

# **PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO COLO DO ÚTERO E NO SANGUE DE MULHERES GESTANTES E NÃO GESTANTES**

**Autor: Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo  
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira  
Co-orientador: Profa. Dra. Andréa Souto Damin  
Prof. Dr. Claudio O. Pereira Alexandre**

**UFSCA**  
**Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como  
requisito para a obtenção do grau de Doutor**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE**

**PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO  
COLO DO ÚTERO E NO SANGUE DE  
MULHERES GESTANTES E NÃO  
GESTANTES**

**Autor: Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo  
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira  
Coorientador: Profa. Dra. Andréa Souto Damin  
Prof. Dr. Claudio O. Pereira Alexandre**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como  
requisito para a obtenção do grau de Doutor**

S161p Salcedo, Mila de Moura Behar Pontremoli  
Prevalência de infecção por papilomavírus humano no colo do útero e no sangue de mulheres gestantes e não gestantes / Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo. – Porto Alegre, 2010.  
91 f. : il.

**Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia –  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2010.**

Orientador: Gustavo Py Gomes da Silveira

Coorientador: Andréa Souto Damin

Cláudio Osmar Pereira Alexandre

1. Papillomavirus humano. 2. Gravidez. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Título. II. Silveira, Gustavo Py Gomes da. III. Damin, Andréa Souto. IV. Alexandre, Cláudio Osmar Pereira.

CDD 616.911

À minha família, com muito amor:  
Conrado, Maitê e Mariah (que está  
por chegar).

Dedicatória Especial:

Dedico este trabalho a uma pessoa muito especial que sempre me incentivou. Meu querido Tio, Padrinho e Mestre

Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem (*in memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram, para que fosse possível atingir esse objetivo e sonho.

Primeiramente agradecer ao meu orientador e mestre especial, Prof. Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira, que muito me apoiou, não só neste projeto, mas na minha vida profissional. E principalmente, agradecer por ele acreditar no meu trabalho.

Aos meus coorientadores: Profa. Dra. Andréa Pires Souto Damin por todo o auxílio desde a elaboração do projeto, no Laboratório de Biologia Molecular e na finalização da tese; Prof. Dr. Cláudio O. Pereira Alexandre por oportunizar o trabalho no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

À amiga Grasiela Agnes por toda a dedicação, trabalho e auxílio no Laboratório de Biologia Molecular

À Profa. Dra. Patrícia El Beitune por todo o carinho e incentivo desde o início do projeto.

Aos Professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFCSPA e aos instrutores da residência de Ginecologia pelo apoio e disponibilidade nos ambulatórios.

À Profa. e amiga Dra. Suzana Pessini pelas oportunidades, palavras e por me incentivar em momentos muito importantes.

Às alunas exemplares Mauren Fronckowiak Salis e Razyane Audibert Silveira (estudantes de medicina) pelo auxílio no Laboratório de Biologia Molecular e pela dedicada colaboração.

À Eleonora Liberato Petzhold pelas informações impecáveis e imediatas na biblioteca.

À Secretária do Programa de Pós-graduação em Patologia Maristela Pasin pelo auxílio e atenção.

À Ceres Oliveira pelos auxílios na análise estatística.

Aos Serviços de Ginecologia e de Obstetrícia da Santa Casa de Porto Alegre, representados por seus Chefes Prof. Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira e Prof. Dr. Antônio Celso Ayub.

Aos residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFCSPA que me ensinam a cada dia e tornam a minha vida profissional ainda mais prazerosa e gratificante.

Aos meus mestres da Ginecologia e da Obstetrícia por todos os ensinamentos e por terem me ajudado a chegar até este momento.

A todos os colegas que, com seus conhecimentos, experiências e disponibilidade, colaboraram na execução desse trabalho.

À minha família pela incansável compreensão.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1.1. Câncer de colo do útero	3
1.1.1.1. Epidemiologia	3
1.1.1.2. Aspectos clínicos	4
1.1.1.3. Fatores de risco	5
1.1.1.4. Exame citopatológico (Papanicolaou)	5
1.1.1.5. Lesões pré-neoplásicas do câncer de colo do útero	6
1.1.2. Papilomavírus humano (HPV)	10
1.1.2.1. Estrutura e classificação viral	10
1.1.2.2. Fatores de risco do HPV	14
1.1.2.3. Métodos de detecção do HPV	15
1.1.2.4. Epidemiologia	17
1.1.2.5. Papel oncogênico do HPV	19
1.1.2.6. Aspectos clínicos	26
1.1.2.7. HPV e gestação	27
1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
2. OBJETIVOS	42
3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	43
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
6. ANEXOS	85
1. PROTOCOLO DA COLETA DE DADOS	86
2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	88
3. FIGURAS	90

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ASCUS	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> - Atipia de Células Escamosas de Significado Indeterminado
ASC	<i>Atypical squamous cells</i> - Atipias de Células Escamosas
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHSCPA	Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre
DB	<i>Dot Blot</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - ácido desoxirribonucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EUA	Estados Unidos da América do Norte
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
HCS	Sistema de Captura Híbrida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	<i>Human papillomavirus</i> - Papilomavírus Humano
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> ou LIAG – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência Internacional para Pesquisa no Câncer
IBSCC	<i>The International Biological Study on Cervical Cancer – Study Group</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISH	Hibridização <i>in situ</i>

LCR	<i>Long Control Region</i> – Região Controladora não Codificante
LEEP	<i>Loop Electrosurgical Excision Procedure</i>
LLETZ	<i>Large Loop Excision of the Transformation Zone</i>
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> ou LIBG – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
M	Mitose
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Tampão fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – ácido ribonucleico
S	Síntese
SB	<i>Southern Blot</i>
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> - Região Controladora Não Codificante

## Resumo da Tese

O câncer de colo uterino, na escala global, é o segundo mais frequente em mulheres no mundo, e sua etiopatogenia está relacionada à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Estudos sugerem que o processo fisiológico da gravidez altera o comportamento do HPV. Entretanto, os resultados permanecem conflitantes. O presente estudo foi conduzido para investigar a presença de HPV no colo uterino e em amostras de sangue de grávidas e não grávidas do sul do Brasil pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A presença de HPV foi correlacionada com os principais fatores de risco do câncer de colo uterino. **Métodos:** Noventa e uma gestantes e noventa e duas não gestantes foram prospectivamente incluídas no estudo. Elas foram entrevistadas e submetidas a exame citopatológico e colposcopia. Amostras de sangue e do colo do útero foram coletadas em cada trimestre e no puerpério. Todas as amostras foram analisadas através de PCR com *primers consensus* GP5+/GP6+. A genotipagem foi realizada usando *primers* específicos. **Resultados:** O DNA do HPV foi encontrado em 23/91 (25,3%) das amostras cervicais das mulheres grávidas e em 12/92 (13%) das amostras cervicais das mulheres não grávidas ( $P=0,035$ ). Há uma associação significativa entre infecção pelo HPV e idade mais jovem, número de parceiros sexuais na vida e alterações citopatológicas no colo do útero. HPV 16 e 18 foram os mais frequentemente detectados nas gestantes e não gestantes: HPV 16 em 34,8% e 50% e HPV 18, 56,5% e 75%, respectivamente. Das 23 gestantes positivas, 17 (73,9%) apresentavam exame citopatológico normal. Não foi detectado DNA do HPV nas amostras de sangue de ambos os grupos. **Conclusão:** Há uma prevalência significativamente maior de infecção pelo HPV durante a gestação.

Esse achado pode estar relacionado com a imunomodulação, observada em mulheres grávidas, destacando a importância do diagnóstico precoce da infecção viral nessa população específica.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é responsável pelo óbito de aproximadamente 230.000 mulheres por ano no mundo todo (Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2010). Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos mais desenvolvidos. O número de casos novos de câncer de colo uterino estimados para o Brasil para o ano de 2010 é de 18.430, com risco estimado de 18 casos por 100.000 mulheres. O Rio Grande do Sul apresenta uma estimativa para 2010 de 21,53/100.000 e Porto Alegre de 25,55/100.000 (INCA, 2010). O câncer de colo do útero apresenta marcadas diferenças epidemiológicas geográficas (Silveira, 2008). É o câncer mais frequentemente diagnosticado na gestação, ainda que seja uma situação incomum (Creasman, 2001).

O câncer de colo do útero é uma doença evitável, principalmente, porque a detecção de lesões pré-neoplásicas (intraepiteliais) assintomáticas e sua erradicação, diagnóstico precoce e seguimento adequados podem impedir a ocorrência de lesões mais avançadas, na maioria dos casos (Andrade e cols., 2001; Andrade e Marana, 2001). Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 51% a 66%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estádios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é menor, cerca de 41% em cinco anos (INCA, 2010).

Existem fatores de risco bem documentados para o câncer de colo uterino, sobressaindo as infecções genitais pelo Papilomavírus humano (HPV) (Boyle e Smith, 1999; Crum, 2005; Silveira 2008; INCA, 2010). Há evidências crescentes que ligam o HPV a vários tipos de câncer e ao câncer cervical, em particular

(INCA, 2010; *National Cancer Institute* - NCI, 2010; Palefsky e Cranston, 2010; Reichman, 2010). De acordo com o NCI, o câncer de colo do útero é, quase sempre, causado pelo HPV (NCI, 2010). A contaminação pelo HPV pode ocorrer por vários mecanismos (zur Hausen e de Villiers, 1994). Teoricamente, a transmissão *in utero* do HPV pode ocorrer via hematogênica, pelo sêmen ou por infecção ascendente materna (Syrjanen e Puranen, 2000).

Alguns fatores de risco para infecção pelo HPV incluem múltiplos parceiros sexuais, uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo e pacientes com imunidade reduzida, como transplantados, com HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e gestantes (Ferenczy e Jenson, 1997; Franco, 1997).

Os métodos de detecção do HPV têm se tornado gradualmente mais precisos e específicos com a identificação direta do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) viral (Zahm e cols., 1999). Os testes que utilizam a amplificação do DNA, a exemplo da reação em cadeia da polimerase (PCR), apresentam maior sensibilidade quando comparados com outras técnicas de detecção do HPV (Lörincz, 1997; Zahm e cols., 1999).

Estimativas da prevalência de infecção pelo HPV variam amplamente, dependendo do método de diagnóstico e das características demográficas e de comportamento da população em estudo (Spitzer e Burk, 2005).

Poucos estudos têm fornecido informações a respeito da influência da gestação nas taxas de infecção pelo HPV. Dependendo do estudo, a detecção do HPV em mulheres grávidas tem se mostrado maior ou similar à infecção pelo HPV em mulheres não grávidas. Para melhor elucidar esta questão, o presente estudo tem o objetivo de avaliar as taxas de HPV em gestantes, comparando-as com as de mulheres não gestantes.

## **1.1. REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1.1. Câncer de colo do útero**

#### **1.1.1.1. Epidemiologia**

No ano de 2008, foi estimado que ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos no mundo. Pelas estimativas, 489 mil novos casos de câncer deverão ocorrer no Brasil em 2010. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele tipo não melanoma, serão os cânceres de mama e de colo do útero na população feminina. O câncer de colo uterino é responsável pelo óbito de aproximadamente 230.000 mulheres por ano no mundo todo (INCA, 2010). Nos Estados Unidos da América (EUA), a estimativa para o ano de 2009 é de 11.270 casos novos e de 4.070 mortes por câncer do colo do útero (NCI, 2010). Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos mais desenvolvidos. A incidência de 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, geralmente na faixa etária de 40 a 49 anos (Silveira, 2008; INCA, 2010).

O número de casos novos de câncer de colo uterino previstos para o Brasil para o ano de 2010 é de 18.430, com risco estimado de 18 casos por 100.000 mulheres. O câncer de colo do útero é o mais incidente na região Norte (23/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000) ocupa a segunda posição. Nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000) ocupa a terceira posição. O Rio Grande do Sul apresenta uma estimativa para 2010 de 21,53/100.000 e Porto Alegre de 25,55/100.000 (INCA, 2010). No Registro de Câncer do Hospital Santa Rita, da Santa Casa de Porto Alegre, esse câncer corresponde a 20% das neoplasias malignas em pacientes do sexo



feminino, com 2.404 casos no período de 1997 a 2001, sendo o segundo tumor maligno mais frequente em mulheres (Zelmanowicz e Costa, 2006).

O câncer de colo do útero apresenta marcadas diferenças epidemiológicas geográficas (Silveira, 2008). É o mais frequentemente diagnosticado na gestação, ainda que seja uma situação incomum (Creasman, 2001).

#### **1.1.1.2. Aspectos clínicos**

Até a década de 90, o teste Papanicolaou convencional constituiu-se na principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados ao controle do câncer do colo do útero. Novos métodos de rastreamento, como testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo do útero utilizando ácido acético ou lugol, são apontados, em vários estudos, como eficazes na redução das taxas de mortalidade por esse tipo de câncer (INCA, 2010).

Nenhum outro tipo de câncer documenta melhor o notável efeito da prevenção, do diagnóstico precoce e da terapia curativa sobre a taxa de mortalidade. Há 50 anos, o carcinoma do colo uterino era a principal causa de morte por câncer em mulheres nos EUA; entretanto, a taxa de mortalidade declinou em dois terços até seu nível atual como oitava causa de morte por câncer nos EUA (Crum, 2005). Em acentuado contraste com essa mortalidade reduzida, a frequência de detecção de cânceres em estádios iniciais e de condições pré-cancerosas apresenta-se elevada. Muitos atribuem essas notáveis vitórias à eficácia do teste citológico de Papanicolaou na detecção de pré-cânceres cervicais (Rivoire e cols., 2001; Crum, 2005; Silveira 2008) e ao fácil acesso do colo uterino à colposcopia e biópsia (Crum, 2005). Contudo, no Brasil, ao contrário dos países desenvolvidos, esta neoplasia vem mantendo índices

elevados, com um aumento de 29% na sua incidência, comparando as duas últimas décadas (Bittencourt e cols., 2004).

### **1.1.1.3. Fatores de risco**

Para compreensão da patogenia do câncer cervical, torna-se necessário o conhecimento dos fatores de risco já estabelecidos: idade precoce na primeira relação sexual, múltiplos parceiros sexuais e um parceiro com múltiplas parceiras sexuais atuais ou anteriores (Boyle e Smith, 1999; Schoell e cols., 1999; Andrade e cols., 2001; Thomas e cols., 2001; Crum, 2005; Silveira, 2008; INCA, 2010). Há outros fatores de risco descritos, como o uso prolongado de anticoncepcionais orais (Nicolau, 2002; Smith e cols., 2003; Crum, 2005; Vaccarella e cols., 2006; Silveira, 2008; INCA, 2010), o tabagismo, as infecções genitais associadas, como HPV (Boyle e Smith, 1999; Andrade e cols., 2001; Nicolau, 2002; Crum, 2005; Silveira 2008; INCA, 2010), a paridade (Schoell, 1999; Andrade e cols., 2001; Crum, 2005; Vaccarella e cols., 2006; Silveira, 2008), a imunodepressão e imunossupressão e as radiações ionizantes (Silveira, 2008).

### **1.1.1.4. Exame citopatológico (Papanicolaou)**

Para a prevenção primária do câncer de colo do útero e/ou secundária de seus estádios iniciais, a estratégia principal reconhecida é a detecção precoce por meio do exame preventivo de Papanicolaou periódico e educação sexual (Andrade e cols., 2001; Nicolau, 2002; INCA, 2010). Além disso, conta-se com a facilidade de acesso ao colo do útero para a realização da colposcopia e biópsia (Crum, 2005). O exame citopatológico (Papanicolaou) apresenta falso-negativo que pode ser atribuído à amostra inadequada, a problemas na preparação da

lâmina e/ou a erros na interpretação (Akpolat e cols., 2004). A citologia cervical apresenta sucesso em reduzir mortalidade por câncer de colo uterino (Lundberg, 1989; Crum, 2005), quando utilizada em programas organizados de rastreamento (Melnicow e cols., 1998). O uso da citologia para triagem e prevenção é baseado na premissa de que o câncer cervical se desenvolve gradualmente na maioria das mulheres e que lesões precursoras do câncer e cânceres iniciais podem ser detectados por citologia; sendo assim, o tratamento desses achados irá contribuir para a redução da mortalidade dessa doença (Melnicow e cols., 1998; Crum, 2005). O tratamento das lesões escamosas intraepiteliais cervicais (lesões precursoras do câncer de colo uterino) é muito bem aceito como profilaxia contra o câncer de colo uterino (Hellberg e cols., 1994).

