



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

SARAH CARVALHO DE ALENCAR SAMPAIO

**IDENTIFICAÇÃO DE HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM CITOLOGIA EM
MEIO LÍQUIDO COM ATIPIAS ESCAMOSAS E CARCINOMA ESCAMOSO**

FORTALEZA

2015

SARAH CARVALHO DE ALENCAR SAMPAIO

**IDENTIFICAÇÃO DE HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM CITOLOGIA EM
MEIO LÍQUIDO COM ATIPIAS ESCAMOSAS E CARCINOMA ESCAMOSO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Orientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S186i

Sampaio, Sarah Carvalho de Alencar.

Identificação de HPV de alto risco oncogênico em citologia em meio líquido com atipias escamosas e carcinoma escamoso/ Sarah Carvalho de Alencar Sampaio. – 2015.
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Patologia, Fortaleza, 2015.

Orientação: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.

1. Papillomavírus Humano 16. 2. Papillomavírus Humano 18. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 4. Genótipo. 5. Doenças do Colo do Útero. I. Título.

CDD 616.951

SARAH CARVALHO DE ALENCAR SAMPAIO

**IDENTIFICAÇÃO DE HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM CITOLOGIA EM
MEIO LÍQUIDO COM ATIPIAS ESCAMOSAS E CARCINOMA ESCAMOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Aprovada em: 04/03/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eleutério Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Raquel Autran Coelho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Katherine da Silveira Gonçalves de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio do Laboratório Professor Eleutério da Costa (LABPEC) na pessoa de seus responsáveis Dra. Diane Isabelle Magno Cavalcante e Dr. José Eleutério Júnior.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus queridos pais, Jefferson e Fátima, irmãos Jefferson e Larissa, e ao meu amado, Juliano, pelo apoio e compreensão.

Ao Prof. Dr. José Eleutério Júnior, pela excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, Profa. Dra. Raquel Autran Coelho, e Profa. Dra. Ana Katherine da Silveira Gonçalves de Oliveira, pelo tempo dedicado, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Dra. Renata Eleutério, por sua colaboração com a pesquisa de prontuários e trabalho no laboratório.

Ao Laboratório Professor Eleutério da Costa (LABPEC), na pessoa de seus responsáveis, Dra. Diane Isabelle Magno Cavalcante e Dr. José Eleutério Júnior.

Aos amigos e colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Às secretárias do Mestrado em Patologia Paula e Valéria, pela atenção sempre dedicada.

À Universidade Federal do Ceará, por proporcionar aprimoramento de conhecimento e realização de novas pesquisas através da pós-graduação.

“A vida é tão breve, um sonho fugaz, daqui só se leva o bem que se faz.”

Ivo Fachinni

RESUMO

OBJETIVOS: Identificar genótipos de HPV de alto risco em citologias em meio líquido com diagnóstico de atipias escamosas e carcinoma escamoso. **MÉTODOS:** Foi realizado estudo de corte transversal utilizando 165 citologias em meio líquido com atipias escamosas e 149 sem atipias. Nesse material foi realizado genotipagem do HPV por PCR em tempo real. O material foi processado pelo Sistema Cobas[®] 4800 (Roche), que apresenta três canais de detecção, para HPV 16, HPV 18, e HPV AR (outros doze genótipos de HPV de alto risco). **RESULTADOS:** Foram analisados 75 casos de ASC-US, 62 LSIL, 8 ASC-H, 12 HSIL e 8 carcinomas escamosos. A média etária foi de 32,2 anos no grupo sem atipias, 31,1 anos para ASC-US e LSIL, 41,2 anos para ASC-H e HSIL e 43,1 anos para CEC. Houve 112 casos positivos para HPV (68%) no grupo com atipias, sendo 72% de positividade para HPV AR, 18% de HPV 16 e 10% de HPV 18. Somente nos casos de ASC-US a frequência de HPV positivo e negativo foi semelhante (1:1). Nas demais, a quantidade de casos HPV positivo ultrapassou a de negativos. No grupo de citologias sem atipias, foram encontrados 40 casos positivos para HPV (26%), sendo 68% de positividade para a sonda HPV AR, 17% de HPV 18 e 15% de HPV16. Predominaram detecções por uma única sonda em ambos os grupos (88% e 84%). No grupo com atipias, a combinação mais presente foi HPV AR e 16 (57%); e nos casos sem atipias, foi HPV AR e 18 (68%) e houve um único caso positivo para os três canais neste grupo. **CONCLUSÕES:** A prevalência de outros 12 genótipos de alto risco de HPV (que não 16 e 18), foi frequente, em citologias com e sem atipias escamosas, associados ou não aos genótipos 16 e 18. A relação de atipias escamosas com HPV 16 e HPV AR foi significativa. Os dados obtidos estão em concordância com a literatura quanto à existência de uma heterogeneidade na distribuição dos diversos genótipos e sua associação mais frequente conforme o nível de atipia.

Palavras-chave: Papillomavírus Humano 16. Papillomavírus Humano 18. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Genótipo. Doenças do Colo do Útero.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To identify high-risk HPV genotypes in liquid-based cytology smears (SurePath®) with diagnosis of squamous atypia and squamous carcinoma. **METHODS:** This was a cross-sectional study using 165 liquid-based cytology with squamous atypia and 149 without atypia. HPV genotyping by real-time PCR was performed on this material. The material was processed by COBAS® 4800 System (Roche), which has three detection channels: HPV 16, HPV 18, and HPV HR (other twelve high-risk genotypes). **RESULTS:** We analyzed 75 cases of ASC-US, 62 LSIL, 8 ASC-H, 12 HSIL and 8 squamous carcinomas. The average age was 32.2 years in the group without atypia, 31.1 years for ASC-US and LSIL, 41.2 years for ASC-H and HSIL and 43.1 years for SCC. There were 112 positive cases for HPV (68%) in the group with atypia: 72% positive for HPV AR, 18% of HPV16 and 10% of HPV 18. Only in ASC-US group, HPV positive and negative frequency was similar (1:1). In the others, the amount of HPV positive cases surpassed negative ones. In the group of cytology without atypia were found 40 positive cases for HPV (26%): 68% positive for HPV AR probe, 17% of HPV18 and 15% of HPV16. Detections by a single probe predominated in both groups (88% and 84%). In the group with atypia the most prevalent combination was HPV16 and HPV HR (57%); and in cases without atypia was HPV18 and HPV HR (68%) and there was a single positive case for three channels in this group. **CONCLUSIONS:** The prevalence of other 12 high-risk HPV genotypes (not 16 and 18), was frequent in cytology with and without squamous atypia, associated or not with genotypes 16 and 18. The connection of squamous atypia with HPV 16 and HPV HR was significant. The data obtained are in agreement with the literature regarding the existence of heterogeneity in the distribution of different genotypes and their most frequent association as the level of atypia.

Keywords: Human papillomavirus 16. Human papillomavirus 18. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Genotype. Uterine Cervical Diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Diagrama esquemático das quantidades de amostras com atipias citológicas, positivas para HPV de alto risco, de acordo com a sonda/genótipo detectada(o)	32
Figura 2 –	Quadro 1: Significância das associações de genótipos de HPV com atipias citológicas	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Detecção de HPV de alto risco por sonda isolada em citologias com e sem atipias	30
Gráfico 2 –	Identificação de HPV de alto risco por tipo de alteração em citologias com e sem atipias.....	31
Gráfico 3 –	Detecções combinadas, com positividade para mais de um canal, em amostras de citologias com atipias, em distribuição por tipo de atipia	33
Gráfico 4 –	Presença de HPV de alto risco, de acordo com o tipo de atipia escamosa	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência dos genótipos de HPV de alto risco de acordo com o resultado citológico	29
Tabela 2 – Distribuição de infecções por tipo de HPV em citologias com atipias escamosas e sem atipias.....	30
Tabela 3 – Prevalência geral de HPV 16, HPV 18 e de outros 12 genótipos de alto risco em amostras de citologias com atipias escamosas	31
Tabela 4 – Presença de HPV 16, 18 ou AR (outros doze genótipos de alto risco) em citologia com atipias escamosas	32
Tabela 5 – ASC-H + HSIL X ASC-US + LSIL + citologias sem atipias: análise estatística comparativa quanto à detecção de HPV de alto risco	35
Tabela 6 – Presença de HPV de alto risco associada a achados atípicos escamosos em citologia em meio líquido	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGC	<i>Atypical Glandular Cells</i> (Células glandulares atípicas)
ASCCP	<i>American Society for Colposcopy and Cervical Pathology</i> (Sociedade Americana de Colposcopia e patologia Cervical)
ASC-H	<i>Atypical squamous cells – cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion</i> (Células escamosas atípicas – não se pode excluir lesão de alto grau)
ASC-US	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
CAP	<i>College of American Pathologists</i> (Colégio Americano de Patologistas)
CEC	Carcinoma escamoso celular ou carcinoma de células escamosas
CH2	Captura híbrida 2 (de 2ª geração)
CML	Citologia em meio líquido
DST	Doença sexualmente transmissível
<i>et al</i>	<i>et alli</i> (do latim: e outros; e colaboradores)
FDA	Food and Drug Administration
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus humano)
HPV AR	HPV de alto risco: (Sonda ou canal que identifica) doze tipos de HPV de alto risco, que não HPV 16 e 18
HPV HR	High risk HPV: (probe that identifies) twelve genotypes of high-risk HPV, but HPV 16 and 18
HSIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i> (Lesão intraepitelial de alto grau)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer

LCR	<i>Long control region</i>
LSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i> (Lesão intra-epitelial de baixo grau)
neg	Negativo
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
PCR-RT	<i>PCR Real time</i> (PCR em tempo real)
RR	Risco relativo
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
URR	<i>Upstream regulatory region</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- ® Marca Registrada
- β Beta
- Ø Ausência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	O papilomavírus humano.....	16
1.2	Epidemiologia da infecção pelo HPV.....	17
1.3	Atipias escamosas.....	18
1.4	Métodos de detecção de lesões associadas ao HPV.....	19
1.4.1	Citologia e meio líquido (CML)	20
1.4.2	Métodos de biologia molecular	21
2	JUSTIFICATIVA.....	23
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Geral.....	24
3.2	Específicos.....	24
4	MÉTODOS.....	25
4.1	Modelo do estudo.....	25
4.2	Material do estudo.....	25
4.2.1	Critérios de inclusão.....	25
4.2.2	Critérios de exclusão.....	25
4.3	Procedimento e processamento da PCR.....	25
4.4	Estudos estatísticos.....	27
4.5	Considerações éticas	27
5	RESULTADOS.....	29
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÕES.....	47

REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE A – Instrumento de coleta de dados	55

1 INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) tornaram-se um importante problema de saúde pública nas últimas décadas, principalmente nos países menos desenvolvidos, os quais são detentores de 80% dos casos de infecção pelo Papilomavírus humano (GIRALDO *et al.*, 2008).

O HPV (Papilomavírus humano) é um dos agentes que mais causam DST no mundo, em homens e mulheres, sobressaindo-se por sua alta frequência de infecções genitais. Pelo menos 50% dos indivíduos irão entrar em contato com o vírus durante a vida. Na população feminina geral, a prevalência global é de 11,7% (BRUNI *et al.*, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 630 milhões de pessoas (1:10) estão infectadas pelo HPV no mundo. No Brasil, são estimados 700 mil novos casos por ano, podendo ser considerado uma epidemia (FEDRIZZI, 2011; GIRALDO *et al.*, 2008).

Evidências têm demonstrado clara relação entre o Papilomavírus humano (HPV) e neoplasias anogenitais e extragenitais (KONDO *et al.*, 2012; ZUR HAUSEN, 2009). O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012) e no Brasil, é o terceiro tumor mais comum na população feminina, e a quarta causa de morte feminina por câncer (INCA, 2014).

