cervico-vaginais anormais**. 2003. Dissertação (Mestrado em Gerontologia Médica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

VILLA, L.L. Human papillomavirus and cervical cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 71, p. 321-341, 1997.

VINHAES, J. C. **Clínica e Terapêutica Cirúrgicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1997.

WANG, S.S.; HILDSHEIM, A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **Journal of the National Institute Monographs**, n. 31, 2003.

WONG, Y.F.; CHUNG, T.K.; CHEUNG, T.H.; NOBORI, T.; HAMPTON, G.M.; WANG, V.W.; LI, Y.F.; CHANG, A.M. p53 polymorphism and human papillomavirus infection in Hong Kong women with cervical cancer. **Gynecol Obstet**, v. 50, n.1, p. 60-63, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research & development**. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/documents/new_vaccines/en/index8.html . Acesso em: 05/10/2005.

XI, L.F.; KOUTSKY, L.A.; GALLOWAY, D.A.; KUYPERS, J.; HUGHES, J.P.; WHEELER, C.M.; HOLMES, K.K.; KIVIAT, N.B. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 11, p. 796 - 802, jun 1997.

ZEHBE, I.; RYLANDER, E. EDLUND, K.; WADELL, G.; WILANDER, E. Detection of human papillomavirus in cervical intra-epithelial neoplasia using in situ hybridization and various polymerase chain reaction techniques. **Virchows Arch**, n. 428, v. 3, p. 151-157, 1996.

ZEHBE, I.; WILANDER, E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. **Journal of Pathology**, v. 181, p. 270-275,

1997.

ZEHBE, I.; VOGLINO, G.; WILANDER, E.; GENTA, F.; TOMMASINO, M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. **The Lancet**, v. 354, p. 218-219, 1999.

ZEHBE, I.; VOGLINO, G.; WILANDER, E.; DELIUS, H.; MARONGIU, A.; KLIMEK, F.; ANDERSSON, S.; TOMMASINO, M. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. **Cancer Research**, v. 61, p. 608-611, 2001.

APÊNDICE A – TCLE

- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INVESTIGADOR: Júnia Raquel Dutra Ferreira

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Amazonas/Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas.

TELEFONE: (92)3232 6504

TÍTULO: Análise do polimorfismo da proteína p53 e da infecção pelo HPV em pacientes com lesões cervicais pré-cancerosas e cancerosas atendidas em Manaus, Amazonas.

DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO

Este é um estudo que pretende verificar a presença do HPV (Papilomavírus humano) em mulheres com ou sem lesão no colo do útero. Pretende também pesquisar se uma proteína que é protetora do nosso organismo, a p53, tem relação com alguma forma de lesão do colo do útero e o HPV, dependendo de como ela se apresenta.

Eu fui convidada para participar dessa pesquisa. Minha participação será de minha própria vontade. Se eu concordar em participar, permitirei que sejam feitos testes para diagnóstico do HPV e verificação da proteína p53 no meu material cervical coletado pelo médico(a) ginecologista, contribuindo assim para o melhor entendimento dessa doença no nosso estado.

Fui esclarecida que a coleta do material cervical é feita igual à coleta do preventivo e que causa um certo desconforto, mas que não tem risco e será realizada com material descartável e novo.

Também entendi que responderei a perguntas relacionadas ao estudo.

Entendi também que posso me retirar da pesquisa quando quiser.

Ficarei com uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido por mim assinado e pela pesquisadora responsável. Este termo terá os telefones da pesquisadora responsável, sendo que posso ligar para ela quando tiver qualquer dúvida sobre o assunto.

RISCOS ASSOCIADOS AO ESTUDO

O risco da coleta é considerado baixo, sendo procedimento rotineiro nos exames de preventivo. Fui orientada que os exames da PCR podem dar resultados falso-positivos e falso-negativos, mas que são menores que os outros testes diagnósticos para o HPV.

BENEFÍCIOS

Participando deste estudo, estarei me beneficiando do exame da PCR, importante para verificar a presença ou não do HPV. Além disso, estarei verificando como se apresenta minha proteína p53.