#### **1.1.1.5. Lesões pré-neoplásicas do câncer de colo do útero**

As lesões pré-neoplásicas foram classificadas de várias maneiras. O sistema mais antigo é o que divide em displasias leves, moderadas e acentuadas, sendo a terminologia de carcinoma *in situ* reservada para as formas mais graves entre as não invasoras (Andrade e Marana, 2001; Crum, 2005). Outro sistema empregado é a classificação da neoplasia intraepitelial cervical (NIC), introduzido por Richart (1973). Nessa classificação, a antiga displasia leve corresponderia ao NIC I. A categoria NIC II teria a expressão citológica da displasia moderada, e sob a denominação NICIII são englobados a displasia acentuada e o carcinoma *in situ* sob o argumento de que não há diferença entre a conduta empregada para essas duas últimas. Além do que, ambas apresentam grande potencial para invasão e taxas de reversibilidade baixas, assim sendo consideradas como lesões de alto grau ou de alto risco (Richart, 1973). Algumas técnicas novas levaram à

conclusão de que as alterações citológicas induzidas pelo HPV e NIC I eram equivalentes, da mesma forma que o eram as lesões classificadas como NIC II e NIC III. Por isso, em 1998, em Bethesda, em um simpósio patrocinado pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos adotou-se uma nova classificação para a terminologia citológica. Na classificação de Bethesda foi recomendada a subdivisão em duas categorias: lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau ou de baixo risco de evolução para formas mais graves (NIC I e condiloma) e lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (NIC II e NIC III). Esta classificação deve ser empregada para a citologia e não para laudos histopatológicos. O achado de células escamosas que não sejam claramente indicação de presença de câncer deve ser relatado como células escamosas atípicas de significado incerto – ASCUS ou ASC (nomenclatura atual) (Lundberg e cols., 1989; Luff, 1992) (Tabela 1).

**Tabela 1.** The 2001 Bethesda System (Abreviado). Adaptado de Solomon e cols. 2002.

<p><b>Adequabilidade do espécime</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Satisfatório para avaliação (anotar presença/ausência de células endocervicais e de componentes da zona de transformação)</li> <li>- Insatisfatório para avaliação (especificar a razão)</li> <li>- Espécime rejeitado/não processado (especificar a razão)</li> <li>- Espécime processado e examinado, mas insatisfatório para avaliação de anormalidade epitelial (especificar a razão)</li> </ul>
<p><b>Interpretação/resultado</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organismos: <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Trichomonas vaginalis</i></li> <li>Fungos (<i>Cândida</i> sp.)</li> <li>Alterações da flora sugestivas de vaginose bacteriana</li> <li>Bactérias morfológicamente sugestivas de <i>Actinomyces</i> sp</li> <li>Alterações celulares compatíveis com <i>Herpes simplex</i> virus</li> </ul> </li> <li>• Outros achados não neoplásicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações celulares reativas associadas com: <ul style="list-style-type: none"> <li>Inflamação (inclui reparos típicos)</li> <li>Radiação</li> <li>Dispositivos anticoncepcionais intrauterinos (DIU)</li> <li>Células glandulares pós-histerectomia</li> <li>Atrofia</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> <li>- Outros <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células endometriais em mulheres <math>\geq</math> 40 anos</li> </ul> </li> <li>- Células epiteliais anormais <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células escamosas <ul style="list-style-type: none"> <li><u>Atypical squamous cells</u> (ASC) <ul style="list-style-type: none"> <li><i>of undetermined significance</i> (ASC-US)</li> <li><i>cannot exclude HSIL</i> (ASC-H) [Células atípicas de significado indeterminado, não podendo excluir HSIL]</li> <li><u>Low-grade squamous intraepithelial lesion</u> (LSIL) [Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau]: inclui lesão de HPV, displasia leve, Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I</li> <li><u>High-grade squamous intraepithelial lesion</u> (HSIL) [Lesão intraepitelial escamosa de alto grau]: inclui displasia moderada ou grave, carcinoma <i>in situ</i>, NIC II e NIC III</li> <li><u>Carcinoma de células escamosas</u></li> </ul> </li> <li>• Células glandulares <ul style="list-style-type: none"> <li>Atypical glandular cell (AGC) [Células glandulares atípicas]</li> <li>Células glandulares atípicas favoráveis à neoplasia</li> <li>Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i> (AIS)</li> <li>Adenocarcinoma</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

As lesões pré-cancerosas não irão evoluir invariavelmente para câncer. O estudo da história natural das NIC demonstrou que as lesões de baixo grau têm grande chance de regressão espontânea, enquanto que as de alto grau têm

grande chance de progressão (Ostör, 1993; Melnicow e cols., 1998). Ostör, em 1993, apresentou uma metanálise em que revisou trabalhos desde 1950. O autor concluiu que NIC I tem taxa de regressão da ordem de 57%. Segundo Ostör (1953), as taxas de progressão de NIC I ou NIC II para NIC III são 11% e 22% e para câncer invasor 1% e 5%, respectivamente. As taxas de regressão de NIC II e NIC III são 43% e 32%, respectivamente, o que demonstra que mesmo lesões com atipias de graus mais elevados podem regredir (Ostör, 1993). Segundo a metanálise de Melnicow e cols. (1998), em que foram avaliados estudos de 1970 a 1996, com acompanhamento por, no mínimo, seis meses, antes de qualquer tratamento as taxas de regressão para o normal foram: ASCUS 68,19%, lesão intraepitelial cervical de baixo grau 47,39%, lesão intraepitelial cervical de alto grau 35,03%. Foi considerado regressão: dois citopatológicos consecutivos negativos. Neste mesmo estudo, com relação às taxas de progressão em 24 meses, ASCUS e lesão intraepitelial cervical de baixo grau progrediram para câncer invasivo em menos de 1% dos casos (Melnicow e cols., 1998).

Os eventos que conduzem à progressão ou à regressão das lesões precursoras do câncer de colo uterino são, além dos fatores mecânicos, os imunológicos, infecciosos, químicos e possivelmente ainda estão associados os fatores nutricionais. Já foi demonstrado que o parto é um trauma que pode erradicar a NIC, esfoliando células anormais (Hellberg e cols., 1994). O risco de progressão de NIC II ou III para câncer invasor do colo uterino durante a gestação é mínimo, e a taxa de regressão espontânea pós-parto é relativamente alta. (Wright e cols., 2003). Uma abordagem conservadora, nestes casos, parece ser o mais prudente (Loomis e cols., 2009). Entretanto, as pacientes imunossuprimidas por infecção pelo HIV apresentam uma alta taxa de recorrência ou persistência de

NIC II ou NICIII após tratamento. O nível do risco está correlacionado com o nível da imunossupressão (Wright e cols., 2003).

As técnicas empregadas no tratamento de pacientes com neoplasia pré-invasiva da cérvix uterina incluem tratamentos destrutivos - como diatermocoagulação, criocauterização, vaporização com laser - ou ablativos - como conização convencional a frio, conização por cirurgia de alta frequência com alça (CAF: cirurgia de alta frequência; LEEP: loop electrosurgical excision procedure; LLETZ: large loop excision of the transformation zone) ou conização por laser (Andrade e cols., 2001; Wright e cols., 2003; Pessini e cols., 2008).

### **1.1.2. Papilomavírus humano (HPV)**

#### **1.1.2.1. Estrutura e classificação viral**

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus icosaédrico, não envelopado e composto por DNA circular de dupla fita com 7.900 pares de bases (Chang, 1990; Wolf e Ramirez, 2001; Nicolau, 2002), seu peso molecular é de  $5,2 \times 10^6$  daltons e é membro da família *Papillomaviridae* (Chang, 1990; Nicolau, 2002).

O genoma viral é organizado em três regiões. Duas regiões codificadoras que expressam oito proteínas virais: duas proteínas de aparecimento tardio no ciclo de vida viral denominadas L1 e L2, que formam o capsídeo, e seis proteínas de aparecimento precoce denominadas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão relacionadas à infectividade, manutenção do vírus na célula hospedeira e proliferação viral (Wolf e Ramirez, 2001), funções reguladoras da atividade celular (Nicolau, 2002). A terceira região não tem capacidade de codificação proteica, mas atua como reguladora, sendo denominada LCR (*long control region*) ou URR

(*upstream regulatory region*) que, por sua vez, controla a transcrição dos genes virais (Boyle e Smith, 1999; Wolf e Ramirez, 2001). Todos os tipos de HPV possuem a estrutura do genoma basicamente organizada com as mesmas características (zur Hausen e de Villiers, 1994).

Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados até o momento (Spitzer e Burk, 2005; INCA 2010). Esses tipos são definidos pela análise da sequência de DNA que apresentam. Quando existe menos de 50% de semelhança com outros membros, é definido outro tipo e dado um número na ordem de descoberta. Se a semelhança é maior do que 50% caracteriza-se um subtipo e, se for próxima de 100%, os vírus são considerados variantes do mesmo tipo (Chang, 1990). Outra maneira de classificar um novo tipo é baseada na sequência dos nucleotídeos de uma região específica dos genes E6, E7 e L1 (aproximadamente um terço do genoma). Quando há uma diferença maior do que 10% das sequências originais já estudadas, descreve-se um novo tipo (zur Hausen e de Villiers, 1994; Wieland e Pfister, 1999). A maioria dos HPVs conhecidos já foi completamente sequenciada e agrupada conforme a superfície epitelial que costuma infectar no hospedeiro e conforme a homologia da sequência de seu DNA (zur Hausen e de Villiers, 1994) (Tabela 2).

Eles infectam células epiteliais e têm a capacidade de causar lesões na pele ou mucosas. Causam diversos tipos de lesões como a verruga comum e a verruga genital ou condiloma que têm crescimento limitado e, com frequência, regridem espontaneamente (Chang, 1990; Nicolau, 2002).



**TABELA 2.** Tipos de HPV classificados conforme sua homologia na sequência de DNA e associação com lesões clínicas. Adaptado de Wieland e Pfister, 1999.

<b>Lesões Clínicas</b>	<b>Tipos de HPV</b>
Cutâneos/associados à epidermodisplasia Verruciforme	14,19,20/46*,21,25
	9,15,17,37,38
	5,8,12,36,47
	22,23
	24
	49
	50
Cutâneos	1,63
	4,48,60,65
	41
Cutâneos/mucosos	2,27,57
	3,10,28,29
	7,40,43
	61,62,72
Mucosos	6,11,13,44,55
	16,31,33,35,52,58,67
	18,39,45,59,68,70
	26,51,69
	30,53,56,66
	32,42
	34,64,73
	54

\* Foi demonstrado que o HPV 46 é um subtipo do HPV 20.

A contaminação pelo HPV pode ocorrer por vários mecanismos (zur Hausen e de Villiers, 1994). Os tipos virais causadores de lesões cutâneas são geralmente adquiridos por microtraumas na pele (zur Hausen e de Villiers, 1994;

Wieland e Pfister, 1999; Carvalho e Oyakawa 2000), por autoinoculação ou por contato direto com lesões de outra pessoa (Wieland e Pfister, 1999; Syrjanen e Puranen, 2000). Em lesões anogenitais, a transmissão sexual é a mais frequente (Wieland e Pfister, 1999; Barcellos, 2008; Carvalho e Oyakawa 2000; Reichman, 2010). A transmissão através de fômites é provável (Carvalho e Oyakawa, 2000; Syrjanen e Puranen, 2000; Palefsky e Cranston, 2010). Já foi documentada, a detecção do DNA viral, em toalhas e materiais utilizados por pacientes infectados (Strauss e cols., 2002).

Teoricamente, a transmissão *in utero* do HPV pode ocorrer via hematogênica, pelo sêmen ou por infecção ascendente materna; porém a transmissão hematogênica vinha sendo considerada improvável, já que o HPV é conhecido multiplicando-se localmente no sítio de entrada na pele ou mucosa, e não tinha sido divulgada nenhuma prova da disseminação hematogênica do vírus até final da década de 90 (Syrjanen e Puranen, 2000). Foi amplamente aceito que o HPV não sofre disseminação hematogênica para outros sítios, ou seja, não há fase de viremia no curso da infecção pelo HPV. No entanto, a transmissão bem-sucedida do papilomavírus bovino tipo 2 em sangue periférico levanta a possibilidade de que o HPV possa, em algumas circunstâncias, ser distribuído através de uma via hematogênica (Stocco dos Santos e cols., 1998). Além disso, o DNA do HPV foi detectado no sangue periférico, em células mononucleares (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMCs) (Pao e cols., 1991), soro (Liu e cols., 2001) ou plasma (Dong e cols., 2002) de pacientes com câncer do colo do útero ou carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço associados ao HPV (Capone e cols., 2000). Portanto, deve ser considerado que as PBMCs poderão servir como carreadoras do HPV durante o curso da infecção (Bodaghi e

cols., 2005). A maioria dos estudos que encontraram HPV em PBMCs foram realizados em pacientes imunodeprimidos ou com lesões relacionadas ao HPV ou câncer, e as taxas de prevalência são variáveis (Bodaghi e cols., 2005; Ho e cols., 2005). Nas mulheres grávidas a taxa de infecção por HPV no sangue varia de 6,1% a 17,3% (Tseng e cols., 1992; Gagewska e cols., 2005; Rombaldi e cols., 2008).

A infecção pelo HPV pode manifestar-se de três formas: a primeira ocorre como uma infecção latente quando o genoma do HPV estabiliza-se de forma não integrada, como um epissoma, e permanece na célula hospedeira sem determinar dano; a segunda, como uma infecção ativa na qual o vírus sofre multiplicação (replicação viral ativa), que resulta em uma proliferação celular acelerada característica dos tumores benignos (é uma função das interações entre a célula e o vírus, fatores de suscetibilidade do hospedeiro e diversos cofatores); a terceira, de caráter oncogênico, ocorre quando o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira alterando o controle da proliferação celular pela ação sobre os genes supressores tumorais (Ferenczy e Jenson, 1997).

#### **1.1.2.2. Fatores de risco do HPV**

Os fatores de risco conhecidos para infecção por HPV são história de múltiplos parceiros sexuais, tabagismo (Franco, 1997; Hernández-Girón e cols., 2005), uso prolongado de anticoncepcionais orais (Franco, 1997) e pacientes com imunidade reduzida, como transplantados, com HIV (Ferenczy e Jenson, 1997; Franco, 1997; Sahasrabuddhe cols., 2010) e gestantes (Ferenczy e Jenson, 1997; Franco, 1997). Alguns fatores de risco permanecem em estudo, como a circuncisão nos parceiros sexuais, já que alguns autores sugerem menores taxas

de infecção pelo HPV em homens circuncidados (Dunne e Markowitz, 2006; Reichman, 2010).

### **1.1.2.3. Métodos de detecção do HPV**

Com relação ao diagnóstico do HPV, o exame citopatológico ou Papanicolaou é o exame preventivo mais comum e detecta as alterações que o vírus pode causar nas células. Outras formas diagnósticas são: inspeção do colo uterino com ácido acético e colposcopia para identificar as lesões causadas pelo vírus. Para confirmação diagnóstica, pode-se utilizar a biópsia com avaliação histopatológica do fragmento de colo uterino suspeito de alteração (Nicolau, 2002).

Os métodos de detecção do HPV têm se tornado gradualmente mais precisos e específicos, com a identificação direta do DNA ou RNA viral (Zahm e cols., 1999). Existem técnicas que não amplificam o DNA antes da análise molecular, a exemplo do Southern blot (SB), do Dot blot (DB), da hibridização *in situ* (ISH) e do sistema de captura híbrida (HCS). Com esses procedimentos, a identificação do vírus depende da presença de uma grande quantidade de DNA viral nos tecidos ou sistemas celulares analisados. Esses testes apresentam, portanto, menor sensibilidade quando comparados com técnicas que utilizam a amplificação do DNA, a exemplo da reação em cadeia da polimerase (PCR) (*International Agency for Research on Cancer - IARC*, 1995; Lörincz, 1997; Zahm e cols., 1999).

A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis em 1985 e representa um dos maiores avanços técnicos da medicina contemporânea. O método consiste, em linhas gerais, na amplificação enzimática *in vitro* de um segmento específico de

DNA a partir de quantidades mínimas de material genético presente em um determinado meio ou tecido (Mullis e cols., 1986). Basicamente, é um processo termocíclico que inclui três etapas.

A primeira etapa é a desnaturação por ação térmica (a 95°C), com separação das fitas de DNA (Zahm e cols., 1999).

Uma vez separadas as fitas que compõem a molécula de DNA, inicia-se a fase de anelamento, que depende da presença dos sistemas iniciadores ou *primers*. Estes sistemas irão parear com suas respectivas sequências de bases complementares no DNA-alvo de fita simples, a 37-55°C. Os *primers* se constituem de oligonucleotídeos compostos de 20-25 bases de comprimento agrupados em uma sequência determinada. No caso do HPV, existem variações na sensibilidade da PCR, dependendo do tipo de *primer* empregado (Zahm e cols., 1999).

Entre os *primers* mais utilizados para o diagnóstico de HPV estão os denominados *primers consensus* (gerais ou genéricos) MY09/MY11 (Manos e cols., 1989; Lörincz, 1997) e GP5+/GP6+ (Snijders e cols., 1990; Lörincz, 1997). Estes são pareados com regiões de L1, que se constituem em uma sequência de DNA comum aos diversos tipos de HPV. Dessa forma, esses *primers* podem identificar diferentes tipos de HPV em uma mesma reação, além de também serem utilizados para detecção de novos tipos virais. O conjunto de *primers* GP5+/GP6+ possui maior sensibilidade na detecção do DNA dos diferentes tipos de HPV do que os *primers* MY09/MY011 (Remmerbach e cols., 2004).