Tendo em vista a heterogeneidade de achados sobre os genótipos de HPV conforme a população estudada e sua relação com lesões pré-invasoras e invasoras escamosas do colo uterino, faz-se necessário estudar mulheres atendidas na cidade de Fortaleza – Ceará, Brasil, para definir esta associação e comparar com achados de outros centros de pesquisa.

1.1 O papilomavírus humano

O HPV é um vírus DNA icosaédrico, não envelopado, pertencente à família *Papillomaviridae* e ao gênero Papilomavírus. Possui um capsídeo com 72 capsômeros, e genoma em dupla fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases. Seu genoma em dupla fita circular possui oito regiões: as fases de leitura aberta e uma região não-codificadora. As primeiras são organizadas em três regiões: a região precoce (*Early*) composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, a região tardia (*Late*), com os genes L1 e L2, e a região controladora longa (LCR) ou *upstream regulatory region* (URR). Os genes E1 e E2 codificam proteínas para replicação do DNA e controle da transcrição gênica. A proteína E4 é expressa nas fases

tardias de infecção e tem relação com alteração da matriz intracelular, maturação e liberação de novas partículas virais, e a ela se atribui a formação do coilócito, célula característica de infecções por HPV. As proteínas E6 e E7 participam da amplificação do genoma viral. E as regiões tardias L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral, durante os últimos estágios da replicação (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

Consta na literatura que mais de 200 tipos de HPV já foram identificados, e que aproximadamente 40 têm a capacidade de infectar o trato genital feminino (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012). Em geral, têm a capacidade de infectar e induzir desenvolvimento de lesão em epitélio de pele e mucosas. Atualmente já foram isolados, caracterizados e aceitos 170 tipos (DE VILLIERS *et al.*, 2004; DE VILLIERS, 2013). Esses vários tipos são classificados como de baixo ou de alto risco, de acordo com seu potencial oncogênico (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012). São HPV de baixo risco mais frequentes: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 e os de alto risco mais frequentes: 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66, 73 e 82, sendo os HPV 6, 11, 16 e 18 os responsáveis pela maioria das lesões (MUÑOZ *et al.*, 2003).

1.2 Epidemiologia da infecção pelo HPV

A infecção genital pelo HPV é considerada a DST mais frequente em todo o mundo entre homens e mulheres, com prevalência global estimada de 11,7% (BRUNI *et al.*, 2010) em mulheres sexualmente ativas com achados citológicos normais, com declínio da prevalência com aumento da idade (GIRALDO *et al.*, 2008). Em todas as regiões estudadas, costuma apresentar dois picos de prevalência, o primeiro em idades mais jovens, por volta da segunda e terceira década de vida (abaixo de 25 anos) e, particularmente nas Américas e na África, um rebote em idades mais avançadas, a partir da quinta década de vida (a partir de 45 anos). (BRUNI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014).

A prevalência de infecções subclínicas pelo HPV em grupos com faixa etária de grande atividade sexual chega a ser maior que 40% nas mulheres com uma taxa anual de infecção de 10 a 15%. A partir dos 30 anos, essa prevalência cai para 5 a 10% (CASTELLSAGUÉ, 2008), sugerindo o desenvolvimento de imunidade HPV tipo específica, e há um segundo pico de prevalência a partir de 50 anos (FEDRIZZI, 2011).

Lesões verrucosas podem estar presentes em cerca de 1% dos adultos sexualmente ativos. Um estudo longitudinal realizado com jovens sem nenhum contato

sexual, encontrou uma incidência de 7,9% de infecção por HPV. Em mulheres que tinham relações sexuais somente com mulheres, encontrou-se HPV em infecção genital, em 19% da população estudada (FEDRIZZI, 2011).

A distribuição dos tipos de HPV parece ser variável de acordo com os países ou regiões (BRUNI *et al.*, 2010; SERRANO *et al.*, 2014). Os cinco tipos mais detectados no mundo todo, de acordo com metanálise de Bruni *et al.* (2010), foram HPV 16 (3.2%), HPV 18 (1.4%), HPV 52 (0.9%), HPV 31 (0.8%), e HPV 58 (0.7%). Há algumas evidências de que o HPV 16 pode persistir por maior tempo, tendo assim maior disseminação do que os demais tipos (FEDRIZZI, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2009).

1.3 Atípias escamosas

Atípias escamosas são alterações citológicas envolvendo células escamosas da cérvix uterina, que podem ou não estar associadas ao HPV. Segundo a terminologia de Bethesda 2001 são consideradas atípias escamosas: ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* ou Células escamosas atípicas de significado indeterminado), ASC-H (*Atypical squamous cells - cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion* ou Células escamosas atípicas - não se pode excluir lesão de alto grau), LSIL (*Low-grade squamous intraepithelial lesion* ou Lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (*High-grade squamous intraepithelial lesion* ou Lesão intraepitelial de alto grau) e o carcinoma de células escamosas (CEC) (MARCHETTA; DESCAMPS, 2007).

Estima-se que 8 a 10% das mulheres com esfregaço de ASC-US e que pelo menos 80% das pacientes com ASC-H apresentam lesões de alto grau subjacentes (SOLOMON *et al.*, 2001). É sabido também que cerca de 83% das pacientes com LSIL têm HPV de alto risco (SOLOMON *et al.*, 2001; THE ALTS GROUP, 2000). Entretanto, está claro que a prevalência da infecção por HPV de alto risco diminui com a idade nas LSIL (MARCHETTA; DESCAMPS, 2007).

De acordo com a CAP-ASCCP (*College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) em publicação de recomendações recente intitulada *The LAST Project*, o Papilomavírus humano interage com o epitélio escamoso de duas formas, basicamente. Na primeira, há produção viral, mas as lesões são transitórias, caracterizando processos que já foram denominados de lesões de baixo grau, neoplasia intra-epitelial grau 1, displasia leve e condiloma. Em algum momento do ciclo de

vida do vírus, a infecção por Papilomavírus humano no epitélio escamoso produz lesão de baixo grau, embora nem sempre clinicamente detectável. E, a segunda forma de interação entre epitélio e HPV é caracterizada por lesões geralmente classificadas como pré-cancerosas, o que acontece quando é perdido o equilíbrio entre expressão do gene viral e diferenciação epitelial. Sabe-se que a superexpressão do oncogene viral leva a proliferação celular, produzindo uma expansão clonal de células relativamente indiferenciadas, clinicamente caracterizada por detecção viral persistente, anormalidades colposcópicas e risco aumentado de transformação maligna (DARRAGH *et al.*, 2012).

Os tipos 6 e 11 são responsáveis por mais de 90% das verrugas anogenitais em ambos os sexos e 25% das lesões intra-epiteliais cervicais de baixo grau. Os tipos 16 e 18 estão associados a cerca de 25% das lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau, 50% das de alto grau, 70% dos carcinomas epidermóides (FEDRIZZI, 2011; DE SANJOSE, 2010). Há variação, de acordo com a região do globo estudada, quanto aos principais tipos de HPV associados ao câncer de colo de útero e suas lesões precursoras (BRUNI *et al.*, 2010; GIRALDO *et al.*, 2008; SERRANO *et al.*, 2014). Porém os tipos 16 e 18 são os mais frequentes no mundo inteiro, e no Brasil são responsáveis por 55,3% e 14,1% dos casos de câncer cervical, respectivamente (GIRALDO *et al.*, 2008). Os tipos 16 e 18 parecem apresentar um potencial oncogênico maior em relação aos demais vírus (RODRIGUES *et al.*, 2009).

1.4 Métodos de detecção de lesões associadas ao HPV

Em adição ao teste de Papanicolaou, tradicionalmente usado há décadas para rastreamento de câncer de colo uterino, novas tecnologias têm sido acrescentadas ao conjunto de testes diagnósticos disponível para a detecção precoce desse tipo de neoplasia, entre as quais estão incluídos a citologia em meio líquido (CML) e os testes para detecção do HPV por captura híbrida (CAETANO *et al.*, 2006) e reação em cadeia de polimerase (PCR).

Os métodos de biologia molecular disponíveis atualmente têm dado considerável contribuição para o diagnóstico e identificação de infecções pelo HPV. Além disso, o desenvolvimento de novos testes diagnósticos imuno-histoquímicos para detecção de marcadores tumorais, permite que se identifiquem casos com maior risco de progressão (ELEUTÉRIO Jr *et al.*, 2007).

Através de técnicas de biologia molecular de alta sensibilidade, pode ser encontrado HPV de alto risco em praticamente 100% dos cânceres cervicais. DNA de HPV pode ser detectado em 70 a 90% das lesões intra-epiteliais de alto grau, 20 a 50% das lesões de baixo grau e em 50% de lesão citológicas de significado indeterminado (CASTELLSAGUÉ, 2008).

Os tipos virais mais frequentes nos casos de carcinoma invasivo são HPV 16, 18, 31, 33,39, 45, 52, 58 e 59 (BERNARD *et al.*, 2013). A detecção de DNA de HPV tem sido usada como marcador de prognóstico nos casos de citologia com mais de uma interpretação, como nos casos de ASC-US podendo ser um preditor de lesão de alto grau co-existente, e tem sensibilidade maior e melhor custo-benefício em relação à repetição da citologia ou mesmo à colposcopia imediata, com ou sem biópsia (CASTELLSAGUÉ, 2008).

Em uma meta-análise realizada para avaliar a precisão do teste de DNA HPV (captura híbrida 2), como uma alternativa à repetição da citologia em mulheres que tiveram resultados ambíguos em exame de Papanicolaou, a literatura publicada indica que o teste de DNA HPV melhorou a precisão (maior sensibilidade e especificidade similar) do que a repetição da citologia nos casos de ASC-US, com resultado histológico de NIC II (ARBYN *et al.*, 2004). O rastreio primário de HPV seguido de triagem por citologia pode ser uma estratégia mais favorável para identificar NIC II ou mais, com possibilidade de intervalos entre triagens seguros e mais longos (IBAÑEZ *et al.*, 2014).

1.4.1 Citologia em meio líquido (CML)

A citologia em meio líquido é um método em que as células são imersas em líquido conservante antes da fixação da lâmina. A amostra cervical é similar à convencional, porém passa por centrifugação (*SurePath*[®]) e filtração após dispersão (*ThinPrep*[®]) em suspensão líquida, para obtenção da monocamada de células preservadas, em processo automatizado (ANSCHAU; GONÇALVES, 2006; BD CELL, 2015; THE THINPREP, 2010).

Isso evita o ressecamento do material e reduz a quantidade de artefatos e de exames insatisfatórios, portanto, gerando melhor qualidade dos resultados, com sensibilidade potencialmente maior do que a do teste de Papanicolaou. Além disso, o material pode ser também utilizado para diagnóstico de outras infecções sexualmente transmissíveis, como clamídia, gonococcia, e Papilomavírus humano, por meio de biologia molecular (CAETANO *et al.*, 2006; SHERMAN *et al.*, 1997).

A citologia em meio líquido foi originalmente desenvolvida e aprovada para a preservação e preparação de células para rastreamento de câncer. Existe um interesse crescente no uso de citologia em meio líquido para rastreamento primário para HPV, de forma que as amostras positivas, então seriam submetidas a citologia, genotipagem do tipo de HPV, ou outro método de triagem (AGREDA *et al.*, 2013).