CONFIDENCIALIDADE E AVALIAÇÃO DOS REGISTROS

Minha participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados do estudo serão divulgados ao nível científico e autoridades de saúde pública a fim de que contribuam para a saúde da população.

Minha identidade permanecerá sempre em confidencialidade.

DIREITO A RETIRADA DO ESTUDO

Eu tenho direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos para mim durante minha participação neste estudo.

Posso me retirar deste estudo, caso queira.

Eu serei notificada com referência a qualquer nova informação relacionada ao estudo. Eu poderei contatar a pesquisadora responsável Júnia Raquel Dutra Ferreira, cujo número de telefone é (92) 3232 6504, para esclarecer qualquer dúvida.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A minha participação neste estudo é voluntária. Se eu recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que tenha direito. Eu tenho o direito de manter uma cópia assinada deste documento.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo.

_____	_____ / ____ / ____
Assinatura do Paciente do Estudo	Data
_____	_____ / ____ / ____
Assinatura da 1ª Testemunha	Data
_____	_____ / ____ / ____
Assinatura da 2ª Testemunha	Data
_____	_____ / ____ / ____
Assinatura do Investigador	Data

APÊNDICE B – Questionário.

QUESTIONÁRIO

I. TRIAGEM

1. Informações sobre o estudo e confiabilidade do estudo
2. Consentimento da paciente em participar do estudo
 - 2.1 () Sim
 - 2.2 () Não
3. Identificação com as iniciais da paciente _____
4. Data de nascimento ____/____/____
5. Última menstruação ____/____/____
 - 5.1 () não sabe informar
 - 5.2 () menopausada
6. Qual a sua procedência? Nasceu: _____ Mora: _____
 - 6.1 () Manaus
 - 6.2 () Interior do estado do Amazonas
 - 6.2 () Outro estado da região norte
 - 6.3 () Outro estado da federação
7. Você já teve seu útero removido (histerectomia)? Fez crio ou termocauterização, laserterapia, quimioterapia, radioterapia ou conização?
 - 7.1 () Sim
 - 7.2 () Não
 - 7.3 () Não sabe informar
8. Resultado do exame colpocitológico:

Data do exame: ____/____/____

 - 8.1. () NIC I
 - 8.2 () NIC II
 - 8.3 () NIC III/Ca “in situ”
 - 8.4 () Carcinoma microinvasor
 - 8.5 () Carcinoma escamoso invasor
 - 8.6 () Adenocarcinoma
9. Resultado de biópsia/exame histopatológico:
 - 9.1. () NIC I
 - 9.2 () NIC II
 - 9.3 () NIC III/Ca “in situ”
 - 9.4 () Carcinoma microinvasor
 - 9.5 () Carcinoma escamoso invasor
 - 9.6 () Adenocarcinoma

II. QUESTIONÁRIO

10. Qual seu estado civil?
 - 10.1 () Solteira
 - 10.1 () União estável
 - 10.2 () Casada
 - 10.3 () Divorciada/separada
 - 10.4 () Viúva
11. Qual o nível mais elevado de escolaridade que você completou?

- 11.1 () Primeiro grau incompleto
- 11.2 () Primeiro grau completo
- 11.3 () Segundo grau incompleto
- 11.4 () Segundo grau completo
- 11.5 () Curso profissionalizante após o segundo grau
- 11.6 () Universidade
- 12. Qual a sua renda familiar?
 - 12.1 () 1 salário mínimo
 - 12.2 () 2-3 salários mínimos
 - 12.3 () 3-4 salários mínimos
 - 12.4 () 5-6 salários mínimos
 - 12.5 () acima de 6 salários mínimos
- 13. Idade da 1ª relação sexual _____
- 14. Idade da 1ª gestação _____
- 15. Você está grávida no momento?
 - 15.1 () Sim
 - 15.2 () Não
 - 15.3 () Não sabe informar
- 16. Nº total de abortos _____
- 17. Nº de partos normais _____
- 18. Nº de partos cesáreos _____
- 19. Nº total de partos _____
- 20. Você utilizou anticoncepcional oral ou injetável nos últimos 10 anos?
 - 20.1 () sim
 - 20.2 () não
- 21. Qual das seguintes situações melhor descrevem o seu hábito de fumar?
 - 21.1 () Eu nunca fumei
 - 21.2 () Eu fumei no passado, mas não fumo atualmente
 - 21.3 () Eu geralmente fumo menos de uma carteira por dia
 - 21.4 () Eu geralmente fumo em torno de uma carteira ou mais por dia
- 22. Qual o número de parceiros sexuais que você já teve na vida?
 - 22.1 () um
 - 22.2 () dois
 - 22.3 () três
 - 22.4 () quatro
 - 22.5 () cinco ou mais
- 23. Pesquisa para HIV:
 - 25.1 () nunca fez exame
 - 25.2 () negativo
 - 25.3 () positivo