Em contraste, os *primers* chamados de específicos têm a propriedade de detectar determinados tipos de HPV, por identificarem os genes E6 ou E7 que têm sua expressão aumentada após a integração viral ao genoma do hospedeiro.

Assim, são altamente sensíveis e específicos para os tipos virais analisados, em particular os HPVs 16 e 18 que apresentam o maior potencial oncogênico (Sasagawa e cols., 2000).

Após a fase de anelamento, à temperatura de 37-55°C, inicia-se a fase de extensão do *primer* através de uma enzima termoestável denominada de Taq polimerase. A ação dessa enzima é a de reproduzir um segmento da fita de DNA a partir da região onde houve a ligação entre o *primer* e o segmento de DNA correspondente. Ambas as fitas simples iniciais de DNA, por conseguinte, são convertidas em quatro fitas pareadas, as quais servem de modelo para um novo ciclo de PCR que se iniciará. Esse processo passa a ocorrer, sucessivamente, por 35 a 40 ciclos, havendo, em consequência, um crescimento exponencial no número de cópias do DNA-alvo formadas. Após a amplificação, o produto da PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio, o que permite a visibilização do DNA amplificado à luz ultravioleta (Zahm e cols., 1999).

#### **1.1.2.4. Epidemiologia**

Atualmente, a infecção genital pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais frequente na população sexualmente ativa (Carvalho e Oyakawa, 2000; Dunne e Markowitz, 2006; Palefsky e Cranston, 2010). Em 1996, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estimava em 500 mil a um milhão de casos novos, por ano, de infecção pelo HPV (Carvalho e Oyakawa, 2000). A prevalência de verrugas genitais varia com a idade e a população em estudo. As verdadeiras prevalência e incidência de verrugas genitais nos EUA são desconhecidas por não ser uma doença de notificação compulsória (Spitzer e Burk, 2005). Porém, alguns autores descrevem que nos

EUA e na Inglaterra, a incidência de verrugas genitais aumentou de 2,5 a 8 vezes durante as últimas décadas. Entre os norte-americanos, a incidência de condiloma acuminado aumentou de 13 para 106 casos por 100.000 entre o início dos anos 50 e final dos anos 70. Segundo estudos realizados em mulheres sexualmente ativas com citologia oncológica normal, a prevalência de DNA-HPV variou entre 3,7 e 47,9% (Carvalho e Oyakawa, 2000). Segundo Spitzer e Burk (2005), a prevalência de infecção por HPV varia entre 14 e 35% (Spitzer e Burk, 2005). Uma metanálise com 157.879 mulheres com citologia normal demonstrou que a prevalência mundial de HPV é de 10,4%. A prevalência regional encontrada mais elevada foi na África, onde 22% das mulheres tiveram a evidência de infecção pelo HPV comprovada. A prevalência de HPV foi mais elevada nas mulheres com idade inferior a 35 anos (de Sanjosé e cols., 2007). Outros autores, como Núñez-Troconis e cols. (2009), também demonstraram que pacientes com idade inferior a 35 anos apresentam prevalência de HPV aumentada.

Em regiões onde o câncer de colo do útero apresenta incidência aumentada pode ocorrer aumento da prevalência de HPV, conforme demonstrado em estudo realizado em uma região do nordeste da Argentina. DNA de HPV foi encontrado em 61% em uma amostra de 301 pacientes, pelo método de PCR; o HPV tipo 16 foi encontrado em 64% das pacientes positivas para HPV (Tonon e cols., 1999). Em Honduras, onde o câncer de colo do útero é um dos maiores problemas de saúde pública e a mortalidade por este câncer é alta, a prevalência de HPV descrita é de 51%; foram encontrados 23 tipos de HPV, sendo os mais prevalentes 16, 51, 31, 18 e 11, pelo método de PCR (Tábora e cols., 2009).

Suwannarurk e cols. (2009) descreveram taxas de prevalência para os HPV 16, 18, 31, 33, em pacientes na Tailândia, respectivamente de 6,1%, 11,8%, 12,1% e 14,1%, enquanto 25% eram infectados com múltiplos tipos de HPV.

No Reino Unido foi realizado um estudo com 5038 pacientes que apresentaram alteração de baixo grau no exame citopatológico para avaliar a prevalência de HPV de alto risco. A prevalência encontrada para os HPV de alto risco testados (tipos 16, 18, 31, 33 entre outros) foi de 34,2% e notou-se diminuição dessa prevalência com o aumento da idade das pacientes (Cotton e cols., 2007).

Em um estudo realizado em Porto Alegre com mulheres atendidas em um serviço público de rastreamento para o câncer de colo do útero (população geral) foi encontrada prevalência de HPV por captura híbrida II de 15% e por PCR de 16% (Nonnenmacher e cols., 2002).

Alguns autores referem que a precisa prevalência clínica ou citológica da infecção pelo HPV não é conhecida (Ferenczy, 1989). Entretanto, o que se sabe é que as estimativas da prevalência de infecção pelo HPV variam amplamente, dependendo do método de diagnóstico e das características demográficas e de comportamento da população em estudo (Spitzer e Burk, 2005).

#### **1.1.2.5. Papel oncogênico do HPV**

As novas técnicas de biologia molecular foram fundamentais para melhor esclarecer o papel do HPV no processo de desenvolvimento de tumores malignos. Há evidências crescentes que ligam o HPV ao câncer em geral e ao câncer cervical em particular (NCI, 2010; Reichman, 2010).



A ação oncogênica desse vírus foi primeiramente reconhecida na década de 1930, quando estudos experimentais mostraram que lesões benignas em coelhos podiam ser induzidas à transformação maligna e ao carcinoma invasivo por ação de um tipo específico de papilomavírus (*rabbit papillomavirus*) (Rous e Beard, 1935; zur Hausen, 2009).

Em seres humanos, a associação entre HPV e câncer foi inicialmente sugerida na epidermodisplasia verruciforme, uma doença genética rara, caracterizada por deficiência no sistema imunológico. Os pacientes acometidos desenvolvem lesões verrucosas características na pele, que, em 30 a 60% dos casos, evoluem para transformação maligna nas áreas expostas ao sol. Nesta doença, em mais de 90% das lesões que progridem para o carcinoma de células escamosas são encontrados o HPV tipo 5 e 8 (zur Hausen e de Villiers, 1994; Wieland e Pfister, 1999).

O mecanismo oncogênico do HPV tem sido objeto de vários estudos (Farthing e Vousden, 1994; McGlennen, 2000; Dell e Gaston, 2001; zur Hausen, 2002). Diferentes tipos de HPV possuem capacidade variável de indução maligna dos tecidos que infectam. Dessa forma, os mais de 35 tipos de HPV que acometem a região anogenital (Wolf e Ramirez, 2001; Nicolau 2002) são classificados de acordo com seu potencial oncogênico como grupo de alto risco, a exemplo dos tipos 16 e 18 (e 31, 33, 45, 56, 58 e outros) e grupo de baixo risco, correspondendo principalmente aos HPVs 6 e 11 (e 42, 43, 44 e outros) (Boyle e Smith, 1999; McGlennen, 2000; INCA, 2010). Alguns autores referem ainda um grupo de risco intermediário (35, 39, 51, 52 e 66) (Boyle e Smith, 1999).

Em lesões benignas e pré-malignas, o DNA viral é mantido em uma forma epissômica, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira. O contrário

se observa nos cânceres, onde o genoma viral está, geralmente, integrado ao genoma do hospedeiro (Farthing e Vousden, 1994; zur Hausen e Villiers, 1994; Rivoire e cols., 2001). Isso sugere que a integração do DNA viral é importante na transformação maligna (Boyle e Smith, 1999). Essa integração provoca a ruptura do gene E2, que é responsável pelo controle da transcrição dos genes E6 e E7, sendo que sua inativação leva à superexpressão destes dois genes (Farthing e Vousden, 1994). Estudos mostram que essa alteração na regulação da expressão dos oncogenes virais E6 e E7, os quais podem exercer seus efeitos interferindo nas proteínas que regulam o crescimento celular, causam proliferação descontrolada; sendo assim, aumenta o risco de progressão das neoplasias intraepiteliais cervicais (Kruse e cols., 2004).

O aumento da expressão dos genes E6 e E7 é fundamental para carcinogênese induzida pelo HPV 16 e 18. O gene E6 forma um complexo com o gene *TP53* e o degrada pela via da ubiquitina, o que resulta na inativação deste gene supressor tumoral (Farthing e Vousden, 1994; Wieland e Pfister, 1997). O gene *TP53* é denominado “guardião do genoma” porque atua sempre que ocorre um dano ao DNA. Nesta situação, há um aumento na sua expressão, o que ocorre com o objetivo de promover a interrupção do ciclo celular para reparo do DNA ou promover a indução de apoptose, a morte celular programada (Cullotta e Koshland, 1993).

Uma das propriedades fundamentais da malignidade é a vantagem seletiva de crescimento sobre os tecidos normais. O controle da população celular depende do equilíbrio de dois fatores: os mecanismos de proliferação e a morte celular. A morte celular é comumente considerada um processo patológico. Entretanto, em várias circunstâncias (incluindo a renovação celular normal, o

desenvolvimento embrionário e o equilíbrio trófico estabelecido pelo estado hormonal) a morte celular é induzida por estímulos fisiológicos e parece ter um papel importante na regulação do tamanho e da forma tecidual. A morte celular, sob essas circunstâncias, é chamada de apoptose, sendo morfológicamente distinta da necrose (Yamamoto e col., 2002). Existem genes que atuam impedindo o aparecimento de tumores e, por isso, são chamados de supressores de tumores ou antioncogenes. Os genes supressores tumorais atuam como freios para a proliferação celular. A função fisiológica desses genes consiste em regular o crescimento da célula e não de impedir a formação de tumores. A perda desses genes constitui um evento fundamental em muitos, e possivelmente em todos, tumores humanos (Kumar e cols., 2005).

Nas últimas décadas, foram alcançados avanços importantes na identificação das bases do processo de transformação neoplásica. Os genes estão presentes nas moléculas de DNA, no núcleo celular. Esses especificam sequências de aminoácidos que devem ser ligados uns aos outros para formar determinada proteína: esta deverá realizar o efeito biológico do gene. Quando um gene é ativado, a célula responde sintetizando a proteína codificada. Mutações em um gene podem perturbar a célula, alterando a quantidade de proteína ou a atividade desta. Duas classes de genes, pequenas em relação ao total de genes, têm papel-chave no desenvolvimento do câncer. Em suas configurações normais, elas coreografam o ciclo celular em uma complicada sequência de eventos, pelos quais as células crescem e se dividem. Proto-oncogenes estimulam, enquanto genes supressores inibem os processos de divisão celular. Coletivamente, essas duas classes de genes são responsáveis pela proliferação descontrolada encontrada nos cânceres em humanos. Quando ocorrem mutações, proto-

oncogenes tornam-se oncogenes, que são carcinogênicos e causam multiplicação celular excessiva. Essas mutações levam o oncogene a expressar em excesso sua proteína estimuladora do crescimento ou a produzir uma forma mais ativa. Os genes supressores de tumores, em contraste, contribuem para o desenvolvimento de câncer quando são inativados por mutações. O resultado é perda da ação de genes supressores funcionais, o que priva a célula de controles cruciais para a prevenção de crescimento inapropriado (Rivoire e cols., 2001; Yamamoto e cols., 2002).

O ciclo celular é composto de quatro estágios. Na fase G1 (*Gap 1* igual a interfase), a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. A cópia (replicação) ocorre na fase seguinte, chamada de S (síntese), e permite que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação dos cromossomos, inicia-se a fase G2 (*Gap 2*), durante a qual a célula prepara-se para a fase M (mitose) – na qual a célula-mãe, aumentada, finalmente divide-se ao meio, para produzir duas células filhas, com igual número de cromossomos. As células-filhas imediatamente entram em fase G1 e podem reiniciar o ciclo celular. Alternativa também é parar o ciclo temporária ou definitivamente. O controle da proliferação celular é manejado por uma série de pontos de controle que regulam o ciclo celular. Várias proteínas inibidoras podem parar o avanço deste ciclo, entre elas p15, p16 e pRb (proteína do Retinoblastoma), que estão implicadas na carcinogênese. Outros inibidores são p21 e p53 que monitoram a saúde celular, a integridade de seus cromossomos e a execução correta das diferentes fases do ciclo (Chan e cols., 1998; Rivoire e cols., 2001).

Em conjunto à ação do E6, o gene E7 irá se ligar a outro gene supressor tumoral da célula hospedeira, o gene do retinoblastoma (RB) (Farthing e

Vousden, 1994; zur Hausen e de Villiers, 1994; Wieland e Pfister, 1997). Este codifica uma proteína, a pRB, que tem a função de manter o ciclo celular quiescente através de sua ligação com o fator de transcrição E2F na fase G1. Para que ocorra a progressão do ciclo celular a partir de G1, a pRB sofre uma fosforilação que leva à desintegração do complexo com E2F (Nevins, 1998). A proteína E7 do HPV liga-se às formas hipofosforiladas da pRB, liberando o fator de transcrição E2F e promovendo desse modo a síntese de DNA não programada biologicamente pelos mecanismos celulares do hospedeiro (Farthing e Vousden, 1994; zur Hausen e de Villiers, 1994; Wieland e Pfister, 1997; Pfister, 1997). A interação dessas duas proteínas virais com os genes supressores tumorais leva à instabilidade do genoma celular (Wieland e Pfister, 1997), com consequente imortalização da célula infectada (Howley, 1991; Farthing e Vousden, 1994; zur Hausen, 2009).

A ação carcinogênica do HPV foi extensivamente investigada com relação ao câncer de colo uterino (Munger, 2002; zur Hausen, 2009). Nos estudos pioneiros de Dürst e cols. (1983), tipos específicos de HPV, particularmente o 16 e o 18, foram isolados de biópsias de tumores de colo uterino. Vários estudos posteriores confirmaram este achado, detectando material genético do HPV na grande maioria dos tumores cervicais e indicando um papel crítico do vírus nesta neoplasia (Dürst e cols., 1983; Bosch e cols., 1995; Walboomers e cols., 1999; zur Hausen, 2009).

A mais forte evidência epidemiológica da ação carcinogênica do HPV no colo uterino foi fornecida pela Agência Internacional para Pesquisa no Câncer - IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (Muñoz, 2000). A pesquisa consistiu de estudos multicêntricos de casos e controles que compararam 2.000

mulheres com carcinoma de colo uterino com 2.000 mulheres saudáveis. Foram incluídos pacientes de 13 países como Espanha, Colômbia, Brasil, Paraguai, Marrocos, Mali, Filipinas e outros. A análise dos dados demonstrou uma razão de chances (*odds ratio*) para associação da presença do HPV e câncer de colo uterino que variou entre 18 e 200, obtidas na Colômbia e nas Filipinas respectivamente, sendo a razão de chances comum de 70 (95%, intervalo de confiança de 57-88). A associação foi observada tanto nos tumores escamosos (razão de chances de 74) quanto nos adenocarcinomas (razão de chances de 50). Finalmente, foi detectado DNA viral através de PCR com *primers consensus* MY09/MY11 em 93% de mais de 1.000 biópsias de carcinoma de colo uterino obtidas de 22 países. Após a análise inicial, as biópsias negativas (7%) foram testadas novamente com *primers consensus* mais sensíveis (GP5+/GP6+) e com *primer* específico E7, sendo então constatada a prevalência do HPV em 99,7% das amostras. Esses resultados, marcantes do ponto de vista epidemiológico, permitiram aos autores concluir que o HPV representa uma causa necessária para o surgimento do câncer cervical (Muñoz, 2000).

O HPV também é fator de risco definido para as neoplasias da região anogenital como o carcinoma epidermoide de vulva e pênis (Sisk e Robertson, 2002), nos quais o vírus está presente em cerca de 30-50% dos casos (zur Hausen e de Villiers, 1994; zur Hausen, 2009). A relação com câncer de canal anal é ainda mais importante. Num estudo de casos e controles, Frisch e cols. (1997) encontraram DNA de HPV em 88% de 388 pacientes com a doença. Em contrapartida, não houve a identificação do vírus em nenhum dos 20 casos de adenocarcinoma de reto usados como controles. O HPV tipo 16 foi encontrado em 73% dos carcinomas invasivos (Frisch e cols., 1997). Foi demonstrado em estudo

de carcinoma colorretal que a maioria dos pacientes com adecarcinoma apresentavam DNA de HPV presente, sugerindo que o vírus pode estar relacionado à patogênese deste câncer (Damin e cols., 2007).

O possível papel oncogênico do HPV também tem sido investigado em neoplasias extragenitais, a exemplo dos carcinomas de laringe, faringe (Ogura e cols., 1991), esôfago (Suzuk e cols., 1996; Damin e cols., 2006), pulmão (DiLorenzo e cols.,1992) e bexiga (Shibutani e cols., 1992).