1.4.2 Métodos de Biologia Molecular

As técnicas amplamente utilizadas para a detecção de DNA de HPV são a PCR e hibridação em fase líquida como, a Captura Híbrida. São análises qualitativas e somente a captura híbrida é quantitativa. A captura híbrida 2 (CH2) pode detectar a maioria dos genótipos de HPV cancerígenos, porém tem algumas limitações, como: reação cruzada com genótipos de HPV não-cancerígenos, como 11, 54 e 66, que reduziria o valor preditivo positivo e a especificidade clínica, além da incapacidade de identificar tipos específicos e infecções múltiplas e falta de um controle interno para avaliar a adequação da amostra (JUNYANGDIKUL *et al.*, 2013).

A PCR em tempo real (PCR-TR) é uma variante do método de PCR convencional, que permite distinguir as sequências de bases amplificadas de DNA por análise da temperatura de separação das duplas fitas. A ocorrência de contaminações é reduzida, pois as reações acontecem em ambiente fechado. O uso de sondas universais teoricamente permite a detecção de todos os tipos de HPV existentes (RODRIGUES *et al.*, 2009).

A PCR em tempo real é considerada um método mais sensível, específico e reprodutível para detecção e quantificação de DNA e RNA. Em comparação à PCR convencional, a PCR em tempo real oferece uma faixa dinâmica de detecção muito mais ampla. A faixa dinâmica de um ensaio determina que se possa detectar ou quantificar quantidades mínimas de moléculas, bem como quantidades extremamente altas de moléculas presentes em uma amostra biológica. Uma importante possibilidade oferecida por esse método é a realização com maior facilidade de técnicas conhecidas como “*multiplex*”. Essas técnicas permitem a amplificação de diferentes sequências alvos dentro de uma única amostra através da detecção de sinais de fluorescência em canais óticos distintos (CENTRO DE GENOMAS-METODOLOGIA PCR).

Os testes de HPV tem utilização tanto em pacientes com anormalidades citológicas quanto no rastreamento primário, mostrando-se um método mais sensível e reprodutível

e com melhor valor preditivo do que a citologia isolada (STOLER *et al.*, 2007), e deve ser considerado em populações em que os programas de citologia sejam insuficientes ou não eficazes (BOSCH *et al.*, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Devido à escassez de dados sobre tipos de HPV e lesões escamosas pré-invasoras e invasoras do colo uterino diagnosticadas em citologia em meio líquido, em mulheres, no Ceará, há dúvidas sobre se há peculiaridades nesse grupo. Assim é essencial um estudo que defina quais genótipos de HPV estão associados aos tipos de lesão em questão, para adicionar informação à literatura crescente a respeito.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a prevalência dos genótipos de HPV de alto risco oncogênico em material de citologia em meio líquido, com diagnóstico de atipias e carcinoma escamoso, e de citologia sem atipias.

3.2 Específicos

- 1) Identificar a prevalência de genótipos de HPV 16, 18 e outros doze tipos de alto risco por PCR em tempo real (Cobas 4800) em material de citologia em meio líquido com diagnóstico de:
 - ASC-US;
 - ASC-H;
 - LSIL;
 - HSIL;
 - Carcinoma Escamoso.

- 2) Identificar a prevalência de genótipos de HPV 16, 18 e outros doze tipos de alto risco por PCR em tempo real (Cobas 4800) em material de citologia em meio líquido sem atipias:
 - Comparar a prevalência de genótipos de HPV 16, 18 e outros doze tipos de alto risco por PCR em tempo real (Cobas 4800) em material de citologia em meio líquido com diagnóstico de atipias e sem atipias;

 - Avaliar associação de genótipos de HPV em citologias alteradas com atipias escamosas;

 - Comparar prevalências encontradas com valores de prevalência da população mundial.

4 MÉTODOS

4.1 Modelo do Estudo

Corte transversal, comparativo.

4.2 Material de Estudo

Amostra de citologia em meio líquido (CML) de colo uterino, de mulheres sexualmente ativas atendidas em clínica privada, no período de Maio de 2012 a Maio de 2014, em Fortaleza, Ceará, Brasil.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Material de citologia cervical em meio líquido com diagnóstico de ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e carcinoma escamoso, e citologia em meio líquido sem atipias, com identificação de genótipos de HPV por PCR em tempo real, pelo Sistema Cobas 4800.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Não houve participação, no estudo, de material citológico de usuárias gestantes e se PCR foi inválido por questões técnicas.

4.3 Procedimento e Processamento da PCR

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa e mediante assinatura do Termo de Fiel Depositário, foram selecionadas, do arquivo, 149 amostras de citologia sem atipias, e 165 amostras de citologia em meio líquido com diagnóstico de ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e carcinoma escamoso, coletadas entre Maio de 2012 e Maio de 2014, todas elas com genotipagem de HPV de alto risco por PCR em tempo real através do sistema Cobas, totalizando 314 amostras.

O formulário foi preenchido na ocasião da seleção dos casos, com dados provenientes do cadastro, prontuário e guia de solicitação de exame das pacientes, com informações como: idade, diagnóstico citológico de atipia escamosa: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL ou carcinoma escamoso, ou ausência de atipias, e resultado da PCR para genotipagem de HPV de alto risco, quando presente.

Para processamento do PCR em tempo real foram utilizadas amostras de material coletado para citologia em meio líquido, que podem permanecer um mês em temperatura ambiente e até seis meses sob refrigeração de 2 a 8°C. O material foi analisado pelo Cobas® 4800 System (Roche), que combina a tecnologia dos equipamentos Cobas X480 Instrument e Cobas Z480 Analyzer.

A PCR em tempo real combina amplificação e detecção simultaneamente e requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um *software* para aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A Fluorescência emitida é mensurada em tempo real à medida que os produtos são originados no decorrer da reação. Durante toda a reação, uma curva é gerada de acordo com a concentração do produto sintetizado e em função do número de ciclos (CENTRO DE GENOMAS-METODOLOGIA PCR).

O sistema Cobas® 4800 é um teste automatizado que tem como objetivos eliminar a dificuldade, o fluxo manual, reduzir o tempo de resposta do exame e aumentar a escala, oferecer uma plataforma para testes de rastreio (como exemplo, para clamídia, gonococo e HPV), com performance tanto do ponto de vista analítico quanto clínico, ajustado aos algoritmos e diretrizes dos testes atuais (Cobas 4800 SYSTEM).

O sistema de PCR em tempo real a ser utilizado nesta pesquisa (Cobas 4800®) é um teste automatizado qualitativo *multiplex, in vitro*, em um único tubo, com detecção de quatorze genótipos de HPV de alto risco. O teste Cobas HPV fornece genotipagem individual para HPV 16 e HPV 18 e um resultado simultâneo para outros doze genótipos de HPV de alto risco (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Utiliza o gene da β -globina humana como controle interno, o que reduz a possibilidade de resultado falso-negativo, alertando quando a amostra não possuir células coletadas, de forma que uma amostra HPV negativa sem um sinal positivo para β -globina não pode ser considerado um verdadeiro negativo (COBAS HPV; LAPIERRE *et al.*, 2012; MATEOS LINDEMANN *et al.*, 2012).

Este teste apresenta quatro canais de detecção para medir os diferentes alvos, e nenhuma reatividade cruzada com genótipos de HPV de baixo risco, sendo bastante adequado para o que se propõe este estudo. Resumidamente, o DNA é extraído através de um processo totalmente automatizado de preparação da amostra utilizando o instrumento Cobas X480® e as amostras são, então, transferidas para um analisador Cobas Z480® para a amplificação de

DNA por PCR. Pares de iniciadores complementares são utilizados para amplificar a região L1 altamente conservada do genoma do HPV, e sondas oligonucleotídicas fluorescentes específicas para HPV 16, HPV 18, e os outros tipos HPV de alto risco (HPV AR) permitem a detecção em tempo real de doze genótipos de HPV de alto risco em resultado agrupado e detecção isolada de HPV 16 e HPV 18, em uma amostra. A detecção do gene da β -globina humana realizada na mesma amostra é útil para fornecer uma medida de adequação da amostra e da qualidade de extração e amplificação, como controle interno, e os controles positivos e negativos foram incluídos em cada operação (MATEOS LINDEMANN *et al.*, 2012).

Em sequência, a interpretação da etapa de amplificação e detecção é realizada usando o *software* fornecido com a plataforma Cobas 4800. Os resultados obtidos foram catalogados nos formulários, depois em planilhas e submetidos a análise estatística.

4.4 Estudos estatísticos

Os dados foram catalogados em planilhas do programa Excel[®] (Microsoft Office[®]), para posterior descrição estatística e análise utilizando o programa GraphPad Prism. Foram aplicados o teste exato de Fisher e o cálculo de risco relativo. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$ com intervalo de confiança (IC) de 95%.

4.5 Considerações Éticas

Este estudo faz parte das pesquisas que envolvem seres humanos e se destinou a investigar a prevalência de genótipos de HPV 16, 18 e outros doze tipos de HPV de alto risco, através de PCR em tempo real (Cobas 4800), em material de citologia em meio líquido coletado em mulheres na cidade de Fortaleza – Ceará – Brasil, com diagnóstico de atipias escamosas, sendo elas: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e de carcinoma escamoso de colo de útero, e em grupo com citologias sem atipias.

A pesquisa foi desenvolvida pelo Programa de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, seguindo os requisitos da Resolução 466/12 e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará em 07 de Julho de 2014, com o número 710.514.

Houve uso de fontes secundárias de dados. Foram coletadas informações do arquivo de fichas e prontuários. Foi solicitada a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido e elaborado um termo de fiel depositário, bem como uma solicitação de autorização e concordância para acesso a material e dados no local da pesquisa.

5 RESULTADOS

Realizou-se pesquisa de HPV de alto risco em material de citologia em meio líquido com atípias e sem (grupo controle). Não houve casos de PCR inválido por questões técnicas e nenhuma informação positiva sobre gestação nos casos envolvidos.

A amostra total incluída no estudo apresentou média etária de 33,02 anos, sendo a maioria com idade igual ou superior a 30 anos (72,7% da amostra). A média etária foi de 32,2 anos no grupo sem atípias, 31,1 anos para ASC-US e LSIL, 41,2 anos para ASC-H e HSIL e 43,1 anos para CEC. Mulheres com menos de 30 anos apresentaram frequência maior de positividade para os outros doze genótipos de alto risco, do que para o HPV 16 e para o HPV 18. Achado semelhante também foi observado no grupo com idade igual ou superior a 30 anos. HPV AR foi a sonda predominante em detecção tanto no grupo caso (72%) quanto no controle (68%). No geral, as médias de idade foram de 31,7 anos para mulheres com positividade para a sonda de outros doze genótipos de alto risco; 31,6 anos para HPV 16; e 26,7 anos para HPV 18, e 26,8 anos para mulheres com detecção em mais de uma sonda.

No grupo de citologias sem atípias, foram encontrados 40 casos positivos para HPV (26%) e 109 (74%) negativos (gráfico 2). Houve maior positividade para a sonda HPV AR (68%), seguido do HPV 18 (17%), e por último o HPV16 (15%), considerando a prevalência geral na amostragem sem atípias (Tabela 1).

Tabela 1: Prevalência dos genótipos de HPV de alto risco de acordo com o resultado citológico

LESÃO	HPV 16	HPV 18	HPV AR
ASC-US	23,2%	9,3%	67,5%
ASC-H	14,3%	28,6%	57,1%
L-SIL	8,62%	10,35%	81,1%
H-SIL	10%	10%	80%
CEC	62,5%	0	37,5%
SEM ATIPIA	15%	17%	68%

Predominaram detecções por uma única sonda, com 84%. Entre os casos que apresentaram detecção em mais de uma sonda, a combinação mais frequente foi HPV AR e 18 (68%) e houve um único caso positivo para os três canais (Tabela 2). A média de idade nesse grupo foi de 32,2 anos, sendo de 31 anos para HPV positivo e 29,8 anos para HPV negativo. Do total, 55% tinha idade maior ou igual a 30 anos.