1. OBSERVAÇÕES:

2. RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO:

3. RESULTADO DA PCR:

4 p53:

ANEXO 1 - Protocolo de seqüenciamento.

Preparar o mix com enzimas

Incubar no Termociclador

0,34 uL de EXO (3,3U) X 110 = 34uL

30 min – 37 °C

0,66 uL de SAP (0,66U) X 110 = 66uL

15 min – 80 °C

Adicionar 1uL a cada 6 uL de produto de PCR e incubar no termociclador.

EXO: Exonuclease

SAP: Fosfatase alcalina de camarão

O produto está pronto para a etapa de reação de seqüenciamento.

2. REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Para o seqüenciamento, usamos as seguintes condições de reação.

Concentração em ng de DNA (abaixo)

Produto de PCR até 900 pb	50 ng
Produto de PCR acima de 900 pb	100 ng
Plasmídios	200 ng

Primers para seqüenciamento devem estar na concentração de 5,0 pmoles.

Reagentes

Quantidade

Quantidade para 01 placa

1. TRATAMENTO DO PRODUTO DE PCR ATRAVÉS DA ENZIMA EXO-SAP

H ₂ O Mili-Q	4,0µL	x 105 =420,00
Pré-mix	2,0µL	x 105 =210,00
Primer (5pmol/uL)	1,0µL	x 105 =105,00
DNA (PCR)	3,0µL	-----
Volume final	10 µL	

Condições de ciclagem:

95°C	15 seg.	.
55°C	20 seg.	35 ciclos
60°C	1:20 min.	
04° C	Forever	

3. PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.

Para 10,0 µl da reação usa-se:

- ✓ 1,0 µL de acetato de amônia
- ✓ 27,5 µL etanol absoluto.

1. Adicionar 1 µL acetato de amônio e dar um spin,
2. Adicionar 27,5µL de etanol absoluto 100 %, selar bem (selo resistente a álcool) e então vortexar vigorosamente por 1 minuto (FUNDAMENTAL)
3. Incubar 20 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz, coberto com papel laminado.
4. Centrifugar 40 min 4000 g a 4 °C.
5. Virar a placa e despejar o conteúdo (com bastante força).
7. Centrifugar 10 min (na máxima velocidade de qualquer centrífuga) 4 °C.
8. Virar a placa e despejar o conteúdo, com força.
9. Centrifugar um pulso de alguns segundos com a placa invertida (não passar 700 g)
10. Deixar secar até evaporar o etanol (15 minutos)
11. Adicionar 10 µl de loading buffer e vortexar muito bem (FUNDAMENTAL!)
12. Selar com selo resistente a álcool e centrifugar a placa por um pulso de alguns segundos (não passar 700 g)

Seqüenciar no equipamento MegaBace.