#### **1.1.2.6. Aspectos clínicos**

A maioria das infecções por HPV resulta em pacientes assintomáticos (Dunne e Markowitz, 2006; Barcellos, 2008). As manifestações clínicas da infecção por esse vírus incluem verrugas anogenitais, papilomatose respiratória recorrente, lesões intraepiteliais e câncer (Dunne e Markowitz, 2006).

A prevalência do HPV é alta entre as mulheres jovens. Há um declínio desta prevalência entre as pacientes de idade mais avançada (Boyle e Smith, 1999). Portanto, em uma elevada porcentagem de mulheres jovens, ocorre infecção por um ou mais tipos de HPV durante os anos reprodutivos; entretanto, apenas algumas desenvolvem câncer. Menos de 1% daquelas que são portadoras dos tipos oncogênicos irá evoluir desta maneira (Nicolau, 2002; Grce e cols., 2004). A maior parte das mulheres infectadas pelo HPV não apresenta sintomas clínicos e, em geral, a infecção regride espontaneamente sem nenhum tipo de tratamento (Carvalho e Oyakawa, 2000; Nicolau, 2002; Spitzer e Burk, 2005).

O período de incubação é muito variável e pouco é conhecido sobre a latência ou persistência desses vírus no organismo (Nicolau, 2002; Barcellos, 2008).

As principais células consideradas como alvo dos tipos oncogênicos de HPV são as basais e as parabasais da zona de transformação e tem sido demonstrado que uma grande parte desta zona de transformação é infectada simultaneamente. Por essa razão, qualquer forma de tratamento de lesões precursoras do câncer de colo uterino deve incluir a destruição de toda a zona de transformação (Hellberg e cols., 1994).

Deve-se lembrar que a grande maioria dos infectados não desenvolve doença maligna, indicando que somente a infecção pelo HPV não é suficiente para causar câncer. Cofatores podem ser necessários no processo (Carvalho e Oyakawa, 2000; Rivoire e cols., 2001). Outros cocarcinógenos como estado imunológico do indivíduo, a alimentação e muitos outros fatores influenciam a infecção por HPV, determinando se ela irá permanecer subclínica (latente), transformar-se-á em pré-câncer ou progredirá para o câncer (Carvalho e Oyakawa, 2000; Crum, 2005).

#### **1.1.2.7. HPV e gestação**

As lesões genitais ocasionadas pelo HPV, aparente e clinicamente, ocorrem com mais frequência e/ou são mais exuberantes durante a gestação e melhoram ou regridem após o parto (Tenti e cols., 1997; Sheti e cols., 1998). A distribuição dessas lesões parece ser semelhante entre gestantes e não gestantes. A zona de transformação do colo do útero é a porção mais comumente afetada, seguida pelos epitélios vaginal, vulvar e perianal (Ferenczy, 1989).



A presença do HPV na gestante constitui risco de transmissão do vírus ao neonato, podendo causar lesões verrucosas anogenitais, conjuntivais, orais e laríngeas (Carvalho e Oyakawa, 2000). A história materna de verrugas genitais na gravidez é o maior fator de risco para papilomatose respiratória na criança (Silverberg e cols., 2003).

Acredita-se que a gestação altere a resposta imune na mulher. A imunomodulação da gestação é atribuída à redução da imunidade celular, já que há uma redução significativa da resposta linfocitária (Sethi e cols., 1998). Alguns autores sugerem que os altos níveis de estrogênio e progesterona da gestação deprimem a imunidade celular, que é essencial para a resolução da infecção por HPV (Armbruster-Moraes e cols., 2000; Banura e cols., 2008). Há redução da resposta humoral ao HPV 16 durante a gestação (Sethi e cols., 1998; Armbruster-Moraes e cols., 2000).

Bandyopadhyay e cols. (2003) avaliaram a prevalência de HPV em 135 gestantes através da técnica de PCR e encontraram 28,14% de pacientes positivas. A prevalência do HPV 16 nas pacientes positivas foi de 63,15%. A taxa de transmissão, ao nascimento, da mãe para seu recém-nascido foi de 18,42%. De forma semelhante, outros autores encontraram uma prevalência de 26% de HPV (PCR) em gestantes normais, porém de 13,3% para o HPV tipo 16. A transmissão de mãe HPV positiva para o feto foi encontrada em 50% dos casos (Gajewska e cols., 2005). Os autores concluíram que a cesariana, provavelmente, não protege o neonato da infecção por HPV e sugeriram que o feto deve ser contaminado durante a vida intrauterina (Bandyopadhyay e cols., 2003; Gajewska e cols., 2005). Os estudos que avaliam a transmissão de HPV da mãe para o recém-nascido são conflitantes e apresentam uma ampla variação nas taxas

(Castellsagué e cols., 2009). Smith e cols. (2004) estudaram a prevalência de HPV em gestantes em Iowa, nos EUA, e encontraram 29% na cérvix uterina através do método de PCR (Smith e cols., 2004). Rombaldi e cols. (2008) encontraram uma prevalência de 77,8% nas gestantes imediatamente antes do parto. Porém, essas pacientes apresentavam história prévia de HPV, alterações no exame citopatológico ou lesões verrucosas. HPV 6/11 foi encontrado em 20,7% dos casos, HPV 16 em 15,9% e HPV 18 em 11%. Estes autores encontraram DNA de HPV no sangue em 6,1% das pacientes. Em 2009, esses mesmos autores relataram uma transmissão perinatal de 24,5% em recém-nascidos de mães que apresentavam lesões genitais verrucosas ou lesões intraepiteliais no colo do útero (Rombaldi e cols., 2009). Uma revisão sistemática mostrou a ampla variação da prevalência de HPV (PCR) em gestantes de 5,5% a 65,0% (Medeiros e cols., 2005).

Alguns autores estudaram as taxas de HPV nos diferentes períodos entre gestação e puerpério. Nobenhuis e cols. (2002) encontraram maior prevalência de HPV de alto risco, pela técnica de PCR, durante a gestação em comparação ao período pós-parto. Alguns outros autores, usando técnicas variadas, também encontraram uma prevalência maior de HPV, no período gestacional, quando comparado ao período pós-parto (Rando e cols., 1989; Fife e cols., 1999). Algumas razões para este fenômeno têm sido sugeridas: as mulheres grávidas tendem a ter um número menor de parceiros sexuais do que as mulheres não grávidas da mesma idade e, conseqüentemente, apresentam risco menor de adquirir uma nova infecção por HPV (Nobenhuis e cols., 2002); possa existir uma ativação seletiva do vírus por alterações hormonais da gestação (Michelin e cols., 1997) e, ainda, existam fatores imunológicos relacionados (Sethi e cols., 1998).

Nobenhuis e cols. (2002) demonstraram que as mulheres no pós-parto apresentam resolução da infecção por HPV de alto risco mais rápido do que as pacientes não grávidas após período semelhante. Esta tendência decrescente no pós-parto pode ser explicada ainda pelo trauma cervical que ocorre no momento do parto, ocasionando um reparo adicional ao epitélio cervical (Yost e cols., 1999).

As diferenças nos métodos e estratégias utilizadas para detecção do HPV e nos desenhos dos estudos mostram resultados conflitantes com relação à prevalência do HPV na gestação. Alguns autores encontraram aumento da prevalência do HPV na gestação, o que sugere que a gravidez pode ser um fator de risco independente para a infecção (Schneider e cols., 1987; Fife e cols., 1996, Morrison e cols., 1996), enquanto outros demonstraram menores ou iguais prevalências quando comparado a controles não gestantes (Peng e cols., 1990; Tenti e cols., 1997; Chan e cols., 2002).

Com relação aos tipos de HPV, Schneider e cols. (1987) encontraram HPV 16 em 42% da amostra de gestantes positivas e em apenas 25% dos casos de pacientes não gestantes. Entretanto, Tenti e cols. (1997) encontraram menor prevalência de HPV 16 e 18 em gestantes do que no grupo de não gestantes.

Para alguns autores a gestação não parece ser um período de vulnerabilidade especial à infecção por HPV, enquanto outros discordam. Os dados até aqui apresentados demonstram que os resultados, a respeito da prevalência de HPV na gestação, permanecem conflitantes. Visto que um pequeno número de estudos compara as gestantes com grupo de pacientes não gestantes, utilizando técnica adequada de pesquisa do vírus. Tendo em vista a incidência elevada de câncer de colo do útero em uma região considerada de

risco, ou seja, países em desenvolvimento, a demonstrada relação entre o HPV e este câncer e a possível vulnerabilidade da gestante em adquirir o vírus, realizamos a pesquisa para avaliar se existe associação entre gestação e prevalência de DNA viral dos tipos oncogênicos e não oncogênicos principais no colo do útero.

## 1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpolat I, Smith DA, Ramzy I, Chirala M, Mody DR. The utility of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 staining on cell blocks prepared from residual thin-layer cervicovaginal material. *Cancer Cytopathol.* 2004;102:142-9.

Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leao E, Zugaib M. Prevalence of “high risk” human papillomavirus in the lower genital tract of Brazilian gravidas. *Int J Gynecol Obstet* 2000;69(3):223–7.

Andrade JM, Marana HRC. Lesões pré-neoplásicas do colo do útero. In Oliveira HC, Lemgruber I, editores. *Tratado de Ginecologia FEBRASGO*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2001. p.1257-68.

Andrade JM, Yamaguchi NH, Oliveira AB, Perdicaris M, Pereira ST, Petitto JV, et al. Rastreamento, diagnóstico e tratamento do carcinoma do colo do útero. In: Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 2001;1-18.

Bandyopadhyay S, Sen S, Majumdar R, Chatterjee R. Human papillomavirus infection among Indian mothers and their infants. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2003;4:179-84.

Banura C, Franceschi S, van Doorn LJ, Arsian A, Kleter B, Wabwire-Mangen F, et al. Prevalence, incidence and clearance of human papillomavirus infection among young primiparous pregnant women in Kampala, Uganda. *Int J Cancer.* 2008 Nov;123(9):2180-7.

Barcellos MC. HPV. Controvérsias e evidências. In: Silveira GPG. *Ginecologia baseada em evidências*. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. p.293-301.

Bittencourt R, Scaletzky A, Boehl JAR. Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre – RS. *Rev Bras Cancerol.* 2004;50(2):95-101.

Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5428-34.

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

Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 1999;9:177-86.

Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000 Nov;6(11):4171-5.

Carvalho JJM & Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV-Papilomavírus humano. São Paulo: 1ª Edição. BG Cultural; 2000. 142p.

Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, Goncé A, Ros R, Pérez JM et al. Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:74.

Chan MKM, Cheung TH, Chung TKH, Bao SY, Zhao CL, Nobori T, et al. Expression of p16<sup>INK4</sup> and retinoblastoma protein Rb in vulvar lesions of Chinese women. *Gynecol Oncol.* 1998;68:156-61.

Chan PK, Chang AR, Tam WH, Cheung JL, Cheng AF. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection: Comparison between pregnant women and non-pregnant controls. *J Med Virol.* 2002 Aug;67(4):583-8.

Chang F. Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol.* 1990;43:269-76.

Cotton SC, Sharp L, Seth R, Masson LF, Little J, Cruickshank ME, et al. Lifestyle and socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women. *Br J Cancer.* 2007 Jul;97(1):133-9.

Creasman WT. Cancer and pregnancy. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep;943:281-6.

Crum CP. Aparelho Genital Feminino. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran Patologia – Bases patológicas das doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.1105-67.

Cullotta E & Koshland DE. p53 sweeps through cancer research. *Science.* 1993 Dec;262(5142):1958-61.

Damin APS, Frazzon APG, Damin DC, Biehl HB, Oliveira LA, Auler R et al. Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the esophagus by auto-nested PCR. *Disease of the esophagus.* 2006;19:64-8.

Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33:569-74.

Dell G & Gaston K. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Nov;58(12-13):1923-42.

DiLorenzo TP, Tamsen A, Abramson AL, Steinberg BM. Human papillomavirus type 6a DNA in the lung carcinoma of a patient with recurrent laryngeal papillomatosis is characterized by a partial duplication. *J Gen Virol.* 1992 Feb;73(Pt2):423-8.

Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Jan;11(1):3-6.

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

Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80:3812-15.

Farthing AJ & Vousden KH. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Trends Microbiol.* 1994 May;2(5):170-4.

Ferenczy A. HPV – Associated lesions in pregnancy and their clinical implications. *Clin Obstet Gynecol.* 1989 Mar;32(1):191-9.

Ferenczy A & Jenson AB. Efeitos teciduais e resposta do hospedeiro. In: Lörincz AT & Reid R. HPV. Rio de Janeiro: Interlivros; 1997. p.171-94.

Fife KH, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR, Hansell R. Cancer-associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 May;174(5):1487-93.

Fife KH, Katz BP, Brizendine EJ, Brown DR. Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid persists throughout pregnancy and decreases in the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 May;180(5):1110-4.

Franco ELF. Epidemiologia das verrugas anogenitais e do câncer. In: Lörincz AT & Reid R. HPV. Rio de Janeiro: Interlivros; 1997. p121-43.

Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 1997 Nov;337(19):1350-8.

Gajewska M, Marianowski L, Wielgos M, Malejczyk M, Majewski S. The occurrence of genital types of human papillomavirus in normal pregnancy and in pregnant women with pregestational insulin dependent diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005 Dec;26(6):766-70.

Grce M, Husnjak K, Matovina M, Milutin N, Magdic L, Husnjak O, et al. Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, and Adeno-associated virus infections in pregnant and nonpregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1341-4.

Hellberg D, Nilsson S, Valentin J. Positive cervical smear with subsequent normal colposcopy and histology – frequency of CIN in a long-term follow-up. *Gynecol Oncol.* 1994;53:148-51.

Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Cháidez EA, Lazcano E, Hernández-Ávila M, et al. The prevalence of high-risk HPV infection in pregnant women from Morelos, México. *Salud Publica Mex.* 2005;47(6):423-9.

Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ, Chang SF. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2005 Dec;99(3):615-21.

Howley PM. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 1991 Sep;51(18 Suppl):5019s-22s.

International Agency for Research on Cancer - IARC. [Internet] Human papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk to Humans, vol. 64. Lyon, France: I; 1995. [acesso em 2010 Feb 12]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/>.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. [Internet]. Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, [acesso em 2010 Feb 03]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> e <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>

Kruse AJ, Skaland IB, Janssen EA, Buhr Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23(2):100-9.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasias. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins e Cotran Patologia – Bases patológicas das doenças.* 7<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.281-356.

Liu VW, Tsang P, Yip A, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2001 Aug;82(2):269-72.

Loomis DM, Pastore PA, Rejman K, Gutierrez KL, Bethea B. Cervical cytology in vulnerable pregnant women. *J Am Acad Nurse Pract* 2009 May;21(5):287-94.

Lörincz AT. Métodos moleculares para a detecção da infecção pelo papilomavírus humano. In: Lörincz AT & Reid R. *HPV.* Rio de Janeiro: Interlivros; 1997. p121-43.

Luff R. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Report of the 1991 Bethesda Workshop [Special Announcement]. *Am J Surg Pathol.* 1992;16(9):914-6.

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



Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 1989;7:209-14.

Mc Glennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med*. 2000 Jun;20(2):383-406.

Medeiros LR, Ethur ABM, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica*. 2005;21(4):953-64.

Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BKS, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: A meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998 Oct;92(4Pt2):727-35.

Michelin D, Gissmann L, Street D, Potkul RK, Fisher S, Kaufmann AM, Qiao L, Schreckenberger C. Regulation of human papillomavirus type 18 in vivo: effects of estrogen and progesterone in transgenic mice. *Gynecol Oncol*. 1997 Aug;66(2):202-8.

Morrison EA, Gammon MD, Goldberg GL, Vermund SH, Burk RD. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet*. 1996 Aug;54(2):125-30.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Symp Quant Biol*. 1986;51:263-73.

Münger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci*. 2002 Mar;7:d641-9.

Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000 Oct;19(1-2):1-5.

National Cancer Institute (NCI). Cervical Câncer. [Internet]. Bethesda: NCI. [acesso em 2010 Feb 18]. Disponível em: <http://www.cancer.gov>

Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ*. 1998 Aug;9(8):585-93.

Nicolau SM. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e tratamento. In: Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 2002;1-19.

Nobbenhuis M, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC, Rozendaal L, Bezemer PD, Voorhorst FJ, et al. High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum. *Br J Cancer*. 2002 Jul;87:75-80.

Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozetti MC. Identificação do Papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saude Publica*. 2002;36(1):95-100.

Núñez-Troconis J, Delgado M, González J, Mindiola R, Velásquez J, Conde B, et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area. *Invest Clin*. 2009;50(2):202-12.

Ogura H, Watanabe S, Fukushima K, Masuda Y, Fujiwara T, Yabe Y. Presence of human papillomavirus type 18 DNA in a pharyngeal and a laryngeal carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 1991 Nov;82(11):1184-6.

Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12:186-92.

Palefsky JM & Cranston RD. Virology of human papillomavirus infections and the link to cancer. In: UpToDate, Rose, BD (Ed), UpToDate, Waltham, MA, 2010.

Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TT. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol*. 1991 Apr;95(4):540-6.

Peng TC, Searle CP 3<sup>rd</sup>, Shan KV, Repke JT, Johnson TR. Prevalence of human papillomavirus infections in term pregnancy. *Am J Perinatol*. 1990 Apr;7(2):189-92.

Pessini SA, Fridman FZ, Barcellos MC, Silveira GPG. Neoplasias intraepiteliais: endométrio, colo uterino, vagina e vulva. In: Silveira GPG. *Ginecologia baseada em evidências*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. p.359-82.

Pfister H. Papel do Papilomavírus no Câncer Anogenital. In: Lörincz AT & Reid R. *HPV*. Rio de Janeiro: Interlivros; 1997. p3-18.

Rando RF, Lindheim S, Hasty L, Sedlacek TV, Woodland M, Eder C. Increased frequency of detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in exfoliated cervical cells during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1989 Jul;161(1):50-5.

Reichman R. Epidemiology of human papillomavirus infections. In: UpToDate, Rose, BD (Ed), UpToDate, Waltham, MA, 2010.

Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol*. 2004;30:302-8.

Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu*. 1973;8:301-28.

Rivoire WA, Capp E, Corleta HE, Silva ISB. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras Cancerol.* 2001;47(2):179-84.

Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Viol J.* 2008 Sep;5:106.

Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Viol J.* 2009 Sep;6:83

Rous P, Beard JW. The Progression to Carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp.* 1935;62:523-48.

Sahasrabudde VV, Bhosale RA, Joshi SN, Kavatkar AN, Nagwanshi CA, Kelkar RS, et al. Prevalence and predictors of colposcopic-histopathologically confirmed cervical intraepithelial neoplasia in HIV-Infected women in India. *PLoS One* [periódico na Internet]. 2010 Jan [acesso em 2010 Feb 04];5(1):e8634. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0008634>.

de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9.

Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, Yoshimoto H et al. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res.* 2000;67:127-39.

Schneider A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer.* 1987 Aug;40(2):198-201.

Schoell WMJ, Janicek MF, Mirhashemi. Epidemiology and biology of cervical cancer. *Semin Surg Oncol.* 1999;16:203-11.

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

Shibutani YF, Schoenberg MP, Carpinello VL, Malloy TR. Human papillomavirus associated with bladder cancer. *Urology.* 1992 Jul;40(1):15-7.

Silveira GPG. Câncer de colo uterino e de vagina. In: Silveira GPG. *Ginecologia baseada em evidências.* 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. p.407-33.

Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol.* 2003 Apr;101(4):645-52.

Sisk EA & Robertson ES. Clinical implications of human papillomavirus infection. *Front Biosci.* 2002 Mar;7:e77-84.

Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Wang D, Turek LP and Haugen TH. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12:45-56.

Smith JS, Green J, Gonzales AB, Appleby P, Peto J, Plummer M et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet.* 2003;361:1159-67.

Snijders PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers HJF, Snow G, Meijer CJLM, Walboomers JMM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol.* 1990;71:173-81.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002;287:2114-19.

Spitzer M, Burk RD. Human Papillomavirus ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2005 Apr; 105(4):905-18.

Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz OP, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J Gen Virol.* 1998;79:2127-35.

Strauss S, Sastry P, Sonnex C, Edwards S, Gray J. Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm Infect.* 2002 Apr;78:135-8.

Suwannarurk K, Tapanadechopol P, Pattaraarchachai J, Bhamarapavati S. Hospital-based prevalence and sensitivity of high-risk human papillomavirus. *Cancer epidemiol.* 2009 Jul;33(1):56-60.

Suzuk L, Noffsinger AE, Hui YZ, Fenoglio-Preiser CM. Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1996 Aug;78(4):704-10.

Syrjanen S e Puranen M. Human Papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):259-74.

Tábora N, Bakkers JMJE, Quint WGV, Massuger LFAG, Matute JA, Melchers WJG, et al. Human papillomavirus infection in Honduran women with normal cytology. *Cancer causes control.* 2009 Nov;20(9):1663-70.

Tenti P, Zappatore R, Migliora P, Spinillo A, Maccarini U, De Benedittis M, et al. Latent Human papillomavirus infection in pregnant women at term: a case control study. *J infect Dis.* 1997 Jul;176(1):277-80.

Thomas DB, Ray RM, Kuypers J, Kiviat N, Koetsawang A, Ashley RL, et al. Human papillomavirus and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am J Epidemiol.* 2001;153(8):740-8.

Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Liotta DJ, Bos PD, Galuppo JA, et al. Human papillomavirus cervical infection and associated risk factors in a region of Argentina with a high incidence of cervical carcinoma. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7:237-43.

Tseng CJ, Lin CY, Wang RL, Chen LJ, Chang YL, Hsieh TT, et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Jan;166(1 Pt 1):35-40.

Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJF, Meijer CJLM, Thomaz JO, et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and Human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2148-53.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shan KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.

Wieland U & Pfister H. Papilomavírus em patologia humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: Gross GE & Barraso R. *Infecção por Papilomavírus Humano-Atlas Clínico de HPV.* Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda; 1999. p.1-18.

Wolf JK & Ramirez PT. The molecular biology of cervical câncer. *Cancer Invest.* 2001;19(6):621-9.

Wright TC, Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twigg LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:295-304.

Yamamoto LSU, Maeda MYS, Pittoli JE, Mello ES, Leandro LO, Wakamatsu A, et al. Cinética celular em lesões pré-invasivas e invasivas do epitélio escamoso cervical: estudo morfológico e imunoistoquímico. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2002;61(2):97-101.

Yost NP, Santoso JT, McIntire DD, Iliya FA. Postpartum regression rates of antepartum cervical intraepithelial neoplasia II and III lesions. *Obstet Gynecol.* 1999 Mar;93(3):359-62.

Zahm DM, Nindl I, Scheneider A. Princípios gerais do diagnóstico: detecção do papilomavírus humano In: Gross GE & Barraso R. Infecção por Papilomavirus Humano-Atlas Clínico de HPV. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda; 1999. p.21-45.

Zelmanowicz AM, Costa MC. Registro Hospitalar de Câncer – Dados do Hospital Santa Rita – Centro de Câncer – Relatório 1997 a 2001. Porto Alegre: edição da ISCMPA, 2006.

zur Hausen H & de Villiers EM. Human papillomaviruses. Annu Rev Microbiol. 1994;48:427-47.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):342-50.

zur Hausen H. Papillomavirus in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology. 2009; 384:260-5.

## **2. OBJETIVOS**

### **Principal**

Avaliar a prevalência de infecção pelo HPV no colo do útero de mulheres grávidas e não grávidas em uma região considerada de risco para câncer de colo do útero (país em desenvolvimento).

### **Secundários**

1. Avaliar a presença do DNA viral no sangue de pacientes gestantes e não gestantes;
2. Estudar se existe associação entre a presença do DNA viral no sangue e no colo do útero e fatores de risco conhecidos tais como, idade na primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, uso de anticoncepcionais orais por mais de cinco anos, tabagismo, infecções genitais associadas e paridade.
3. Estudar se existe associação entre a presença do DNA viral no sangue e no colo do útero e características clínicas como a idade das pacientes e citologia alterada;
4. Avaliar a associação de DNA viral e as alterações citopatológicas no colo do útero;
5. Avaliar se ocorre disseminação hematogênica viral durante o período gestacional.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

#### **Prevalence of human papillomavirus infections in cervical and blood samples of pregnant and non-pregnant women in a developing country**

Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo<sup>1</sup>, Andrea Souto Pires Damin<sup>2</sup>,  
Grasiela Agnes<sup>2</sup>, Suzana Arenhart Pessini<sup>1</sup>, Claudio Osmar Pereira Alexandre<sup>2</sup>,  
Gustavo Py Gomes da Silveira<sup>1</sup>

1 Department of Gynecology and Obstetrics of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil

2 Laboratory of Molecular Biology of UFCSPA

Corresponding author: Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo

Adress: Rua Prof. Annes Dias, 295, 1° Andar CEP-90020-090 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-91511371/ Fax: +55-51-32148502

E-mail: mila@ufcspa.edu.br

**Keywords:** Human papillomavirus, pregnancy, prevalence, Polymerase Chain Reaction

**Synopsis:** In conclusion, there is a significant association between pregnancy and positivity HPV DNA, with no proven hematogenous spread of the virus.



## Abstract

Some studies suggest that the physiological process of pregnancy changes the behavior of HPV. However, the results regarding the prevalence of HPV during pregnancy are conflicting. **Objective:** To investigate the presence of Human papillomavirus (HPV) in cervical samples and in blood samples of pregnant and non-pregnant women from South-Brazil by polymerase chain reaction (PCR). **Methods:** Ninety-one pregnant and ninety-two non-pregnant women were prospectively enrolled in the study. They were initially interviewed and submitted to cytopathological exam and colposcopy. In addition, blood and cervical samples were collected in each trimester and in the puerperium. All samples were analyzed through PCR with consensus primers GP5+/GP6+. Genotyping was performed using specific primers. **Results:** HPV DNA was detected in 23/91 (25.3%) cervical samples from the pregnant women and in 12/92 (13%) cervical samples from non-pregnant women ( $P=0.035$ ). There was a significant association among cervical HPV infection and young age, number of sexual partners in lifetime and the presence of abnormal cervical cytology. HPV16 and HPV18 were the viral types more frequently detected. Out of the 23 HPV-positive pregnant women, 17 (73.9%) had normal cervical cytology. No HPV DNA was detected in blood samples. **Conclusion:** There is a significant higher prevalence of HPV infection during pregnancy. This finding might be related to the relative immunosuppression observed in pregnant women, outlining the importance of the early diagnosis of the viral infection in this specific population.

## Introduction

Cervical cancer, on the global scale, represents the second most frequent cancer in women and having its etiopathogeny related to HPV infection [1]. To date, more than 200 different types of HPV have been identified. Types 16 and 18, classified as high-risk viruses for cervical cancer, are considered as human carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [2].

Only 1% of high-risk HPV-positive cervixes will develop cervical cancer [3]. Since only a small fraction of HPV-infected women develop cervical cancer, additional risk factors are likely to be important determinants of disease development. These risk factors include younger ages, age of sexual debut, increasing number of sex partners, male partner with multiple sex partners, oral contraceptives, smoking, parity, immunosuppression, environmental exposures, and genetic susceptibility [4].

In pregnancy the immune system is physiologically suppressed. There have been numerous reports describing the immunosuppressive role of hormones: oestrogens, progesterone, chorionic gonadotropin and chorionic somatomammotropin. Alpha-fetoprotein and prostaglandins type E possess immunosuppressant properties [5,6]. These observations suggest that the possible temporary altered state of immunity and the increased levels of steroid hormones during pregnancy may have an effect on HPV replication [7]. A systematic review of literature shows a wide variation in the prevalence of HPV (PCR - Polymerase Chain Reaction) in pregnant women from 5.5% to 65% [8].

It has been widely accepted that HPVs are not disseminated to other sites by blood, i.e., there is no viremic phase in the course of HPV infection. However, HPV DNA can be detected in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs),

sera or plasma of patients with cervical cancer or HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma [9]. It should therefore be considered whether PBMCs might serve as a carrier of HPV during the course of HPV infection. The majority of studies that found HPV in PBMCs were conducted in immunodeficient or patients with HPV-related lesions or cancer, and the rates are variable [10].

The present study was conducted to investigate the presence of HPV in cervical and blood samples of pregnant and non-pregnant women from South-Brazil by polymerase chain reaction (PCR). The presence of HPV was correlated with the main risk factors for cervical cancer.

## **Material and Methods**

Ninety-one pregnant women were prospectively enrolled in the study from September 2008 to October 2009. As a control group, ninety-two non-pregnant women were included, coming from the gynecology outpatient clinic of the same Hospital. None of the patients and controls had a previous history of cervical cancer or dysplasia or presented clinical evidence of HPV infection elsewhere in the body. Patients with immunosuppressive diseases, such as hepatitis C, hepatitis B, HIV, diabetes mellitus, and others, were excluded from the study.

The present study was performed after approval by the Ethics and Scientific Committee of the Santa Casa Hospital Complex, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (protocol number 1954/08). Informed consent was obtained from all women before being enrolled in the study.

### **Epidemiological data**

The epidemiological data were obtained from all the women by individual interviews during the clinical examinations and included the following variables: age, race, smoking, age at first sexual intercourse, parity, number of sexual partners in lifetime, genital infections and oral contraception for more than five years.

### **Sample collection and cervical cytology**

At the inclusion in the study pregnant and non-pregnant women were submitted a clinical exam of cervix, cytopathological sampling, colposcopy and cervical sampling for HPV. These clinical exams were repeated in every trimester and in puerperium. Blood samples were obtained by venous puncture in the moment of study inclusion and also repeated every trimester. Cervical samples were collected using a special brush for cytopathological sampling of the cervix. The brush was then immersed into 10 mL of phosphate-buffered saline (PBS) and vigorously agitated so that residual cells were dislodged. Both cervical samples of pregnant and non-pregnant women are served by the same pathology department with cytology results cross-checked by the same group of cytologists who were blinded to the HPV testing results. Blood samples were collected into a tube with EDTA. The material for PCR were frozen to – 20 °C until DNA extraction.

### **DNA extraction**

The blood DNA was extracted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacture's instructions. Cervical scrapes DNA was extracted as described by Richards et al. [11]. DNA

quantification was made in device GeneQuantII (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd. England).

### **PCR with consensus primers GP5+/GP6+**

All samples were initially subjected to PCR with consensus primers GP5+/GP6+, which permit the detection of a large spectrum of HPV types.  $\beta$ -globin gene primers were used to control the quality of the isolated DNA. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. Negative controls included all reagents except DNA. SiHa and HeLa cells were used as positive controls. Ten samples were analyzed per negative control.

### **PCR with specific primers E6/E7**

After the PCRs using consensus primers, the HPV positive samples were tested for the presence of HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 45 by additional specific PCRs. Type-specific primer sets targeting the E6/E7 region of the investigated HPV types were used in the analysis as previously described (Table 1) [12,13]. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. Negative controls included all reagents except DNA. SiHa cells were used as positive control for HPV16 and HeLa cells for HPV18 [12]. A combination of cervical samples known to contain DNA from the HPVs 6, 11, 31, 33 and 45 was used as positive control for those HPV types. Standard safeguards were adopted in order to avoid false-positive reaction due to contamination. All samples were processed in a biosafety cabinet in a laboratory physically separated from where PCR amplification was performed. PCR tubes

were opened with sterile gauze squares, sterile gloves were changed after each test, and negative controls were used in all PCR reactions.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with the SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences* - version 13.0). The variables were described as mean and standard deviation, median and interquartile ranges or absolute and relative frequencies, when indicated. To compare continuous variables were analyzed by the Student's t-test or Mann-Whitney. For categorical variables, chi-square test was applied. To control for confounding factors, the analysis of multivariate logistic regression was applied. The measure of Odds Ratio (OR) and the 95% confidence interval (95% CI) were used. The variables included in the model were those showing a p value  $<0.20$  in bivariate analysis. The level of statistical significance was set at 5% ( $P \leq 0.05$ ).

### **Results**

Ninety-one pregnant women (mean age  $30.6 \pm 6.9$  years, 17 to 44 years) were included in the study. Sixteen (17.58%) participants were in the first trimester, 41/91 (45.05%) were in the second trimester and the other 34/91 (37.36%) were in the third trimester. The control group consisted of ninety-two non-pregnant women (mean age  $31.9 \pm 7.0$ , 15 to 43 years). All cervical and blood samples were positive for the  $\beta$ -globin gene, indicating that DNA was available for molecular analysis. The clinical characteristics of the groups are showing in Table 2. Regarding the risk factors for cervix cancer, only the number of pregnancies

was higher in the group of pregnant women than the group of non pregnant. For the other risk factors there was no significant difference (Table 2).

Human papillomavirus (HPV) was found in 23 (25.3%) of the cervical samples of the 91 pregnant women. The positive rate for cervical HPV infection according to gestations period were 12.5% for first trimester, 29.2% for second trimester and 26.4% for third trimester; and did not show a significant variation ( $P=0.41$  by  $\chi^2$  test). HPV DNA was detected from 12 (13%) of cervical samples of 92 non-pregnant women. When HPV DNA positive rates were compared between the pregnant and non-pregnant groups, significant difference was observed by overall ( $P=0.035$ ) even after multivariate logistic regression (Table 3).

Statistical analysis showed significant association among cervical HPV infection and age, number of sexual partners in lifetime and abnormal cytology (Table 4).

The women who returned postpartum were only 18.6% (17/91). The seventeen mothers evaluated, only one of these had HPV during pregnancy. In its puerperal review this women showed up negative for HPV DNA.

HPV 16 was found in 34,8% of pregnant women (8/23) and 50% of the control group (6/12) ( $P=0,477$ ). For HPV 18, 56,5% of pregnant women (13/23) and 75% of the control group (9/12) were positive ( $P=0,463$ ). HPV 6/11 were detected in three no pregnant and none of pregnant women. HPV 31 was detected only in one no pregnant and none of pregnant women. No positive woman for HPV 33 and 45 were found in both groups. Eleven women had HPVs other than the types tested (nine pregnant and two non pregnant women). HPV 16 and 18 were found in 30,4% (7/23) of pregnant women and 41,6% of the control group (5/12).