A sonda HPV AR foi a de maior frequência, tanto nas detecções por única sonda (79%) (Gráfico 1) quanto nas combinadas (83%), estando em associação com o genótipo HPV 18 em 10% e com genótipos HPV 18 e 16, simultaneamente, em 3% das combinações (Tabela 2). Não houve detecção associada de HPV AR e HPV 16 no grupo sem atipias.

Gráfico 1: Detecção de HPV de alto risco por sonda isolada em citologias com e sem atipias

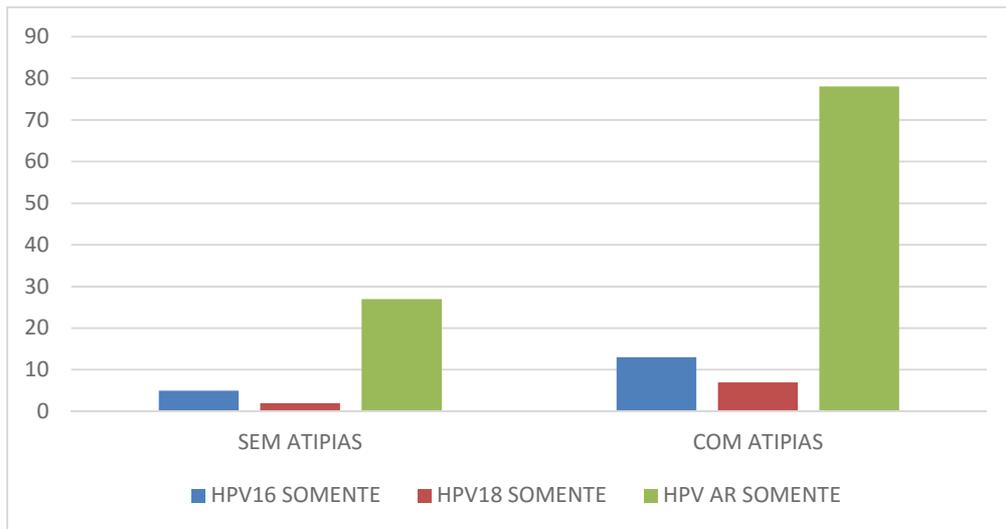


Tabela 2: Distribuição de infecções por tipo de HPV em citologias com atipias escamosas e sem atipias.

LESÃO	HPV 16 E 18	HPV 16 E 18	HPV 18	HPV 16, 18 E AR	HPV 16 somente	HPV 18 somente	HPV AR somente	TOTAL
ASC-US	1	3	2	0	6	1	24	37
ASC-H	0	1	0	0	0	2	3	6
L-SIL	0	4	3	0	1	3	40	51
H-SIL	0	0	0	0	1	1	8	10
CEC	0	0	0	0	5	0	3	8
SEM ATIPIA	1	0	4	1	5	2	27	40
TOTAL	2	8	9	1	18	9	105	152

Foram analisados 75 (45%) casos de ASC-US, 62 (38%) LSIL, 8 (5%) ASC-H, 12 (7%) HSIL e 8 (5%) carcinomas escamosos. Nesse grupo, de citologias com atipias escamosas, foram encontrados 112 casos positivos para HPV (68%) e 53 (32%) negativos

(Tabela 3). A maior frequência foi para a sonda HPV AR (72%), seguido do genótipo HPV 16 (18%), e por último o HPV18 (10%) (Tabela 3 e figura 1).

Tabela 3: Prevalência geral de HPV 16, HPV 18 e de outros 12 genótipos de alto risco em amostras de citologias com atipias escamosas

Genótipo de HPV detectado	Quantidade de vezes presente na amostra	%
HPV 16	22	18%
HPV 18	13	10%
HPV AR	91	72%
TOTAL	126	100

Quando avaliado, de forma estratificada, o grupo com atipias escamosas, a prevalência de DNA de HPV de alto risco foi de 49% em ASC-US, 75% em ASC-H, 82% em LSIL, 83% em HSIL e de 100% nos casos de carcinoma escamoso (Gráfico 2). Associação significativa entre HPV positivo e presença de citologia alterada com atipia escamosa também foi identificada ($p < 0,0001$) (Tabela 4).

HPV AR foi a sonda de maior prevalência de detecção nos casos de ASC-US, ASC-H, LSIL e HSIL. Nos casos de CEC, a maior prevalência de detecção foi de HPV 16 (Tabela 1).

Gráfico 2: Identificação de HPV de alto risco por tipo de alteração em citologias com e sem atipias

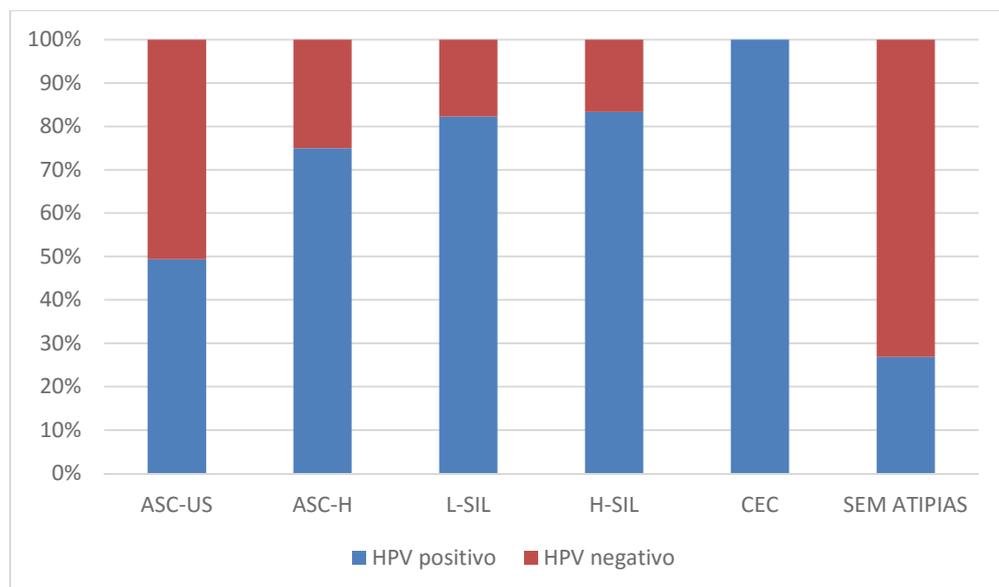


Tabela 4: Presença de HPV 16, 18 ou AR (outros doze genótipos de alto risco) em citologia com atipias escamosas

	N(quantidade)	HPV positivo	HPV negativo	RR	<i>p</i>
TOTAL SEM ATIPIAS	149	40	109		
TOTAL ATIPIAS	165	112	53	2,5285	<0,0001
ASC-US	75	37	38	1,8377	0,0007
ASC-H	8	6	2	2,7938	<0,0001
L-SIL	62	51	11	3,0641	<0,0001
H-SIL	12	10	2	3,1042	<0,0001
CEC	8	8	0	3,7250	<0,0001

Em amostras com atipias, predominaram detecções por uma única sonda, com 88%, sendo 12% das infecções por HPV 16 somente, e 6% por HPV 18 somente (Gráfico 1). Em 12% havia positividade para mais de uma sonda, porém nenhum positivo para os três canais simultaneamente (Tabela 2 e figura 1). A combinação mais presente foi HPV AR e HPV 16 com 57% do total de combinações de sondas e 7% do total de amostras de citologia com atipias positivas para HPV de alto risco. Não houve detecções de sondas combinadas nos casos com H-SIL e carcinoma (Gráfico 3).

Figura 1: Diagrama esquemático das quantidades de amostras com atipias citológicas, positivas para HPV de alto risco, de acordo com a sonda/ genótipo detectada(o).

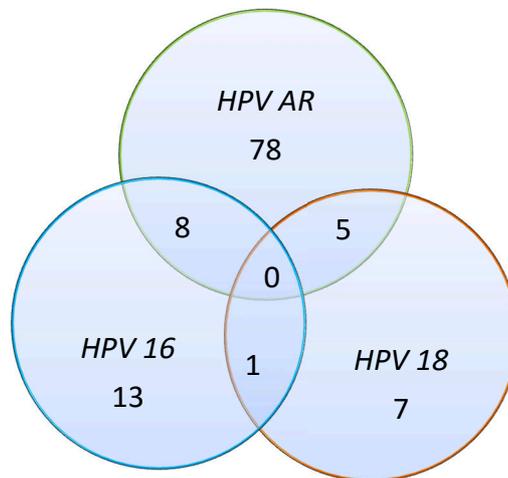
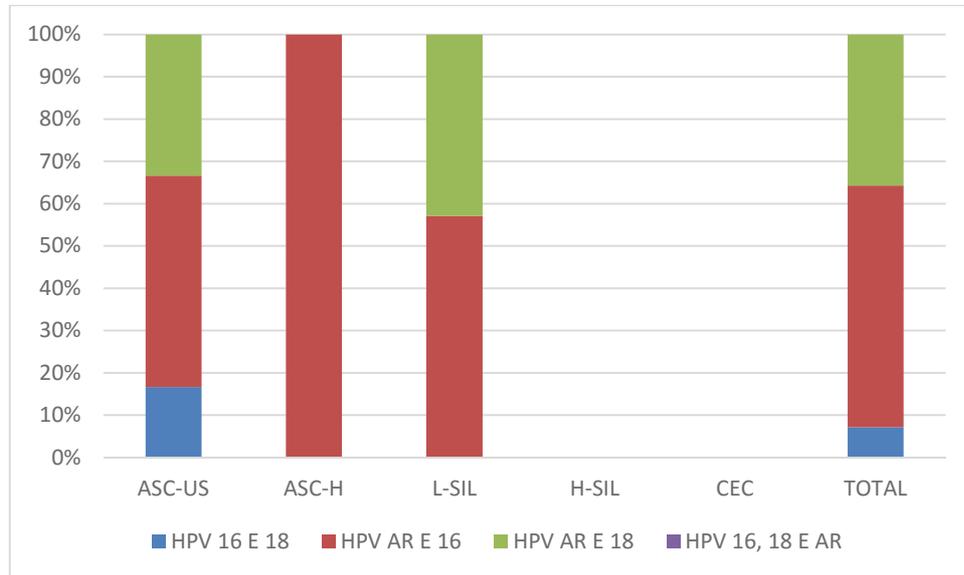


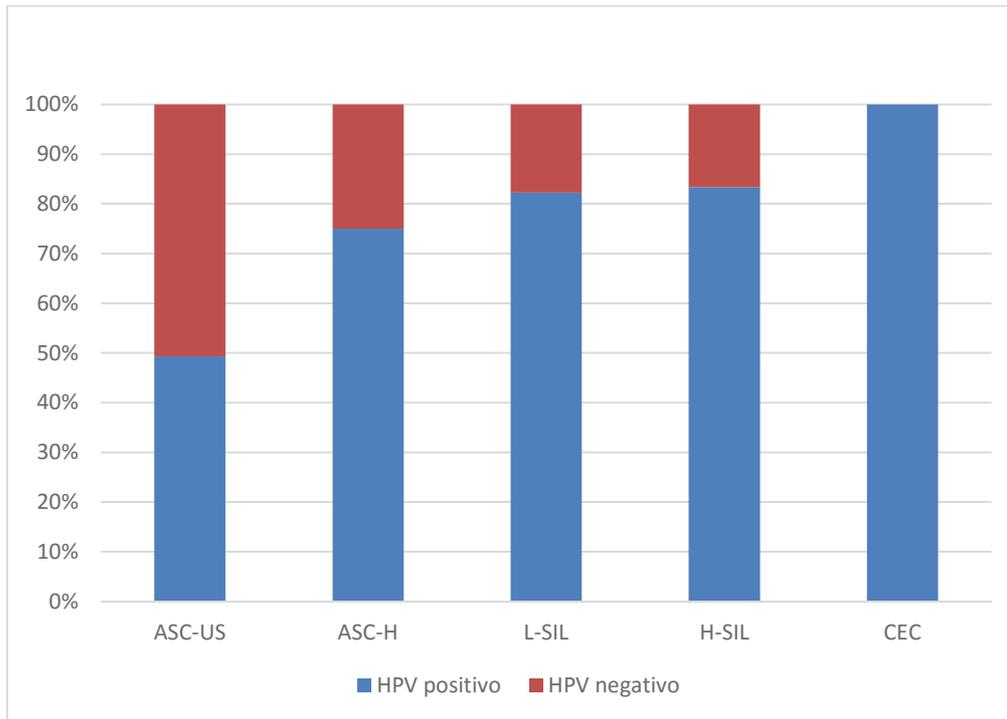
Gráfico 3: Detecções combinadas, com positividade para mais de um canal, em amostras de citologias com atípias, em distribuição por tipo de atipia.