Precipitação com acetato de amônio

6. Adicionar 120 µL de etanol 70% por poço. Selar bem com o mesmo selo e vortexar por alguns segundos.

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Andamento do projeto - CAAE - 0013.0.252.000-05				
Título do Projeto de Pesquisa				
Relação entre o polimorfismo da proteína p53, a infecção pelo HPV e o risco de câncer cervical em pacientes atendidas na rede pública Manaus, Amazonas.				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na
Aprovado no CEP	28/11/2005 16:35:58	01/12/2005 16:10:15		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	25/11/2005 12:21:56	Folha de Rosto	FR79923	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	28/11/2005 16:35:58	Folha de Rosto	0013.0.252.000-05	
3 - Protocolo Aprovado no CEP	01/12/2005 16:10:15	Folha de Rosto	013/2005	

[Voltar](#)



FCECON

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas aprovou, em reunião ordinária nesta data, por unanimidade de votos, o projeto de pesquisa cadastrado no SISNEP de nº 0013.0.252.000-05, intitulado **“Relação entre polimorfismo da proteína p53, a infecção pelo HPV e o risco de câncer cervical em pacientes atendidas na rede pública de Manaus, Amazonas”**, tendo como pesquisadora responsável Júnia Raquel Dutra Ferreira.

Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas.

FUNDAÇÃO CENTRO DE CONTROLE DE ONCOLOGIA - FCECON
SERVIÇO DE APOIO ADMINISTRATIVO

Edson de Oliveira Andrade

C. R. M. Nº 1877

Manaus, 01 de dezembro de 2005.

Manaus, 28 de junho de 2006

Aos Srs. Membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia de Manaus

Assunto: Solicitação de alteração de projeto de pesquisa

Anexos: Projeto de pesquisa alterado, aprovação pelo CEP-FCECON, Dados do SISNEP, Questionário

Vimos, por meio desta, solicitar a este seletivo comitê que nos autorize a proceder às seguintes correções no projeto de pesquisa intitulado **“Relação entre o polimorfismo da proteína p53, a infecção pelo HPV e risco de câncer cervical em mulheres atendidas na rede pública de saúde de Manaus, Amazonas”** sugeridas pela banca de avaliação deste, quando da aula de qualificação. Salientamos que as alterações estabelecidas não alteram o cerne deste trabalho, já aprovado por este comitê sob o CAAE 0013.0.252.000-05 e nº de aprovação 013/2005, somente vindo a enriquecê-lo com a ampliação dos aspectos abordados e do universo amostral.

- O título foi resumido, passando a ser: “Análise do polimorfismo da proteína p53 e a infecção pelo HPV em pacientes com lesões cervicais escamosas intraepiteliais e neoplásicas atendidas em Manaus, Amazonas”

- O objetivo geral segue o título, sendo: Analisar o polimorfismo da proteína p53 e a infecção pelo HPV em pacientes com lesões cervicais escamosas intraepiteliais e neoplásicas atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas, Manaus.

- Nos objetivos específicos, adicionou-se: Levantar os fatores sócio-econômico-culturais que possam estar relacionados às lesões cervicais nas pacientes estudadas.

- Na metodologia, as pacientes selecionadas são as mesmas atendidas na triagem da Ginecologia, porém com diagnóstico histopatológico de lesões cervicais escamosas intraepiteliais e neoplásicas (NIC I, NIC II, NIC III, Carcinoma invasor), totalizando de 160 pacientes, devido a mudança do modelo de estudo de caso-controle para descritivo, julgado pela banca o mais adequado.

Recebi
Em: 03.07.06
00 09h40
[Assinatura]

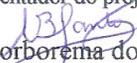
[Assinatura]

- Será aplicado um questionário (anexo) às pacientes com a finalidade de abordar os principais fatores sócioeconômicos-culturais que possam estar relacionados às lesões cervicais, descritos na literatura, sendo o mesmo adotado pelo Dr. Gilson José Corrêa, em seu projeto de mestrado previamente aprovado pelo CEP desta instituição.

Certos da presteza deste comitê no julgamento desta, subscrevemo-nos,



Spartaco Astolfi Filho
Orientador do projeto



Cristina Maria Borborema dos Santos
Co-orientadora do Projeto



Júnia Raquel Dutra Ferreira
Pesquisadora responsável
Aluna do mestrado em
Patologia Tropical - UFAM



Dr. Gilson José Corrêa
Coordenador do Projeto na
FCECON-AM

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](#)