There was no significant difference between the groups for any type of HPV, except to HPV 6/11 ( $P=0,034$ ).

Out the 23 HPV-positive pregnant women, 17 (73.9%) had normal cytology. Six women had HPV-related lesions: atypical cells of undetermined significance (ASC-US) or Low grade squamous intraepithelial lesion (L-SIL). Out the 12 HPV-positive non-pregnant women, seven (58.3%) had normal cytology and five had ASC-US or L-SIL.

No HPV DNA was detected in blood samples of both groups.

## **Dicussion**

The most diagnosed cancer during pregnancy is the cervical cancer [15] and is highly prevalent in developing countries [14]. In our study the prevalence of HPV in pregnant women was 25.3%, which demonstrates the importance of this pioneering study in a country of high risk for cervical cancer. There is strong epidemiological evidence of carcinogenic action of HPV in cervical cancer [16]. It has been shown that the transcriptional promoter of E6-E7 transforming region of HPV16 contains a steroid hormone receptor binding element that stimulates HPV E6 and E7 transcription, suggesting a hormonal activation effect on HPV replication. An increased incidence of HPV-related cervical neoplasia has also been reported in immunosuppressed women. These observations suggest that pregnancy may have an effect on the behavior of HPV [7]. Studies with different designs have sought to verify the prevalence of HPV infection during pregnancy, however the results have been conflicting.

The prevalence of HPV in pregnant women in our study is similar to that Gajewska et al. [5] who found a prevalence of 26% of HPV (PCR) in normal



pregnant women. The comparison of HPV prevalence in pregnant and non pregnant women, demonstrated a significant difference between these groups. These results are in line with the studies reported by Fife et al. [17] and Morrison et al. [18].

In this study, we used consensus primers PCR (GP5+/GP6+), which allows the detection of a large spectrum of HPV DNA types, even in clinical specimens with low viral loads (170 copies/ $\mu$ L). Subsequently we used specific E6/E7 primers for genotype identification. This combination of methods provides a very accurate approach to detect the most frequent oncogenic and non oncogenic types of HPV present in cervix.

The estimated presence of HPV DNA in pregnant women reported by different authors varies widely. The percentage of positive findings depends on the method of assay and the number of particular primers used in the study. So far, studies on the prevalence of HPV infection in pregnancy have yielded controversial results, demonstrating either a higher incidence of HPV infection in pregnant women or no differences compared to non-pregnant women [19].

A possible explanation for the higher rates of HPV in pregnant compared to non-pregnant women comes from studies showing that immunosuppression occurs during pregnancy, and this is because of the reduction of cellular immunity, since there is a significant reduction in lymphocyte response [20]. Some authors suggest that high levels of estrogen and progesterone, that occur in pregnancy, depress cellular immunity, which is essential for the resolution of HPV infection [21]. Thus, genital lesions caused by HPV seem, clinically, occur more frequently and / or are more exuberant during pregnancy and improve or regress after delivery [19]. In this study, we can not say conclusively that there is difference in

the prevalence of HPV in the puerperium, because the patients who returned postpartum were only 18.6%. The seventeen mothers evaluated, only one had HPV during pregnancy. In its puerperal review the woman showed up negative for HPV DNA.

When we assessed the prevalence of HPV in different gestational periods, no significant difference was found. This may be due to the small number of pregnant women in the first trimester, as they had a lower prevalence than the others.

Currently, the data comparing the distribution of HPV types in pregnant and non-pregnant women are scarce. In our study, we tested the most common subtypes of low and high risk HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33 and 45) and there was no difference between groups with respect to the HPV types as described by other authors [7]. In contrast Fife [17] found no difference between groups for low-risk HPV, but more prevalence of high risk HPV in pregnant women.

We were not able to detect HPV DNA in blood samples. There are only three articles investigating HPV DNA in blood samples of pregnant women. Tseng et al. [22] studied 52 women in the third trimester of pregnancy, detecting HPV 16 in mononuclear cells from peripheral blood in 17.3% of cases using in vitro the enzymatic deoxyribonucleic acid amplification method. Gagewska et al. [5] analyzed 15 pregnant women with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) and 30 normal pregnant women. They detected HPV 6/11 and HPV 16 in 3 (13.34%) of the diabetic pregnant women and 3 (10%) of normal pregnant women. Rombaldi et al. [23] investigated 49 pregnant women with HPV related lesions and found HPV in 6.3% of their blood samples. It is important to take into account that most studies that found HPV DNA in blood of pregnant women analyzed patient

with evident cervical lesions or with abnormal cytology. Perhaps the investigation of HPV DNA in blood samples should not be necessary.

The groups studied were homogeneous in terms of age of the women evaluated, since the HPV prevalence is highest among young women and there is a decline in prevalence among older women [24]. The features of HPV infection observed in our series were consistent with those from others authors, who reported a dependence of HPV prevalence on age, number of sexual partners and abnormal cytology [25].

It should be pointed out that in this study a small number of patients was evaluated in the first quarter and a low number of women returned for postpartum assessment.

This pioneering study was conducted in a developing country that is a risk area for cervical cancer and it was found a significantly higher prevalence of HPV infection during pregnancy. This finding might be related to the relative immunosuppression observed in pregnant women, outlining the importance of the early diagnosis of the viral infection in this specific population.

### **Conflicts of interest**

The authors have no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

The authors thank the medical students Mauren Fronckowiak Salis and Razyane Audibert Silveira by the assistance in the Laboratory of Molecular Biology.

## References

- [1] zur Hausen H. Papillomavirus in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009; 384:260-5.
- [2] International Agency for Research on Cancer - IARC. [Internet] Human papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk to Humans, vol. 64. Lyon, France: I; 1995. [cited 2010 Feb 12]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/>
- [3] Grce M, Husnjak K, Matovina M, Milutin N, Magdic L, Husnjak O, et al. Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, and Adeno-associated virus infections in pregnant and nonpregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1341-4.
- [4] Loomis DM, Pastore PA, Rejman K, Gutierrez KL, Bethea B. Cervical cytology in vulnerable pregnant women. *J Am Acad Nurse Pract* 2009 May;21(5):287-94.
- [5] Gajewska M, Marianowski L, Wielgos M, Malejczyk M, Majewski S. The occurrence of genital types of human papillomavirus in normal pregnancy and in pregnant women with pregestational insulin dependent diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2005 Dec;26(6):766-70.
- [6] Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leao E, Zugaib M. Prevalence of “high risk” human papillomavirus in the lower genital tract of Brazilian gravidas. *Int J Gynecol Obstet* 2000;69(3):223–7.
- [7] Chan PK, Chang AR, Tam WH, Cheung JL, Cheng AF. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection: Comparison between pregnant women and non-pregnant controls. *J Med Virol*. 2002 Aug;67(4):583-8.

- [8] Medeiros LR, Ethur ABM, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica*. 2005;21(4):953-64.
- [9] Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Nov;6(11):4171-5.
- [10] Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5428-34.
- [11] Richards B, Skoletsky J, Schuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from bucal brushes/swabs. *Hum Mol Genet*. 1993 Feb;2(2):159-63.
- [12] Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33:569-74.
- [13] Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3176–84.
- [14] Instituto Nacional do Câncer – INCA. [Internet]. Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, [cited 2010 Feb 03]. Available from: <http://www.inca.gov.br> e <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.
- [15] Creasman WT. Cancer and pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;943:281-6.

- [16] Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000 Oct;19(1-2):1-5.
- [17] Fife KH, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR, Hansell R. Cancer-associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 May;174(5):1487-93.
- [18] Morrison EA, Gammon MD, Goldberg GL, Vermund SH, Burk RD. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet.* 1996 Aug;54(2):125-30.
- [19] Nobbenhuis M, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC, Rozendaal L, Bezemer PD, Voorhorst FJ, et al. High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum. *Br J Cancer.* 2002 Jul;87:75–80.
- [20] Sethi S, Müller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L, et al. Serologic response to the E4, E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Feb;178(2):360-4.
- [21] Banura C, Franceschi S, van Doorn LJ, Arsian A, Kleter B, Wabwire-Mangen F, et al. Prevalence, incidence and clearance of human papillomavirus infection among young primiparous pregnant women in Kampala, Uganda. *Int J Cancer.* 2008 Nov;123(9):2180-7.
- [22] Tseng CJ, Lin CY, Wang RL, Chen LJ, Chang YL, Hsieh TT, et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Jan;166(1 Pt 1):35-40.

- [23] Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virology*. 2008 Sep;5:106.
- [24] Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 1999;9:177-86.
- [25] Spitzer M, Burk RD. Human Papillomavirus ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. *Obstet Gynecol*. 2005 Apr; 105(4):905-18.

**Table 1.** Primers sequences and base pair (bp) length

Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
GP5+/GP6+ <sup>a</sup>	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC	≈ 140
	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	142 for HPV 16
HPV 6/11 E6/E7	TACTACTGCTGGACAACATGC	302
	GTGCGCAGATGGGACACAC	
HPV16/E6	CAGGACCCACAGGAGCGACC	380
	ATCGACCGGTCCACCGACCC	
HPV18/E6	GCTTTGAGGATCCAACACGG	440
	TGCAGCACGAATGGCACTGG	
HPV31 E6/E7	GAAATTGCATGAACTAAGCTCG	263
	CACATATACCTTTGTTTGTCAA	
HPV33 E6/E7	ACTATACACAACATTGAACTA	398
	GTTTTTACACGTCACAGTGCA	
HPV 45 E6/E7	GTGGAAAAGTGCATTACAGG	151
	ACCTCTGTGCGTTCCAATGT	
β-globin	CAACTTCATCCACGTTCCACC	268
PC04	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	
GH20		

<sup>a</sup> Variable nucleotide positions are in bold and mean **Y** = C or T



**Table 2- Clinical characteristics**

<b>Variables</b>	<b>Pregnant (n=91)</b>	<b>Non-pregnant (n=92)</b>	<b>P</b>
Age (years) - Mean $\pm$ SD	30.6 $\pm$ 6.9	31.9 $\pm$ 7.0	0.198*
First sexual intercourse (years) –Mean $\pm$ SD	16.6 $\pm$ 3.1	16.6 $\pm$ 2.9	0.968*
Pregnancy – Median (P25 – P75)	3 (2 – 4)	2 (0 – 3)	<b>&lt;0.001**</b>
Vaginal birth – Median (P25 – P75)	1 (0 – 2)	0 (0 – 2)	0.324**
Cesarean section – Median (P25 – P75)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0.356**
Abortion – Median (P25 – P75)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0.188**
Sexual partners – Median (P25 – P75)	3 (2 – 4)	3 (1 – 4)	0.543**
Genital infections – n (%)	53 (58.2)	68 (73.9)	<b>0.025***</b>
Colposcopic alterations – n (%)	n=89 16 (18.0)	n=92 14 (15.2)	0.618***
Smoking – n (%)	n=89 28 (31.5)	n=91 28 (30.8)	0.920***
Abnormal cytology– n (%)	n=88 6 (6.8)	n=92 8 (8.7)	0.638***
Oral contraceptive ( Five or more years) – n (%)	n=66 33 (50.0)	n=92 50 (54.3)	0.589***

\* Student test

\*\* Mann-Whitney test

\*\*\* Chi-square test

SD: Standard deviation

**Table 3 – Analysis of Multivariate logistic regression to assess factors independently associated with HPV positive**

<b>Variables</b>	<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>P</b>
Pregnant	2.54	1.08 – 6.00	0.034
Age (years)	0.94	0.88 – 1.00	0.056
Cesarean section	0.65	0.36 – 1.18	0.153
Sexual partners	1.32	1.15 – 1.52	<0.001

**Table 4 – Correlation with clinical variables and HPV cervical infection**

	HPV positive (n=35)	HPV negative (n=148)	P
Age (years) - Mean $\pm$ SD	28.8 $\pm$ 7.5	31.9 $\pm$ 6.7	<b>0.019*</b>
Age of first sexual intercourse (years) - Mean $\pm$ SD	16.3 $\pm$ 1.9	16.7 $\pm$ 3.2	0.435*
Pregnancies – Median (P25 – P75)	2 (1 – 3.3)	2 (1 – 3)	0.658**
Vaginal delivery – Median (P25 – P75)	0 (0 – 2)	1 (0 – 2)	0.952**
Cesarian section – Median (P25 – P75)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)	0.065**
Abortions – Median (P25 – P75)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)	0.202**
Number of sexual partners – Median (P25 – P75)	3 (2 – 8)	3 (1 – 4)	<b>0.007**</b>
Infecção Genital – n (%)	20 (57.1)	101 (68.2)	0.212***
Colposcopic alterations – n (%)	n=35 8 (22.9)	N=146 22 (15.1)	0.266***
Smoking – n (%)	n=35 11 (31.4)	N=145 45 (31.0)	0.964***
Abnormal cytology– n (%)	n=33 11 (33.3)	n=147 3 (2.0)	<b>&lt;0.001***</b>
Oral contraceptive (Five or more years) – n (%)	n=32 18 (56.3)	n=126 65 (51.6)	0.637***

\* Student test

\*\* Mann-Whitney test

\*\*\* Chi-square test

SD: Standard deviation

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

### **Prevalência de infecção por papilomavírus humano no colo do útero e no sangue de mulheres grávidas e não grávidas em um país em desenvolvimento**

Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo<sup>1</sup>, Andréa Souto Pires Damin<sup>2</sup>,  
Grasiela Agnes<sup>2</sup>, Suzana Arenhart Pessini<sup>1</sup>, Cláudio Osmar Pereira Alexandre<sup>2</sup>,  
Gustavo Py Gomes da Silveira<sup>1</sup>

1 Professor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brasil.

2 Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

Correspondência: Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo  
Endereço: Rua Prof. Annes Dias, 295, 1º Andar CEP-90020-090 Porto Alegre, RS, Brasil  
Telefone: +55-51-91511371/ Fax: +55-51-32148502  
E-mail: mila@ufcspa.edu.br

**Palavras-chave:** Papilomavírus humano, gestação, prevalência, reação em cadeia da polimerase.

**Sinopse:** Concluímos que há uma associação significativa entre gestação e positividade do DNA do HPV, sem comprovada disseminação hematogênica do vírus.

## Resumo

Alguns estudos sugerem que o processo fisiológico da gravidez altera o comportamento do HPV. Entretanto, os resultados a respeito da prevalência de HPV na gestação permanecem conflitantes. **Objetivos:** Investigar a presença de Papilomavírus humano (HPV) no colo do útero e em amostras de sangue de grávidas e não grávidas do sul do Brasil pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Métodos:** Noventa e uma gestantes e noventa e duas mulheres não gestantes foram prospectivamente incluídas no estudo. Elas foram entrevistadas e submetidas a exame citopatológico e colposcopia. Amostras de sangue e do colo do útero foram coletadas em cada trimestre e no puerpério. Todas as amostras foram analisadas através de PCR com *primers consensus* GP5+/GP6+. A genotipagem foi realizada usando *primers* específicos. **Resultados:** O DNA do HPV foi encontrado em 23/91 (25,3%) das amostras cervicais das mulheres grávidas e em 12/92 (13%) das amostras cervicais das mulheres não grávidas ( $P=0,035$ ). Há uma associação significativa entre infecção pelo HPV e idade mais jovem, número de parceiros sexuais na vida e alterações citopatológicas no colo do útero. HPV 16 e HPV 18 foram os tipos virais mais frequentemente detectados. Das 23 gestantes positivas, 17 (73,9%) apresentavam exame citopatológico normal. Não foi detectado DNA do HPV nas amostras de sangue de ambos os grupos. **Conclusão:** Há uma prevalência significativamente maior de infecção pelo HPV durante a gestação. Esse achado pode estar relacionado com a imunossupressão relativa, observada em mulheres grávidas, destacando a importância do diagnóstico precoce da infecção viral nessa população específica.

## Introdução

O câncer de colo do útero, na escala global, é o segundo câncer mais frequente em mulheres em todo o mundo, e sua etiopatogenia está relacionada à infecção pelo HPV [1]. Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados até o momento. Os tipos 16 e 18, classificados como vírus de alto risco para o câncer do colo do útero, são considerados carcinogênicos humanos pela Agência Internacional para Pesquisa no Câncer (IARC) [2].

Apenas 1% das pacientes positivas para o HPV de alto risco desenvolverá o câncer de colo do útero [3]. Uma vez que apenas uma pequena fração de mulheres infectadas pelo HPV desenvolve câncer cervical, outros fatores de risco poderão ser importantes determinantes do desenvolvimento da doença. Esses fatores de risco incluem idade das pacientes, idade de iniciação sexual, aumentado número de parceiros sexuais, parceiro com múltiplos parceiros sexuais, contraceptivos orais, tabagismo, paridade, imunossupressão, exposições ambientais e susceptibilidade genética [4].