Considerando, isoladamente, as detecções por uma única sonda, e as combinações de detecções em mais de uma sonda, observou-se, também, maior frequência de detecção pela sonda HPV AR, tanto isoladamente (70%) quanto em associação ao genótipo HPV 16 (7%) e ao genótipo 18 (4%) (Gráfico 3).

Somente nos casos de ASC-US, a frequência de HPV positivo foi semelhante à de negativo (1:1). Nas demais, a quantidade de casos de HPV positivo ultrapassou a de negativos. Todos os casos de carcinoma apresentaram HPV de alto risco oncogênico (Gráfico 4). A média de idade nesse grupo foi de 31,1 anos para ASC-US e LSIL, 41,2 anos para ASC-H e HSIL e 43,1 anos para carcinoma escamoso.

Gráfico 4: Presença de HPV de alto risco, de acordo com o tipo de atipia escamosa



A sonda HPV 18 esteve mais significativamente associada a lesões ASC-H e H-SIL, quando em comparação com lesões ASC-US, L-SIL e citologias sem atipias ($p = 0,0032$). Bem como a sonda HPV AR, que esteve mais significativamente associada a lesões ASC-H e H-SIL, quando em comparação com lesões ASC-US, L-SIL e citologias sem atipias, tanto de forma isolada, como única sonda detectada ($p = 0,0129$) quanto em associação com outra sonda ($p = 0,0192$) (Tabela 5).

Tabela 5: ASC-H + HSIL X ASC-US + LSIL + citologias sem atipias: análise estatística comparativa quanto à detecção de HPV de alto risco.

Detecção de HPV (por sonda)	ASC-H + HSIL		Ø atipias + ASC-US + LSIL		RR	p (*p < 0,05 significante)	IC (95%)
	HPV+	Outros HPV e HPV neg	HPV+	Outros HPV e HPV neg			
Somente HPV 16	1	19	12	274	1,1917	0,8628	0,1631 a 8,7092
Somente HPV 18	3	17	6	280	7,1500	0,0032	1,9298 a 26,4909
Somente HPV AR	11	9	91	195	1,7286	0,0129	1,1231 a 2,6605
HPV 16 e AR	1	19	7	279	2,0429	0,4937	0,2641 a 15,8006
HPV 16 e 18	0	20	2	284	2,7333	0,5118	0,1356 a 55,1160
HPV 18 e AR	0	20	9	277	0,7193	0,8182	0,0433 a 11,9372
HPV 16	2	18	22	264	1,3000	0,7084	0,3288 a 5,1403
HPV 18	3	17	18	268	2,3833	0,1337	0,7660 a 7,4157
HPV AR	12	8	108	178	1,5889	0,0192	1,0784 a 2,3410

Foi observada significância estatística entre a presença de atipia escamosa e positividade para a sonda que detecta os outros 12 genótipos de alto risco, associados aos HPV 16 e 18 ($p < 0,0001$) ou não ($p < 0,0001$). Também foi observada associação significativa entre HPV 16 e presença de atipia escamosa, de um modo geral ($p = 0,0011$) (Tabela 6).

Tabela 6: Presença de HPV de alto risco associada a achados atípicos escamosos em citologia em meio líquido

Todas as atipias escamosas (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e CEC)	Grupo exposto com atipias		Grupo controle sem atipias		RR	<i>p</i> (* <i>p</i> < 0,05 significante)	IC (95%)
	HPV +	Outros HPV e HPV neg	HPV +	Outros HPV e HPV neg			
Somente HPV 16	13	152	5	144	2,3479	0,0968	0,8574 a 6,4293
Somente HPV18	7	158	2	147	3,1606	0,1471	0,6669 a 14,9778
Somente HPV AR	78	87	27	122	2,6088	<0,0001	1,7886 a 3,8050
HPV 16 e AR	8	157	1	148	7,2242	0,0608	0,9143 a 57,0827
HPV 16 e 18	1	164	1	148	0,9030	0,9423	0,0570 a 14,3105
HPV 18 e AR	5	160	4	145	1,1288	0,8546	0,3089 a 4,1254
HPV 16	29	136	7	142	3,7411	0,0011	1,6892 a 8,2854
HPV 18	14	151	8	141	1,5803	0,2856	0,6823 a 3,6604
HPV AR	93	72	32	117	2,6244	< 0,0001	1,8772 a 3,6692

HPV 16 esteve mais significativamente associado a lesões tipo ASC-US ($p = 0,0271$) e CEC ($p < 0,0001$) (Figura 2). Nos casos de CEC, a presença de HPV16 como único genótipo detectado, também teve associação estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 2). HPV 18 esteve mais significativamente associado a lesões ASC-H de forma isolada ($p = 0,0017$) ou acompanhado de outro(s) dos treze genótipos ($p = 0,0285$). A detecção pela sonda HPV AR esteve mais significativamente associada a lesões ASC-US ($p = 0,0059$), LSIL ($p < 0,0001$) e HSIL ($p < 0,0001$) (Tabela 6). A combinação de HPV 16 e algum(ns) dos outros doze genótipos de alto risco foi estatisticamente significativa em lesões ASC-H ($p = 0,0324$) e LSIL ($p = 0,0411$) (Figura 2). Não houve significância estatística na associação de co-infecção por HPV 16 e HPV 18 com HSIL e LSIL.

Figura 2: Quadro 1: Significância das associações de genótipos de HPV com atipias citológicas

	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	CEC
Somente HPV 16	0,1400	0,7724	0,4995	0,3879	< 0,0001
Somente HPV18	0,9956	0,0017	0,1544	0,1241	0,4255
Somente HPV AR	0,0189	0,1366	< 0,0001	< 0,0001	0,1366
HPV 16	0,0271	0,3305	0,3395	0,5765	< 0,0001
HPV 18	0,9910	0,0285	0,2559	0,6657	0,9888
HPV AR	0,0059	0,2481	<0,0001	<0,0001	0,2481
HPV 16 e AR	0,1193	0,0324	0,0411	0,4019	0,2828
HPV 16 e 18	0,6257	0,2828	0,8870	0,4019	0,2828
HPV 18 e AR	0,9938	0,6710	0,4313	0,8651	0,6710

* $p < 0,05$ significante

6 DISCUSSÃO

Foram estudados um total de 314 citologias, sendo 165 amostras alteradas e 149 amostras sem atipias, todas submetidas a pesquisa de HPV de alto risco oncogênico por PCR em tempo real através do sistema Cobas 4800[®]. A análise dos resultados mostrou que predominaram detecções por uma única sonda, tanto no grupo com atipias escamosas, quanto no grupo sem atipias.

A amostra incluída no estudo apresentou média de idade de 33 anos, sendo a maioria com idade igual ou superior a 30 anos (72,7% da amostra). Mulheres com menos de 30 anos apresentaram frequência maior de positividade para os outros doze genótipos de alto risco, do que para o HPV 16 e para o HPV 18. Achado semelhante também foi observado no grupo com idade igual ou superior a 30 anos. HPV AR foi a sonda predominante em detecção tanto no grupo caso (72%) quanto no controle (68%). No geral, as médias de idade foram de 31,7 anos para mulheres com positividade para a sonda de outros doze genótipos de alto risco; 31,6 anos para HPV 16; e 26,7 anos para HPV 18. A média etária foi de 32,2 anos no grupo sem atipias, 31,1 anos para ASC-US e LSIL, 41,2 anos para ASC-H e HSIL e 43,1 anos para CEC.

Em um estudo recente, no Nordeste do Brasil, por Bruno *et al* (2014), houve significativa associação entre presença de lesão cito-histopatológica de baixo ou alto grau e os HPVs de alto risco 16, 52, 73, 82, e o de baixo risco HPV 43. Nele, mulheres com idade menor do que 30 anos apresentaram maior frequência do HPV 16, do HPV 42 e do HPV 45, além de maior frequência de infecção múltipla (58,1% *versus* 47,4%). A média de idade das mulheres com detecção em mais de uma sonda foi de 26,8 anos, no presente estudo, semelhante ao que foi observado por Bruno *et al*, com mulheres de idades mais jovens, abaixo de 30 anos, apresentando maior frequência de infecções por múltiplos genótipos de HPV.

A combinação de HPV 16 e algum(ns) dos outros doze genótipos de alto risco foi estatisticamente significativa em lesões ASC-H ($p = 0,0324$) e LSIL ($p = 0,0411$), no presente estudo. Paengchit, Kietpeerakool e Lalitwongsa (2014), em pesquisa que envolveu 2000 mulheres, em Lampang, na Tailândia, com resultados citológicos com atipias ou normal, usando citologia em meio líquido e genotipagem por PCR, observaram uma frequência de 16,67% de infecções múltiplas. Wang *et al* (2014), em pesquisa com 578 mulheres na China, observaram 30,4% desta quantidade de infecções simples e 14% de infecções múltiplas.

Ainda na China, um estudo observou aumento de risco de anormalidades citológicas nos casos de infecção por múltiplos genótipos (JING *et al.*, 2014).

Kim *et al.*(2013), encontraram associação significativa entre co-infecção por múltiplos tipos de papilomavírus e severidade do achado citológico ($p= 0,029$). No estudo de Guettiti *et al.*(2014), na Tunísia, de um total 611 mulheres, 6,5% tinha HPV e dessas amostras positivas, 65% eram infecções simples e 35% eram múltiplas, e 75% das amostras positivas continham genótipo de alto risco.

No presente estudo, foi observada significância estatística entre a presença de atipia escamosa e positividade para a sonda que detecta os outros 12 genótipos de alto risco, associados aos HPV 16 e 18 ($p < 0,0001$) ou de forma isolada ($p < 0,0001$). Mesmo com esse resultado estatístico, mantém-se uma dúvida, pois a quantidade de genótipos identificados por HPV AR é desconhecida. Não se pode afirmar se são realmente infecções por mais de um genótipo, quando há somente identificação por HPV AR.

No grupo de citologias sem atipias, foram encontrados 40 casos positivos para HPV de alto risco (26%) e 109 (74%) negativos. Foi observada maior frequência de positividade para a sonda HPV AR (68%), seguido do HPV 18 (17%), e por último o HPV16 (15%), numa abordagem geral. Wright *et al.* (2011), utilizaram também o sistema Cobas, para pesquisar HPV de alto risco em mulheres com idade igual ou superior a 30 anos e com achados citológicos normais, e encontraram uma prevalência de 6,7%, sendo 1% para HPV 16, 0,5% para HPV 18 e 5,2% para os outros doze genótipos.