Na gravidez, ocorre, fisiologicamente, uma imunossupressão. Recentemente, houve inúmeros relatos que descreveram o papel imunossupressor de hormônios: estrogênios, progesterona, gonadotrofina coriônica e somatotropina coriônica. Alfa-fetoproteína e prostaglandinas tipo E possuem propriedades imunossupressoras [5,6]. Estas observações sugerem que o possível estado temporário de alterações da imunidade e do aumento dos níveis de hormônios esteroides, durante a gravidez, pode ter um efeito sobre a replicação do HPV [7]. Uma revisão sistemática mostrou a ampla variação da prevalência de HPV (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) em gestantes de 5,5% a 65,0% [8].

Foi amplamente aceito que o HPV não sofre disseminação hematogênica para outros sítios, ou seja, não há fase de viremia no curso da infecção pelo HPV. No entanto, o DNA do HPV pode ser detectado no sangue periférico, em células mononucleares (PBMCs), soro ou plasma dos pacientes com câncer do colo do útero ou carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço associados ao HPV [9]. Portanto, deve ser considerado que as PBMCs poderão servir como carreadoras do HPV durante o curso da infecção. A maioria dos estudos que encontraram HPV em PBMCs foram realizados em pacientes imunodeprimidos ou com lesões relacionadas ao HPV ou câncer, e as taxas são variáveis [10].

O presente estudo foi conduzido para investigar a presença de HPV no colo do útero e em amostras de sangue de grávidas e não grávidas do sul do Brasil pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A presença de HPV foi correlacionada com os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de colo do útero.

## **Métodos**

Noventa e uma gestantes foram prospectivamente incluídas no estudo, de setembro de 2008 a outubro de 2009. Como grupo controle, noventa e duas mulheres não gestantes foram arroladas, advindas do ambulatório de ginecologia do mesmo Hospital. Nenhuma das pacientes apresentava história pregressa de câncer de colo do útero ou displasia nem evidências clínicas de infecção por HPV em outras partes do corpo. Pacientes com patologias que ocasionam imunossupressão, como hepatite C, hepatite B, HIV, diabetes mellitus, entre outras, foram excluídas do estudo.

O presente estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (protocolo número 1954/08). O consentimento informado foi obtido de todas as mulheres antes de serem incluídas no estudo.

### **Avaliação epidemiológica**

Os dados epidemiológicos foram obtidos de todas as mulheres por meio de entrevistas individuais durante os exames clínicos, incluindo as seguintes variáveis: idade, tabagismo, idade da primeira relação sexual, paridade, número de parceiros sexuais na vida, infecções genitais e uso de contracepção oral por mais de cinco anos.

### **Coleta das amostras e citologia cervical**

No momento da inclusão no estudo, grávidas e não grávidas foram submetidas a exame clínico do colo do útero, citopatológico, colposcopia e coleta de amostragem cervical para HPV. Os exames foram repetidos a cada trimestre e no puerpério. Amostras de sangue foram obtidas por punção venosa no momento da inclusão no estudo e, também, a cada trimestre. Foram coletadas amostras do colo do útero com escova especial para a amostragem citopatológica do colo uterino. A escova era então mergulhada em 10 mL de tampão fosfato (PBS) e agitada vigorosamente para que as células residuais fossem desalojadas. Ambas as amostras cervicais de mulheres grávidas e não grávidas foram avaliadas pelo mesmo departamento de patologia. Os resultados da citologia foram cruzados por um mesmo grupo de patologistas que ignoravam os resultados do teste de HPV.



Amostras de sangue foram coletadas em um tubo com EDTA. Os materiais para a PCR foram congelados a - 20 °C até a extração do DNA.

### **Extração do DNA**

O DNA do sangue foi extraído usando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA do raspado cervical foi extraído conforme descrito por Richards e cols. [11]. A quantificação do DNA foi feita no dispositivo GeneQuantII (Amersham Pharmacia Biotech SA Inglaterra).

### **PCR com *primers consensus* GP5+/GP6+**

Todas as amostras foram inicialmente submetidas a PCR com *primers consensus* GP5+/GP6+, que permitem a detecção de um grande espectro dos tipos de HPV. Os *primers* para a  $\beta$ -globina foram utilizados para controlar a qualidade dos DNA isolados. Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Os controles negativos incluíram todos os reagentes, exceto o DNA. Células SiHa e HeLa foram utilizadas como controles. Foram analisadas dez amostras por controle negativo.

### **PCR com *primers específicos* E6/E7**

Após o PCR utilizando *primers consensus*, as amostras HPV positivas foram testadas para detectar a presença, ou não, de HPV dos tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 45 por PCR adicional específico. *Primers* específicos para a região E6/E7 dos tipos de HPV investigados foram utilizados na análise, como descrito

anteriormente (Tabela 1) [12,13]. Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Os controles negativos incluíram todos os reagentes, exceto o DNA. Células SiHa foram utilizadas como controle positivo para o HPV16 e células HeLa para HPV18 [12]. Uma combinação de amostras cervicais conhecida por conter DNA de HPV 6, 11, 31, 33 e 45 foi utilizada como controle positivo para esses tipos de HPV. Precauções de segurança foram adotadas para evitar a reação falso-positivo devido à contaminação. Todas as amostras foram processadas em um gabinete de biossegurança em um laboratório com separação física do local de amplificação do PCR. Tubos de PCR foram abertos com gaze, luvas esterilizadas foram trocadas após cada teste, e os controles negativos foram utilizados em todas as reações de PCR.

### **Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada utilizando o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13.0. As variáveis foram descritas através de média e desvio padrão, mediana e amplitude interquartílica ou frequências absolutas e relativas, quando indicado. Para comparar as variáveis contínuas foram utilizados os testes t-Student ou de Mann-Whitney. Para as variáveis categóricas, o teste qui-quadrado de Pearson foi aplicado. Para controlar fatores de confusão, a análise de Regressão Logística multivariada foi aplicada. A medida de *Odds Ratio* (OR) e o intervalo de 95% de confiança foram utilizados. As variáveis incluídas no modelo foram as que apresentaram um valor  $P < 0,20$  na análise bivariada. O nível de significância estatística considerado foi de 5% ( $P \leq 0,05$ ).

## Resultados

Noventa e uma gestantes (idade média de  $30,6 \pm 6,9$  anos, 17 a 44 anos) foram recrutadas. Dezesesseis (17,58%) participantes estavam no primeiro trimestre, 41 (45,05%) no segundo trimestre e as outras 34 (37,36%) no terceiro trimestre. O grupo controle foi constituído de noventa e duas mulheres não gestantes (idade média de  $31,9 \pm 7,0$ , 15 a 43 anos). Todas as amostras de sangue e de colo do útero foram positivas para o gene da  $\beta$ -globina, indicando que o DNA estava disponível para a análise molecular. As características clínicas dos grupos estão demonstradas na Tabela 2. Com relação aos fatores de risco para câncer de colo do útero, apenas o número de gestações foi maior no grupo das gestantes que das não gestantes. Nos demais fatores de risco não houve diferença significativa (Tabela 2).

O Papilomavírus humano (HPV) foi encontrado em 23 (25,3%) das amostras cervicais das 91 mulheres grávidas. A taxa de positividade para a infecção por HPV na gestação foi de 12,5% no primeiro trimestre, 29,2% no segundo trimestre e 26,4% no terceiro trimestre e não houve diferença significativa ( $P = 0,41$  pelo teste de  $\chi^2$ ). O DNA do HPV foi detectado em 12 (13%) das amostras cervicais das 92 mulheres não grávidas. Foi observada uma diferença significativa, quando as taxas de positividade do DNA do HPV foram comparadas entre os grupos de gestantes e não gestantes ( $P=0,035$ ), mesmo após análise multivariada de Regressão Logística (Tabela 3).

A análise estatística mostrou associação significativa entre infecção pelo HPV e idade, número de parceiros sexuais na vida e alterações citopatológicas (Tabela 4).

As mulheres que retornaram no puerpério foram apenas 18,6% (17/91). Das dezessete puérperas avaliadas, apenas uma destas apresentava HPV durante a gestação. Na sua revisão puerperal a gestante apresentou-se negativa para DNA de HPV.

O HPV 16 foi encontrado em 34,8% das gestantes (8/23) e 50% do grupo controle (6/12) ( $P=0,477$ ). Para o HPV 18, 56,5% das gestantes (13/23) e 75% do grupo controle (9/12) foram positivas ( $P=0,463$ ). HPV 6/11 foram detectados em 3 mulheres não gestantes e em nenhuma gestante. O HPV 31 foi detectado em apenas uma mulher não gestante e em nenhuma gestante. Nenhuma mulher positiva para os HPV 33 e 45 foram encontradas em ambos os grupos. Onze mulheres apresentavam outro HPV, diferente dos tipos testados (nove gestantes e duas não gestantes). HPV 16 e 18 concomitantes foram encontrados em 30,4% (7/23) das gestantes e 41,6% do grupo controle (5/12). Não houve diferença significativa entre os grupos para os tipos de HPV, exceto os HPV 6/11 ( $P=0,034$ ).

Das 23 gestantes positivas, 17 (73,9%) apresentavam citopatológico normal. Seis mulheres apresentavam lesões relacionadas ao HPV: atipias de significado indeterminado (atypical cells of undetermined significance ASC-US) ou Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LIE BG). Das 12 pacientes do grupo controle positivas, 7 (58,3%) apresentavam citopatológico normal e cinco apresentavam ASC-US ou LIE BG.

Não foi detectado DNA do HPV nas amostras de sangue de ambos os grupos.

## **Discussão**

O câncer de colo do útero é o mais frequentemente diagnosticado na gestação [15] e apresenta prevalência aumentada nos países em

desenvolvimento [14]. Em nosso estudo foi encontrada uma prevalência de HPV em gestantes de 25,3%, o que demonstra a importância deste estudo pioneiro em um país de risco para câncer de colo do útero. Existem fortes evidências epidemiológicas da ação carcinogênica do HPV no colo do útero [16]. Tem sido demonstrado que a região de transcrição do gene E6-E7 do HPV16 possui receptor de hormônio esteroide que estimula a transcrição de E6 e E7, sugerindo um efeito ativador hormonal na replicação do HPV. Um aumento da incidência das neoplasias de colo uterino relacionadas ao HPV também tem sido relatado em mulheres imunossuprimidas. Estas observações sugerem que a gravidez pode ter um efeito sobre o comportamento do HPV [7]. Estudos com desenhos diferentes têm procurado verificar a prevalência da infecção pelo HPV durante a gestação; entretanto, os resultados têm sido conflitantes.

Nossos achados estão de acordo com a literatura, semelhante ao de Gajewska e cols. [5], que encontraram uma prevalência de 26% de HPV (PCR) em gestantes normais. Quanto à comparação de prevalência do HPV em gestantes e não gestantes, demonstrou-se uma diferença significativa entre os grupos. Esses resultados são semelhantes aos demonstrados por outros autores [17,18].

Neste estudo, utilizamos PCR com *primers consensus* (GP5+/GP6+), que permitem a detecção de um grande espectro dos tipos de HPV DNA e que são capazes de detectar amostras clínicas com baixa carga viral (170 cópias / mL). Posteriormente, foi realizado PCR adicional com *primers* específicos E6/E7, para identificação genotípica. Essa combinação de métodos fornece uma abordagem muito acurada que consegue abranger os tipos mais frequentes de HPV oncogênicos e não oncogênicos, presentes no colo do útero.

A presença estimada de HVP DNA em mulheres grávidas, relatado por diferentes autores, varia muito. A porcentagem de resultados positivos depende do método e do tipo de *primers* específicos utilizados no estudo. Até agora, estudos sobre a prevalência de infecção por HPV na gravidez apresentaram resultados controversos, demonstrando, em alguns trabalhos, uma maior incidência de infecção por HPV em mulheres grávidas ou, em outros, nenhuma diferença em comparação a mulheres não grávidas [19].

A possível explicação para as maiores taxas de HPV em gestantes, quando comparadas às das não gestantes, provém de estudos que demonstram ocorrência de imunossupressão na gestação, e que esta é atribuída à redução da imunidade celular, já que há uma redução significativa da resposta linfocitária [20]. Alguns autores sugerem que altos níveis de estrogênio e progesterona, próprios do estado gravídico, deprimem a imunidade celular, que é essencial para a resolução da infecção pelo HPV [21]. Dessa forma, as lesões genitais ocasionadas pelo HPV parecem, clinicamente, ocorrer mais frequentemente e/ou são mais exuberantes durante a gestação e melhoram ou regridem após o parto [19]. Neste estudo, não se pode afirmar conclusivamente que exista diferença de prevalência do HPV no puerpério, pois as pacientes que retornaram no puerpério foram apenas 18,6%. Das dezessete puérperas avaliadas, apenas uma apresentava HPV durante a gestação. Na sua revisão puerperal, a gestante apresentou-se negativa para DNA do HPV.

Quando foi avaliada a prevalência do HPV em diferentes períodos gestacionais, não se demonstrou diferença significativa. Isso pode ter ocorrido pelo pequeno número de gestantes no primeiro trimestre, já que elas apresentaram uma prevalência menor que as demais.

Os dados comparando a distribuição dos tipos de HPV em gestantes e não gestantes são escassos. Em nosso estudo foram testados os subtipos mais frequentes de baixo e alto risco oncogênico (6, 11, 16, 18, 31, 33 e 45) e não houve diferença entre os grupos, com relação aos tipos de HPV, conforme descrito por outros autores [7]. Em contraste, Fife e cols. [17] não encontraram diferença entre os grupos para HPV de baixo risco, porém maior prevalência nas gestantes para os tipos de alto risco.

Não detectamos DNA de HPV em amostras de sangue. Existem apenas três artigos de investigação do DNA do HPV em amostras de sangue nas mulheres grávidas. Tseng e cols. [22] estudaram 52 mulheres no terceiro trimestre de gestação e detectaram HPV 16 em células mononucleares do sangue periférico em 17,3% dos casos, usando o método de amplificação enzimática do ácido desoxirribonucleico in vitro. Gagewska e cols. [5] analisaram 15 mulheres grávidas com diabetes mellitus insulino-dependentes (DMID) e 30 gestantes normais. Eles detectaram HPV 6 / 11 e HPV 16 em 3 (13,3%) das mulheres diabéticas grávidas e 3 (10%) das gestantes normais. Rombaldi e cols. [23] investigaram 49 mulheres grávidas com lesões relacionadas com o HPV e encontraram DNA de HPV em 6,3% das amostras de sangue. É importante destacar que a maioria dos estudos que encontraram DNA do HPV no sangue de gestantes analisaram pacientes com lesões cervicais evidentes ou alterações no exame citopatológico. Talvez a investigação do DNA de HPV no sangue não seja necessária.

Os grupos avaliados apresentavam homogeneidade quanto à faixa etária das mulheres avaliadas, uma vez que a prevalência do HPV é alta entre as mulheres jovens e se verifica um declínio desta prevalência entre as pacientes de

idade mais avançada [24]. As características da infecção por HPV observada em nossa série foram compatíveis com as de outros autores, que relataram uma dependência da prevalência do HPV com a idade das pacientes, número de parceiros sexuais e alterações no exame citopatológico [25].

Deve ser salientado que neste estudo houve um menor número de gestantes avaliadas no primeiro trimestre e um baixo número de gestantes que retornaram para avaliação puerperal.

Este estudo pioneiro foi realizado em um país em desenvolvimento, que é uma área de risco para câncer de colo do útero, e foi encontrada uma prevalência significativamente maior de infecção pelo HPV durante a gestação. Esse achado pode estar relacionado com a imunossupressão relativa, observada em mulheres grávidas, destacando a importância do diagnóstico precoce da infecção viral nessa população específica.

### **Conflitos de interesse**

Os autores não apresentam conflito de interesses.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem às estudantes de medicina Mauren Fronckowiak Salis e Razyane Audibert Silveira pelo auxílio no Laboratório de Biologia Molecular.



## Referências

- [1] zur Hausen H. Papillomavirus in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009; 384:260-5.
- [2] International Agency for Research on Cancer - IARC. [Internet] Human papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk to Humans, vol. 64. Lyon, France: I; 1995. [acesso em 2010 Feb 12]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/>
- [3] Grce M, Husnjak K, Matovina M, Milutin N, Magdic L, Husnjak O, et al. Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, and Adeno-associated virus infections in pregnant and nonpregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1341-4.
- [4] Loomis DM, Pastore PA, Rejman K, Gutierrez KL, Bethea B. Cervical cytology in vulnerable pregnant women. *J Am Acad Nurse Pract* 2009 May;21(5):287-94.
- [5] Gajewska M, Marianowski L, Wielgos M, Malejczyk M, Majewski S. The occurrence of genital types of human papillomavirus in normal pregnancy and in pregnant women with pregestational insulin dependent diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2005 Dec;26(6):766-70.
- [6] Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leao E, Zugaib M. Prevalence of “high risk” human papillomavirus in the lower genital tract of Brazilian gravidas. *Int J Gynecol Obstet* 2000;69(3):223–7.
- [7] Chan PK, Chang AR, Tam WH, Cheung JL, Cheng AF. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection: Comparison between pregnant women and non-pregnant controls. *J Med Virol*. 2002 Aug;67(4):583-8.

- [8] Medeiros LR, Ethur ABM, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica*. 2005;21(4):953-64.
- [9] Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Nov;6(11):4171-5.
- [10] Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5428-34.
- [11] Richards B, Skoletsky J, Schuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from bucal brushes/swabs. *Hum Mol Genet*. 1993 Feb;2(2):159-63.
- [12] Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33:569-74.
- [13] Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3176–84.
- [14] Instituto Nacional do Câncer – INCA. [Internet]. Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, [acesso em 2010 Feb 03]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> e <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.
- [15] Creasman WT. Cancer and pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;943:281-6.

- [16] Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000 Oct;19(1-2):1-5.
- [17] Fife KH, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR, Hansell R. Cancer-associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 May;174(5):1487-93.
- [18] Morrison EA, Gammon MD, Goldberg GL, Vermund SH, Burk RD. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet.* 1996 Aug;54(2):125-30.
- [19] Nobbenhuis M, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC, Rozendaal L, Bezemer PD, Voorhorst FJ, et al. High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum. *Br J Cancer.* 2002 Jul;87:75–80.
- [20] Sethi S, Müller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L, et al. Serologic response to the E4, E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Feb;178(2):360-4.
- [21] Banura C, Franceschi S, van Doorn LJ, Arsian A, Kleter B, Wabwire-Mangen F, et al. Prevalence, incidence and clearance of human papillomavirus infection among young primiparous pregnant women in Kampala, Uganda. *Int J Cancer.* 2008 Nov;123(9):2180-7.
- [22] Tseng CJ, Lin CY, Wang RL, Chen LJ, Chang YL, Hsieh TT, et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Jan;166(1 Pt 1):35-40.

- [23] Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virology*. 2008 Sep;5:106.
- [24] Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 1999;9:177-86.
- [25] Spitzer M, Burk RD. Human Papillomavirus ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. *Obstet Gynecol*. 2005 Apr; 105(4):905-18.

**Tabela 1. Sequências dos Primers e comprimento dos pares de base (pb)**

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Tamanho (pb)</b>
GP5+/GP6+ <sup>a</sup>	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC GAAAATAAACTGTAAATCATATTC	≈ 140 142 for HPV 16
HPV 6/11 E6/E7	TACTACTGCTGGACAACATGC GTGCGCAGATGGGACACAC	302
HPV16/E6	CAGGACCCACAGGAGCGACC ATCGACCGGTCCACCGACCC	380
HPV18/E6	GCTTTGAGGATCCAACACGG TGCAGCACGAATGGCACTGG	440
HPV31 E6/E7	GAAATTGCATGAACTAAGCTCG CACATATACCTTTGTTTGTCAA	263
HPV33 E6/E7	ACTATACACAACATTGAACTA GTTTTTACACGTCACAGTGCA	398
HPV 45 E6/E7	GTGGAAAAGTGCATTACAGG ACCTCTGTGCGTTCCAATGT	151
β-globin	CAACTTCATCCACGTTCCACC	268
PC04	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	
GH20		

<sup>a</sup> Posição variável do nucleotídeo estão marcadas e significam Y = C ou T

**Tabela 2 – Características clínicas**

Variáveis	Grupo Gestantes (n=91)	Grupo Não gestantes (n=92)	P
Idade (anos) - Média ± DP	30,6 ± 6,9	31,9 ± 7,0	0,198*
Idade de Início das relações sexuais (anos) – Média ± DP	16,6 ± 3,1	16,6 ± 2,9	0,968*
Nº de gestações – Mediana (P25 – P75)	3 (2 – 4)	2 (0 – 3)	<b>&lt;0,001**</b>
Nº de partos – Mediana (P25 – P75)	1 (0 – 2)	0 (0 – 2)	0,324**
Nº de cesáreas – Mediana (P25 – P75)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,356**
Nº de abortamentos – Mediana (P25 – P75)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0,188**
Nº de parceiros – Mediana (P25 – P75)	3 (2 – 4)	3 (1 – 4)	0,543**
Infecção Genital – n (%)	53 (58,2)	68 (73,9)	<b>0,025***</b>
Colposcopia alterada – n (%)	n=89 16 (18,0)	n=92 14 (15,2)	0,618***
Tabagismo – n (%)	n=89 28 (31,5)	n=91 28 (30,8)	0,920***
Citopatológico alterado – n (%)	n=88 6 (6,8)	n=92 8 (8,7)	0,638***
Contraceção oral (5 anos ou mais) – n (%)	n=66 33 (50,0)	n=92 50 (54,3)	0,589***

\* teste t-student

\*\* teste de Mann-Whitney

\*\*\* teste qui-quadrado de Pearson

DP: desvio padrão

**Tabela 3 – Análise de Regressão Logística Multivariada para avaliar fatores independentemente associados com a positividade para HPV**

<b>Variáveis</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
Grupo Obstétrico	2,54	1,08 – 6,00	0,034
Idade (anos)	0,94	0,88 – 1,00	0,056
Nº de cesáreas	0,65	0,36 – 1,18	0,153
Nº de parceiros	1,32	1,15 – 1,52	<0,001

**Tabela 4 – Associação das variáveis em estudo com o HPV**

Variáveis	HPV positivo (n=35)	HPV negativo (n=148)	P
Idade (anos) - Média ± DP	28,8 ± 7,5	31,9 ± 6,7	<b>0,019*</b>
Idade de Início das relações sexuais (anos) - Média ± DP	16,3 ± 1,9	16,7 ± 3,2	0,435*
Nº de gestações – Mediana (P25 – P75)	2 (1 – 3,3)	2 (1 – 3)	0,658**
Nº de partos – Mediana (P25 – P75)	0 (0 – 2)	1 (0 – 2)	0,952**
Nº de cesáreas – Mediana (P25 – P75)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)	0,065**
Nº de abortamentos – Mediana (P25 – P75)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)	0,202**
Nº de parceiros – Mediana (P25 – P75)	3 (2 – 8)	3 (1 – 4)	<b>0,007**</b>
Infecção Genital – n(%)	20 (57,1)	101 (68,2)	0,212***
Histórico familiar de HPV – n(%)	2 (5,7)	9 (6,1)	0,927***
Circuncuncisão – n(%)	3 (8,6)	8 (5,5)	0,492***
Vulva alterada – n(%)	1 (2,9)	2 (1,4)	0,528***
Colposcopia alterada – n(%)	n=35 8 (22,9)	n=146 22 (15,1)	0,266***
Tabagismo – n(%)	n=35 11 (31,4)	n=145 45 (31,0)	0,964***
Citopatológico alterado – n(%)	n=33 11 (33,3)	n=147 3 (2,0)	<b>&lt;0,001***</b>
Uso de ACO por no mínimo 5 anos– n(%)	n=32 18 (56,3)	n=126 65 (51,6)	0,637***

\* teste t-student para amostras independentes

\*\* teste de Mann-Whitney

\*\*\* teste qui-quadrado de Pearson

DP: desvio padrão

ACO: anticoncepcional oral



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se uma maior prevalência de DNA de HPV no colo do útero das gestantes, quando comparado com não gestantes.

Não se detectou presença de DNA do HPV no sangue de pacientes gestantes e não gestantes.

As características da infecção por HPV observada demonstraram uma associação da prevalência do HPV no colo do útero com a idade das pacientes, número de parceiros sexuais e alterações no exame citopatológico.

Concluimos que há maior prevalência de infecção pelo HPV, no colo do útero, durante a gestação, provavelmente refletindo o estado de relativa imunossupressão que ocorre em gestantes. Nossos achados apontam para a necessidade de detecção precoce desta infecção viral neste grupo populacional específico.

## **6. ANEXOS**

**ANEXO 1 - Protocolo da coleta de dados**

Nome da paciente/etiqueta

Data da inclusão \_\_/\_\_/\_\_

Idade:

( ) gestante US \_\_/\_\_/\_\_ \_\_\_\_\_

DUM \_\_/\_\_/\_\_ certeza: ( ) sim ( ) não

IG na data da inclusão:

( ) não gestante

Motivo da consulta ( ) revisão ginecológica ( ) pré-natal  
 ( ) alteração no colo / vulva ( ) sangramento  
 ( ) anticoncepção  
 ( ) outro \_\_\_\_\_

menarca \_\_ IRS \_\_ gesta \_\_ para \_\_ cesareas \_\_ abortos \_\_

número de parceiros \_\_

anticoncepção ( ) sim; qual? \_\_\_\_\_ ACO? ( ) sim \_\_ anos ( ) não

( ) não

menopausa ( ) sim \_\_ anos

( ) não

tabagismo ( ) sim ( ) passado ( ) não

medicações em uso – nome e doses

outra doença associada \_\_\_\_\_

HCV ( )+ ( )- HbsAg ( )+ ( )- HIV ( )+ ( )-

Já tratou outras infecções genitais? ( ) sim (qual? \_\_\_\_\_ )

( ) não

História familiar de CA colo do útero? ( ) sim

( ) não

Circuncisão no parceiro sexual masculino? ( ) sim

( ) não

Exame físico

peso \_\_ kg altura \_\_, \_\_ m circunf abdominal \_\_ cm estado geral \_\_\_\_\_

abdome \_\_\_\_\_ mamas \_\_\_\_\_

vulva ( ) normal ( ) anormalidade \_\_\_\_\_

colposcopia ( ) normal ( ) anormalidade / grau: \_\_\_\_\_

toque \_\_\_\_\_

Resultado CP \_\_\_\_\_ data \_\_/\_\_/\_\_

Laboratório \_\_\_\_\_

Resultado AP biópsia colo do útero \_\_\_\_\_ data \_\_/\_\_/\_\_

Laboratório \_\_\_\_\_

#### Seguimento

1) \_\_/\_\_/\_\_ ( ) revisão normal ( ) alteração \_\_\_\_\_

2) \_\_/\_\_/\_\_ ( ) revisão normal ( ) alteração \_\_\_\_\_

3) \_\_/\_\_/\_\_ ( ) revisão normal ( ) alteração \_\_\_\_\_

4) \_\_/\_\_/\_\_ ( ) revisão normal ( ) alteração \_\_\_\_\_

**ANEXO 2 - Parecer do comitê de ética****Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585  
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68  
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br

**PARECER CONSUBSTANCIADO****Parecer complementar nº 404/08****Protocolo nº 1954/08**

**Título:** “*Deteção do Papiloma vírus humano e via de disseminação em pacientes gestantes: comparação com não-gestantes*”.

**Pesquisador Responsável:** Mila de Moura Behar Pontremoli Salcedo

**Instituição onde se realizará** – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

**Data de Entrada:** 08/08/08

**II- Objetivos** – Avaliar se existe associação entre gestação e prevalência de DNA viral dos tipos oncogênicos e não oncogênicos principais no colo uterino.

**III - Sumário do Projeto:**

**Descrição e caracterização da amostra:** Trata-se de um estudo de coortes. A população em estudo será constituída de pacientes provenientes do pré-natal de alto risco e do ambulatório de Ginecologia do Complexo Hospitalar Santa Casa que preencherem os critérios de participação no protocolo de pesquisa. O tamanho mínimo da amostra foi calculado em 106 pacientes em cada grupo.

**Crítérios de inclusão:** Serão incluídos no estudo dois grupos de pacientes. Gestantes do pré-natal de alto-risco que estiverem no primeiro trimestre de gestação e pacientes do ambulatório de Ginecologia que concordarem e participar do estudo mediante assinatura de termo de consentimento informado (anexo 1).

**Crítérios de exclusão:** Serão excluídos as pacientes que não concordarem em participar do estudo. Da mesma forma, não serão admitidas pacientes que apresentem qualquer doença que afete o sistema imunológico, tais como Diabetes Mellitus, infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), e doenças reumáticas. Também não serão admitidas pacientes com história atual ou pregressa de câncer de qualquer localização.

**Adequação das condições** - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito.

**IV -Comentários:**

- **Justificativa do uso de placebo** – Não se aplica.
- **Análise de riscos e benefícios** – adequada.
- **Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo** – adequado.



# Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585  
CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68  
Site: [www.santacasa.org.br](http://www.santacasa.org.br) – E-mail: [marketing@santacasa.tche.br](mailto:marketing@santacasa.tche.br)



**-Informação adequada quanto ao financiamento** – adequada.

**-Outros centros no caso de estudos multicêntricos** – O estudo será realizado na ISCMPA e UFCSPA.

**V –Parecer do Relator** – “Após reavaliação das alterações acima descritas, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição”.

**VI -Data da Reunião:** 02/09/2008.

**VII – Data da Reavaliação:** 30/09/2008.

**“Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Aprovados”.**

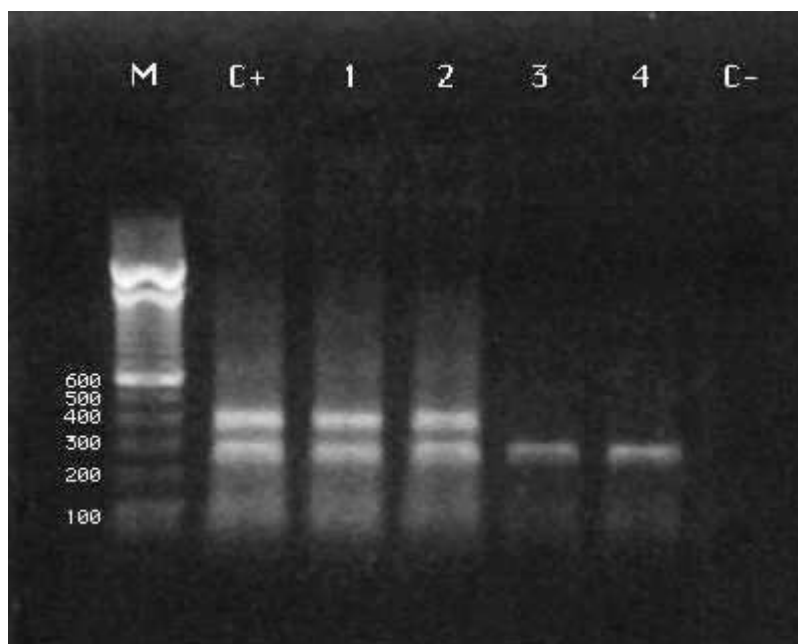
*Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).*

*2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.*

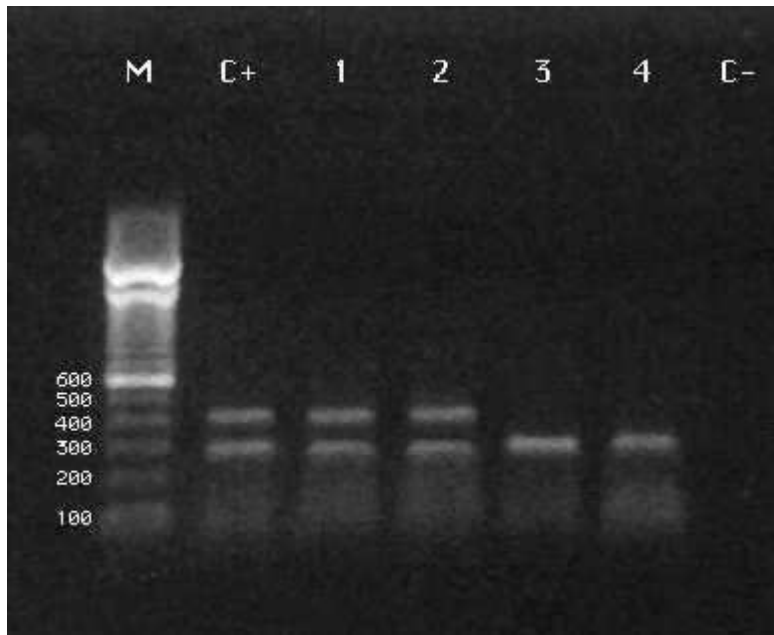
Porto Alegre, 30 de Setembro de 2008.

Dr. Cláudio Teloken  
Coordenador do CEP/ISCMPA

## ANEXO 3 – Figuras



**Figura 1.** Eletroforese dos produtos da multiplex PCR com primer HPV16 para região E6 (380 pb) e primer para B-globina (268pb) em gel de agarose 2%: M: Marker (100 bp DNA ladder; Gibco BRL); C+:controle positivo para HPV-16 (células SiHa ); 1, 2 amostras positivas para HPV16 e com B-globina positiva; 3,4: amostras negativas para HPV16 e positivas para B-globina. C- controle negativo sem DNA.



**Figura 2.** Eletroforese dos produtos da multiplex PCR com primer HPV18 para região E6 (440 pb) e primer para B-globina (268pb) em gel de agarose 2%: M: Marker (100 bp DNA ladder; Gibco BRL); C+:controle positivo para HPV-18 (células HeLa ); 1, 2 amostras positivas para HPV18 e com B-globina positiva; 3,4: amostras negativas para HPV18 e positivas para B-globina. C- controle negativo sem DNA.



# 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](#)