Ayres *et al.* (2010), em revisão sistemática sobre prevalência de infecção de colo uterino por HPV no Brasil, detectaram prevalência que variou entre 10,4 e 24,5% em mulheres com citologia normal. No Qatar, em um estudo com 3008 mulheres, nas citologias normais, HPV 16 foi o genótipo de alto risco mais frequentemente identificado (4,6%), e HPV 81 foi o de baixo risco mais identificado (74%) (BANSAL *et al.*, 2014).

HPV de alto risco oncogênico esteve presente em 10,1% do grupo controle (citologia normal) no estudo de Natphopsuk *et al.* (2013), na Tailândia, e em 27%, na Dinamarca, detectados por rastreio cervical com PCR em tempo real Cobas (PREISLER *et al.*, 2013). Mateos Lindemann *et al.*, num estudo publicado em 2011, avaliaram, por meio de análise por PCR, a prevalência de HPV de alto risco num total de 1001 mulheres, em Madrid, Espanha: 298 com citologia normal, 498 com LSIL e 205 com HSIL. O genótipo mais

encontrado foi o HPV 16, estando presente em 17,8% das pacientes com citologia normal. Em pesquisa que envolveu 2000 mulheres, na Tailândia, todas sem história prévia de citologia anormal ou câncer, usando citologia em meio líquido e teste de HPV baseado em hibridização, mais genotipagem por PCR observou-se 5,4% de infecção por HPV de alto risco, sendo os mais prevalentes: HPV 52 (17,6%), HPV 16 (14,8%), HPV 58 (13,89%), HPV 33 (11,11%), HPV 51 (11,11%), HPV 56 (9,26%) (PAENGCHIT; KIETPEERAKOOL; LALITWONGSA, 2014).

Com base em metanálise publicada por Bruni *et al.*(2010), apesar da alta prevalência e variabilidade de HPV em mulheres com achados citológicos sem alteração em todas as regiões do mundo, têm destaque os HPVs 16, 18, 31, 52 e 58, entre os 10 mais comumente encontrados nessa referida população, na era pré-vacinação. Dinc *et al.* (2010), num estudo que avaliou a prevalência de HPV por PCR em tempo real, em pacientes com colposcopia normal e alterada encontrou 18 % de positividade para HPV 16 no grupo com colposcopia alterada e 3,8% no grupo com colposcopia normal.

Segundo Pitta *et al.* (2009), a prevalência global de tipos altamente oncogênicos do HPV na população feminina urbana (com média de idade 33 anos) sem NIC de alto grau tem sido estimada em 6,2%. De acordo com Bruni *et al.*, em metanálise de 2010, realizada com estudos publicados entre 1995 e 2009 que usaram PCR ou Captura híbrida de 2ª geração para detecção de HPV em mulheres com citologia normal, incluiu 194 estudos, compreendendo 1.016.719 mulheres, a prevalência global estimada de infecção por HPV foi 11,7%. As maiores prevalências foram encontradas na África Sub-Sahara (24,0%), Europa oriental (21,4%) e América Latina (16,1%).

No grupo das citologias sem atipias, do presente estudo, houve predomínio de detecções por uma única sonda, com 84%, sendo 16% da amostra reativas para mais de uma sonda. Dentre estas últimas, a combinação mais frequente foi HPV AR e 18 (68%) e houve um caso único positivo para os três canais. Hamzi Abdul Raub *et al.* (2014) conseguiram demonstrar presença de até cinco genótipos de HPV de alto risco, através de genotipagem por PCR, mas em amostras de câncer cervical (carcinoma escamoso e adenocarcinoma) na Malásia. No presente estudo não se pôde identificar infecção por mais de dois genótipos. Os genótipos de 67% das citologias sem atipias escamosas e 70% das amostras com atipias permaneceram indetectados, embora essas amostras tenham sido positivas para HPV AR, indicando infecção por outro ou outros tipos de HPV, que não HPV 16 nem HPV 18.

No grupo de citologias com atipias escamosas, foram encontrados 112 casos positivos para HPV (68%) e 53 (32%) negativos. Kondo *et al.* (2012), em um estudo em que foram examinadas a prevalência e a distribuição de genótipos de HPV entre 326 mulheres japonesas com citologias alteradas, usando PCR, encontraram resultado com maior percentual: 94% das amostras positivas para HPV, sendo 86,2% de alto risco; e 30% destas continham múltiplos genótipos, ao passo que no presente estudo predominaram detecções por uma única sonda, com 88% dos casos com atipias, sendo 12% das infecções por HPV 16 somente e 6% por HPV 18 somente.

Siddiqa *et al.* (2014), pesquisando HPV por PCR em 77 amostras de material de biópsias com diagnóstico de câncer e citologia com achados atípicos, no Paquistão, encontraram prevalência de 94,81% de infecção por HPV, sendo 24,68% de infecções por HPV 16 somente, 25,97% por HPV 18 somente e 40,26% de co-infecção por ambos os tipos-16 e 18- percentuais mais altos do que os observados nesta pesquisa. E Meloni *et al.* (2014), em pesquisa, na Itália, com 650 mulheres com citologia cervical alterada, identificaram HPV em 52,6% das pacientes, e destas, 68,9% apresentaram genótipo de alto risco, e houve infecção por mais de um genótipo em 36,1% das infecções.

Quando avaliou-se, estratificadamente, o grupo com atipias escamosas, observou-se aumento proporcional da presença de HPV de alto risco de acordo com o grau de acometimento citológico. A prevalência de DNA de HPV de alto risco foi de 49% em ASC-US, 75% em ASC-H, 82% em LSIL, 83% em HSIL e, embora o “N” tenha sido pequeno, todos os casos de carcinoma apresentaram HPV de alto risco oncogênico e foi demonstrada significativa associação com presença de HPV16 como único genótipo detectado ($p < 0,0001$). Tachezy *et al.* (2011), demonstrou, através de PCR que HPV 16 foi o tipo mais prevalente tanto em casos de lesão pré-neoplásicas (45%), quanto nos carcinomas de células escamosas (59%). Stoler *et al.* (2013), encontrou prevalência de 42% para HPV de alto risco em ASC-US, percentual semelhante ao deste estudo.

Já no estudo descrito por Kondo *et al.* (2012), a prevalência encontrada foi de 83% em ASC-US, 91% em ASC-H, 97% em LSIL, 99% em HSIL e os três tipos de HPV mais frequentes em HSIL foram HPV 16 (36%), HPV52 (24%) e HPV 58 (14%). Kondo *et al.*, realizaram um estudo com metodologia semelhante, com pesquisa de HPV por PCR em citologia em meio líquido (Thinprep[®]), em uma população com citologias de resultado anormal. Provavelmente as altas taxas de positividade para HPV de alto risco, principalmente

em lesões ASC-US, deve-se às características da população por eles avaliada, a qual se presume ser relativamente mais HPV positiva do que a população normal.

Não houve associação de sondas nos casos com H-SIL e carcinoma. Somente uma única sonda foi detectada nesses casos. Em HSIL houve predomínio da sonda HPV AR, e nos carcinomas predominou HPV 16, mostrando-se persistente com o aumento da gravidade da lesão. Nos casos de HSIL em amostras deste estudo observou-se HPV 16 em 10%, HPV 18 em 10%, e AR (outros doze genótipos de alto risco) em 80%. Em uma metanálise que comparou a distribuição de tipos de HPV em HSIL e carcinoma escamoso cervical, HPV 16, 18 e 45 foram os mais prevalentes, o que sugeriu que HSIL infectadas por tais tipos oncogênicos preferencialmente progridem para carcinoma escamoso (CLIFFORD *et al.*, 2003). Siddiqa *et al.* (2014) detectaram co-infecção por HPV 16 e HPV 18 em 75% dos casos de LSIL e 54,5% dos HSIL, enquanto no presente estudo não houve infecção simultânea por HPV 16 e HPV 18 em casos de LSIL e HSIL.

O presente estudo, em geral, nos casos com atipias apresentou com mais frequência positividade para a sonda de 12 genótipos de alto risco (HPV AR) que não 16 e 18 (72%), seguido do genótipo HPV 16 (18%), e por último o HPV18 (10%). Enquanto na maioria das atipias, nos casos de ASC-US, ASC-H, LSIL e HSIL, observou-se maior percentual de detecção pela sonda HPV AR, apenas nas amostras com carcinoma houve diferença, com maior percentual de detecção de HPV 16. Em pesquisa recente realizada na Itália, em mulheres com citologia alterada, nos casos de ASCUS o genótipo HPV 53 foi o mais comum (21,4%), em LSIL o mais comum foi HPV 52 (22,5%) e em HSIL, foi o HPV 16 (27,3%) (MELONI *et al.*, 2014).

No estudo de Siddiqa *et al.* (2014), 3,9% das amostras HPV positivas permaneceram sem genotipagem, pois no referido estudo utilizaram-se *primers* específicos para HPV 16 e para HPV 18 isoladamente e *primers* (GP5+/GP6+) para detectar outros 44 tipos de HPV porém não permitindo especificá-los (genotipagem). Semelhança metodológica pode ser notada com este presente estudo, em que a sonda HPV AR permite detecção de 12 genótipos, contudo não sendo possível especificar o(s) genótipo(s) encontrado(s).

Mendonça *et al.* (2010), num estudo caso-controle com 248 mulheres, em Recife, no Nordeste do Brasil, identificou HPV de alto risco oncogênico em 67,1% das mulheres com citologia normal ou alterações benignas, e em 83,4% das portadoras de lesão intraepitelial de alto grau e carcinoma cervical. Em tal estudo, predominaram HPV 16 e 31 em ambos os

grupos e foi encontrado HPV 16 em 72,2% dos casos com citologia alterada por HSIL ou carcinoma de células escamosas (grupo com 72 mulheres) e nenhum com HPV 18. O segundo vírus de alto risco mais frequente relatado por Mendonça *et al.*, no estudo publicado em 2010, foi o HPV 31 (23,6%) e o terceiro, o HPV 33 (13,9%). No grupo com citologia alterada, encontrou-se 38,9% de infecção múltipla, 48,6% de infecção única e 12,5 de indeterminada, e também foram identificados HPVs de baixo risco (HPV6: 18,1% e HPV 11: 16,7%).

Em um estudo multicêntrico realizado em nove países, com 1918 mulheres com câncer cervical e 1928 mulheres no grupo controle, 1739 (90,7%) foram positivas para DNA HPV no grupo com câncer. Destas, 91,9% apresentaram infecção simples e 8,1% infecção múltipla. No grupo controle, sem câncer, 259 (13,4%) foram positivas para HPV; destas, 86,1% foram infecções simples e 13,9% foram infecções múltiplas (MUÑOZ *et al.*, 2003).

A combinação de genótipos mais presente neste estudo, no grupo com atipias foi HPV AR e 16 com 57% das combinações. Somente nos casos de ASC-US a frequência de HPV positivo foi semelhante à de HPV negativo (1:1). Nas demais, o número de casos HPV positivo ultrapassou a de negativos. Num estudo que utilizou Captura híbrida 2ª geração, com 109 casos estudados, foram encontrados 57,8% positivos para HPV alto risco: 29,8% dos casos com tecido cervical normal, 80,8% dos casos de LSIL e 96,1% dos casos com HSIL (ELEUTÉRIO JR *et al.*, 2007), números que se assemelham aos deste estudo, em que HPV de alto risco esteve presente em 26% das citologias sem alteração, 82% das com LSIL e em 83% das amostras com HSIL.

Bruno *et al.* (2014), descreveram um estudo retrospectivo de corte transversal, realizado entre 2010 e 2013, em Salvador, Bahia, Brasil, em que foram revisados 351 prontuários de mulheres com genotipagem positiva para HPV pelo teste PapilloCheck®, capaz de detectar 24 tipos de papilomavírus humano, baseado na detecção de um fragmento E1 do HPV utilizando a tecnologia de DNA-Arrays. Foram analisados tanto casos com achados citohistopatológicos negativos, quanto com lesão intra-epitelial de baixo grau e de alto grau, cervical e vaginal. O genótipo de alto risco mais encontrado foi o HPV 16, com 18,5%, seguido pelo HPV 56(14%) e HPV 39 (13,4%).

Fazendo um comparativo entre resultados regionais: em concordância com revisão sistemática de Ayres e Silva (2010) sobre a prevalência de infecção cervical no Brasil por HPV, em que o genótipo HPV 16 foi o mais frequente entre as mulheres, na Bahia, os genótipos de alto risco mais prevalentes foram HPV 16, HPV 56 e HPV 39 (BRUNO *et al.*,

2014), e em Recife-Pernambuco, foram HPV 16, HPV 31 e HPV 33 (MENDONÇA *et al.*, 2010). No presente estudo, houve maior índice de detecção pela sonda HPV AR, a qual engloba os genótipos HPV 56, HPV39, HPV31 e HPV33, identificados como os mais prevalentes de alto risco, também na região Nordeste, depois do HPV 16, pelos estudos acima citados.

É crescente o número de pesquisas sobre imunização contra HPV. Trata-se de uma questão de substancial importância, tendo em vista a relevância epidemiológica da morbimortalidade de lesões associadas ao HPV na saúde pública. Em um recente estudo, no qual foi estimado o potencial impacto de uma vacina nonavalente em doença cervical associada a HPV em quatro países emergentes (Brasil, México, Índia e China), concluiu-se que a adição dos genótipos de HPV 31,33,45,52 e 58, às vacinas atuais, além dos HPVs 6, 11, 16, 18, poderia aumentar a fração evitável de câncer invasor cervical na faixa de 12 a 19% nesses quatro países, representando os nove tipos juntos 90% dos cânceres. Esta medida poderia reduzir substancialmente os índices mundiais de câncer cervical (SERRANO *et al.*, 2014). Este mesmo estudo encontrou que HPV 45 foi o mais frequentemente detectado depois do HPV 16 e do HPV 18 no Brasil (6,9%) e no México (6,4%), seguido de 31 e 33 nos casos de câncer cervical invasivo.

Wang *et al.* (2014), analisando 578 amostras cervicais coletadas de mulheres na China, através de genotipagem por PCR que identificava cinco subtipos de HPV de baixo risco e dezesseis subtipos de alto risco, encontraram 44,5% de HPV positivo sendo 35,1% destes, de genótipos de alto risco, e os mais prevalentes: HPV 16 (9,2%), HPV 52 (7,8%), HPV 6 (6,9%) HPV 11 (5,9%), HPV 42 (5,0%). Também, na China, JING *et al.*, 2014, detectaram mais frequentemente: HPV 16 (20,2 %), HPV 52 (17,1%), HPV 58 (13,2%), HPV 18 (9,5%) e HPV 6 (7,6%), em citologias normais e alteradas.

Em estudo transversal (2001 a 2006) realizado na Itália, sobre distribuição tipo-específica de HPV em casos de câncer cervical invasivo, por PCR, encontrou-se prevalência de HPV de 90,3%, sendo 91,7% dessas infecções por único genótipo e 5% por mais de um. Os genótipos mais identificados nas amostras foram: HPV 16 (58,7%), HPV 18(9,9%), HPV 31, HPV 45 e HPV 58 (4,1% cada um) (MARIANI *et al.*, 2010).

Em estudo na Arábia Saudita, com 31,6% de HPV positivo, por PCR em amostras de citologia cervical de 519 pacientes, houve associação significativa entre positividade para

HPV e citologia anormal ($p < 0,00001$), e, independente de infecções isoladas ou combinadas, HPV 16 foi encontrado em 87,8%, HPV 18 em 86% e HPV 11 em 78,3% (AL-AHDAL *et al.*, 2014). No presente estudo, associação significativa entre HPV positivo e presença de citologia alterada com atipia escamosa também foi identificada ($p < 0,0001$). Guettiti *et al.* (2014), avaliando mulheres em atendimento ginecológico para rastreamento de câncer de rotina, com citologia e teste de HPV, na Tunísia, identificaram como genótipos mais frequentes: HPV 16 (3,27%), HPV 11(1,96%), HPV 58 (0,82%), HPV 18 (0,33%), HPV 31 (0,33%) e HPV 33(0,33%).

De acordo com Hamzi Abdul Raub *et al.* (2014), em estudo na Malásia, HPV foi detectado em 92,5% dos casos. Os cinco genótipos de HPV de alto risco mais prevalentes foram: HPV 16 (68,2%), HPV 18 (40%); HPV 58 (10,7%), HPV 33 (10,4%), HPV 52 (10,4%). E na Coreia, Kim *et al.* (2013), identificaram como os mais prevalentes: HPV 58 (23,9%), HPV 16 (21,8%), HPV 52 (16,6%), HPV 18 (11,7%) e HPV 33 e HPV 35 (9,0% ambos), dentre os genótipos de alto risco, num estudo transversal retrospectivo com 7014 mulheres submetidas a rastreamento de câncer cervical com citologia em meio líquido e teste de HPV.

Por sua vez, Bansal *et al.* (2014), em 3008 amostras cervicais colhidas de mulheres de origem árabe, residentes no Qatar, usando PCR em tempo real e sequenciamento para genotipagem, obtiveram como genótipos mais frequentes: HPV 81 (71,9%), HPV 11(7,14%) e HPV 16(5,49%), e nas citologias alteradas, HPV 16, HPV 18 e HPV 56 foram os genótipos de alto risco mais identificados (22,2% cada).

Algumas limitações existiram neste estudo. Embora de início, a quantidade restrita de casos estudados, em si, pareça ser um fator limitante, a pesquisa foi realizada em uma população representada por mulheres usuárias do serviço privado de saúde, podendo-se esperar prevalência de infecção pelo HPV menor, em relação à população em geral, visto que essas mulheres, teoricamente, teriam melhor nível sócio-econômico-cultural e melhor e mais fácil acesso a conhecimento e a cuidados de saúde e prevenção. Em contrapartida, demonstra uma realidade do dia a dia do médico ginecologista, por ser em situação real e não, ideal.

As detecções por duas ou três sondas foram menos frequentes, porém, foram identificadas em 12% dos casos nas citologias alteradas e 16% também nas citologias sem atipias. Isto nos leva a crer que a presença de múltiplos tipos virais pode não estar associada

com a atipia citológica. E não se pode afirmar isso, visto que a sonda HPV AR traduz positividade para outros doze tipos de genótipos. Somente com o teste utilizado, não foi possível distinguir se em uma amostra analisada reativa para sonda HPV AR havia um genótipo ou mais de um, dos doze por ela detectados. Não ficou claro se a presença de múltiplos genótipos de HPV pode servir como preditor de doença cervical.

O fato de o resultado ser agrupado para os outros doze genótipos deixa a dúvida sobre a real prevalência dos tipos virais. Supostamente, o HPV 16 seja o mais frequente, em concordância com dados mundiais já estabelecidos. No entanto, o somatório das frequências dos doze tipos de HPV de alto risco detectados pelo canal HPV AR do sistema Cobas ultrapassou a frequência de HPV 16 e de HPV 18, nesse estudo. Seriam necessários novos testes de biologia molecular que permitissem genotipagem isolada de cada tipo viral para assim ter dados mais precisos. Além disso, não houve confirmação de exame histopatológico para fazer correlação com os dados encontrados.

Os dados obtidos estão em concordância com a literatura quanto à existência de uma heterogeneidade da distribuição dos diversos genótipos e sua associação mais frequente conforme o nível de atipia (ARBYN *et al.*, 2004; BRUNI *et al.*, 2010; JING *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013; PITTA *et al.*, 2009; SERRANO *et al.*, 2014). A proposta da pesquisa de avaliar a prevalência dos principais genótipos de HPV de alto risco em material de citologia em meio líquido através de PCR e tempo real Cobas *System*, disponível comercialmente na prática clínica, foi alcançada. Entretanto, deve-se ponderar as comparações com outros estudos descritos na literatura, que utilizam métodos de biologia molecular para detecção de HPV, e que tem sensibilidade e especificidade diferentes.

Sendo o HPV reconhecido como agente causal de câncer cervical, a detecção de HPV tipo específica pode ser útil para o rastreamento e prevenção de câncer cervical, principalmente, no momento em que o governo brasileiro incorpora a vacina contra HPV 6, 11, 16 e 18 no calendário vacinal. A identificação de genótipos associados a atipias entre mulheres brasileiras, em especial cearenses, permite aumentar conhecimento sobre epidemiologia do HPV, regionalmente, e elaborar estratégias para uma nova abordagem sobre vacinação e manejo das pacientes. Dados mais completos deverão resultar de estudos de base populacional com maior número de casos.

7 CONCLUSÕES

- Em material de citologia em meio líquido com atipias escamosas, proveniente de coleta cervical de mulheres em Fortaleza - Ceará, as prevalências de HPV 16, HPV 18 e de outros doze genótipos de alto risco detectados pela sonda HPV AR foram, respectivamente, 18%, 10% e 72%.
- As prevalências de HPV 16 em ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL e carcinoma foram 23,2%, 14,3%, 8,6%, 10% e 62,5%, respectivamente. As de HPV 18 foram 9,3%, 28,6%, 10,3%, 10% e 0%, respectivamente. E para detecção agrupada de outros doze genótipos de alto risco as prevalências foram, respectivamente: 67,5%, 57,1%, 81,1%, 80% e 37,5%.
- Em material de citologia em meio líquido sem atipias, as prevalências de HPV 16, HPV 18 e de outros doze genótipos de alto risco detectados pela sonda HPV AR foram, respectivamente, 15%, 17% e 68%.
- De uma forma geral, houve uma positividade significativamente maior da PCR para HPV de alto risco entre os casos com alteração citológica.
- Foi observada significância estatística entre a presença de atipia escamosa e positividade para HPV 16, bem como para a sonda HPV AR. A combinação dessas duas sondas esteve mais significativamente associada a ASC-H e a LSIL. HPV 18 isoladamente, e HPV AR isolada e em associação com outra sonda, estiveram mais significativamente associados a lesões ASC-H e HSIL, quando em comparação com lesões ASC-US, LSIL e citologias sem atipias.
- As prevalências aqui observadas tiveram pouca diferença em relação a dados da literatura mundial.

REFERÊNCIAS

- AGREDA, P. M. *et al.* Long-term stability of human genomic and human papillomavirus DNA stored in BD SurePath and Hologic PreservCyt liquid-based cytology media. **J. Clin. Microbiol.**, Maryland, v.51, n.8, p.2702- 2706, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719621/> >. Acesso em: 29 jul. 2013.
- AL-AHDAL, M.N. *et al.* Human papillomaviruses in cervical specimens of women residing in Riyadh, Saudi Arabia: a hospital-based study. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 8, n.3, p.320-325, 2014. Disponível em: <<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/24619263/1024>>. Acesso em: 11 jan. 2015.
- ANSCHAU, F.; GONÇALVES, M.A.G. Citologia cervical em meio líquido *versus* citologia convencional. **Femina**, v. 34, n.5, p.329-335, maio 2006. Disponível em: <http://febrasgo.luancomunicacao.net/wp-content/uploads/2013/05/Femina_34-5-25.pdf>. Acesso em: 10 maio 2014.
- ARBYN, M. *et al.* Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.96, n.4, p. 280-293, 2004. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/96/4/280.long>>. Acesso em: 26 jan. 2015.
- AYRES, A.R.G.; SILVA, G. A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 5, p. 963-974, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102010000500023&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 14 set. 2014.
- BANSAL, D. *et al.* Molecular epidemiology and genotype distribution of Human Papillomavirus (HPV) among Arab women in the state of Qtar. **J. Transl. Med.**, v.12, n. 1, p. 1-9, 2014. Disponível em: < <http://www.translational-medicine.com/content/pdf/s12967-014-0300-4.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2015.
- BD CELL enrichment process. Becton, Dickinson and Company, 2015. Disponível em: <http://www.bd.com/tripath/labs/sp_cell_enrich.asp>. Acesso em: 29 dez. 2014.
- BERNARD, E. *et al.* Comparing Human papillomavirus prevalences in women with normal cytology or invasive cervical cancer to rank genotypes according to their oncogenic potential: a meta-analysis of observational studies. **BMC Infect. Dis.**, v.13, n. 373, p.1471-2334, 2013. Disponível em:< <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/373>> . Acesso em: 10 May 2014.
- BOSCH, F.X. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, v.55, n.4, p. 244-265, 2002. Disponível em:<<http://jcp.bmj.com/content/55/4/244.long>>. Acesso em: 28 out. 2014.
- BRUNI, L. *et al.* Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J. Infect. Dis.**, v. 202, n.12, p.1789-1799, 2010. Disponível em: < <http://jid.oxfordjournals.org/content/202/12/1789.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

- BRUNO, A. *et al.* Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.36, n.9, p.416-422, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v36n9/0100-7203-rbgo-36-09-00416.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2014.
- CAETANO, R. *et al.* Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. **PHYSIS**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.99-118, 2006. Disponível em :<<http://www.scielo.br/pdf/physis/v16n1/v16n1a07>> . Acesso em: 25 set. 2013.
- CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, v.110, n. 3, Suppl. 2, p. S4-S7, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> . Acesso em: 10 May 2014.
- CENTRO DE GENOMAS. Metodologia PCR real time. **Carta Molecular**: O Centro de Genomas compartilhando informação, n. 2. Disponível em: <http://www.centrodegenomas.com.br/Arquivos/1/Carta_Molecular_N2.pdf> . Acesso em: 26 set. 2013.
- CLIFFORD, G. *et al.* Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br. J. Cancer**, v. 89, n. 1, p. 101-105, 2003. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2394204/>> . Acesso em: 14 set. 2014.
- COBAS 4800 SYSTEM. Roche Molecular Systems, 1996-2015. Disponível em: <<http://molecular.roche.com/instruments/Pages/cobas4800System.aspx>>. Acesso em: 3 fev. 2013.
- COBAS HPV test. Roche Molecular Systems, 1996-2015. Disponível em: <<http://molecular.roche.com/assays/Pages/cobasHPVTest.aspx>>. Acesso em: 3 fev. 2013.
- DARRAGH, T.M. *et al.* The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations From the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology and College of American Pathologists. **J. Lower Genital Tract. Dis.**, v.16, n.3, p.205-242, 2012. Disponível em: < <http://www.asccp.org/Practice-Management/LAST-Project/LAST-Consensus-Recommendations-and-Resources>>. Acesso em: 29 Dec. 2014.
- DE SANJOSE, S. *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical câncer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 11, p. 1048-1056, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952254>>. Acesso em: 12 Oct. 2015.
- DE VILLIERS, E.M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1/2, p. 2-10, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213002456>> . Acesso em: 7 Sept. 2014.

DE VILLIERS, E.M. *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004. Disponível em: <http://www.elsevier.com/__data/assets/pdf_file/0017/105308/Classification_papillomaviruses.pdf> . Acesso em: 9 Mar. 2014.

DESCRITORES em ciência da saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

DINC, B. *et al.* Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with several cervical pathologies. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.14, n.1, p. 19-23, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428649>> . Acesso em: 14 Sept. 2014.

ELEUTÉRIO Jr, J. *et al.* Associação entre carga viral de HPV de alto risco, expressão de P16^{INK4a} e lesões intra-epiteliais escamosas do colo uterino. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.53, n. 6, p.530-534, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302007000600022&script=sci_arttext> . Acesso em: 6 fev. 2013.

FEDRIZZI, E.N. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. **Rev. Bras. Patol. Trato Gen. Inf.**, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2011. Disponível em: <<http://projeto HPV.com.br/projeto HPV/wp-content/uploads/2011/03/RBPTGI-Epidemiologia-2011.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2014.

FERRAZ, L.C; SANTOS, A.B.R.; DISCACCIATI, M.G. Ciclo Celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Biomed. J. Health Sci. Inst.**, v.30, n.2, p.107-111, 2012. Disponível em: <http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02_abr-jun/V30_n2_2012_p107-111.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2014.

GIRALDO, P.C. *et al.* Prevenção da infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. HPV infection and lesion prevention using HPV vaccine. **DST J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 20, n.2, p. 132-140, 2008. Disponível em: <<http://www.dst.uff.br/revista20-2-2008/9.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2014.

GUETTITI, H. *et al.* Pre-vaccination prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among women from urban Tunis: a cross-sectional study. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v.15, n. 21, p. 9361-9365, 2014. Disponível em: <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume15_No21/9361-9365%208.27%20Haifa%20Guettiti.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2015.

HAMZI ABDUL RAUB, S. *et al.* Distribution of HPV genotypes in cervical cancer in multi-ethnic Malaysia. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 15, n.2, p. 651-656, 2014. Disponível em: <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume15_No2/651-656%209.16%20Sayyidi%20Hamzi%20Abdul%20Raub.pdf>. Acesso em: 12 Jan. 2015.

IBAÑEZ, R. *et al.* Protecting the underscreened women in developed countries: the value of HPV test. **BMC Cancer**. v.14, n.547, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/574>>. Acesso em: 11 Jan. 2015.

INCA. **Tipos de câncer:** colo do útero. 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uterio/definicao>. Acesso em: 12 set. 2014.

JING, L. *et al.* HPV genotypes and associated cervical cytological abnormalities in women from the Pearl River Delta region of Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Infect. Dis.*, v. 14, n. 388, p.1-9, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/388>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

JUNYANGDIKUL, P. *et al.* Clinical prediction based on HPV DNA testing by hybrid capture 2 (HC2) in combination with liquid-based cytology (LBC). *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, v. 14, n.2, p.903-907, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621259>>. Acesso em: 29 jul. 2013.

KIM, M. J. *et al.* Type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus by cervical cytology and age: Data from the health check-ups of 7.014 Korean women. *Obstet. Gynecol. Sci.*, v. 56, n.2, p.110-120, 2013. Disponível em: <<http://ogscience.org/DOIx.php?id=10.5468/OGS.2013.56.2.110>>. Acesso em: 12 Jan. 2015.

KONDO, K. *et al.* Genotype distribution of human papillomavivuses in Japanese women with abnormal cervical citology. *Open Virol. J.*, v. 6, Suppl. 2, p. 277-283, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547357/>>. Acesso em: 10 May 2014.

LAPIERRE, S.G. *et al.* Human papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 tests for detection of high-grade lesions of the uterine cervix. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 4, p. 1240-1244, 2012. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/50/4/1240.full>>. Acesso em: 3 Feb. 2013.

MARCHETTA, J.; DESCAMPS, P. **Colposcopia.** Rio de Janeiro: Revinter, 2007. Tradução: Gutemberg Almeida.

MARIANI, L. *et al.* Human papillomavirus prevalence and type-specific relative contribution in invasive cervical cancer specimens from Italy. *BMC Cancer*, v.10, n.259, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/259>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

MATEOS LINDEMANN, M. L. *et al.* Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain: Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Adv. Prev. Med.*, v. 2011, Article ID 269468, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/apm/2011/269468/>>. Acesso em: 8 Dec. 2015.

MATEOS LINDEMANN, M.L. *et al.* Analytical comparison of the cobas HPV Test with Hybrid Capture 2 for the detection of high-risk HPV genotypes. *J. Mol. Diagn.*, v.14, n.1, p.65-70, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079749>>. Acesso em: 11 Sept. 2014.

MELONI, A. *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus infection in Italian women with cervical abnormalities. **J. Public Health Res.**, v.3, n.157, p. 21-26, 2014. Disponível em: <<http://www.jphres.org/index.php/jphres/article/view/157/120>>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

MENDONÇA, V. G. *et al.* Infecção Cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 32, n. 10, p. 476-485, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032010001000002>. Acesso em: 3 fev. 2013.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 6, p.518-527, 2003. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa021641>>. Acesso em: 7 Sept. 2014.

NATPHOPSUK, S. *et al.* Human papillomavirus genotypes and cervical cancer in northeast Thailand. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 14, n.11, p. 6961-6964, 2013. Disponível em: <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume14_No11/6961-6964%209.12%20Sitakan%20Natphopsuk.pdf>. Acesso em: 29 Dec. 2014.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). **Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenvol.**, n. 33, jul./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2013.

PAENGCHIT, K.; KIETPEERAKOOL, C.; LALITWONGSA, S. Prevalence and Genotype Distribution of HPV among Women Attending a Cervical Cancer Screening Mobile Unit in Lampang, Thailand. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 15, n.15, p. 6151-6154, 2014. Disponível em: <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume15_No15/6151-6154%204.10%20Kannika%20Paengchit.pdf>. Acesso em: 22 Jan. 2015.

PITTA, D.R. *et al.* Phylogenetic classification of human papillomavirus genotypes in high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women from a densely populated Brazilian urban region. **Sao Paulo Med, J.**, v.127, n.3, p.122-127, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-31802009000300003&script=sci_arttext>. Acesso em: 8 set. 2014.

PREISLER, S. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche cobas HPV real-time PCR assay. **PLoS One**, v. 8, n.3, p. e59765, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0059765&representation=PDF>>. Acesso em: 29 July 2013.

RODRIGUES, A. D. *et al.* Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 6, p. 457-462, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000600004>. Acesso em: 8 nov. 2014.

SERRANO, B. *et al.* Potencial impact of 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). **Cancer Epidemiol.**, v. 38, p.748-756, 2014. Disponível em : <[http://www.cancerepidemiology.net/article/S1877-7821\(14\)00153-2/pdf](http://www.cancerepidemiology.net/article/S1877-7821(14)00153-2/pdf)>. Acesso em: 2 nov. 2014.

SHERMAN, M. E. *et al.* Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. **Cancer**, v. 81, p. 89–95, 1997. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19970425\)81:2%3C89::AID-CNCR2%3E3.0.CO;2-9/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0142(19970425)81:2%3C89::AID-CNCR2%3E3.0.CO;2-9/epdf)>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

SIDDIQA, A. *et al.* Prevalence and genotyping of high risk human papillomavirus in cervical câncer samples from Punjab, Pakistan. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2762-2777, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113792/pdf/viruses-06-02762.pdf>>. Acesso em: 10 Jan. 2015.

SOLOMON, D. *et al.* Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.93, n.4, p. 293-299, 2001. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/93/4/293.long>>. Acesso em: 11 Jan. 2015.

STOLER, M.H. *et al.* American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP- guided management requires the use of Well-validated assays. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 127, n.3, p.335-337, 2007. Disponível em: < <http://ajcp.ascpjournals.org/content/127/3/335.full.pdf>>. Acesso em: 12 Jan. 2015.

TACHEZY, R. *et al.* Human papillomavirus Genotype Distribution in Czech Women and Men with Diseases Etiologically Linked to HPV. **PLoS One**, v.6, n. 7, e21913, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135602/>>. Acesso em: 6 Feb. 2013.

THE ALTS group -The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/ Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, n. 5, p. 397-402, 2000. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/92/5/397.full.pdf+html>>. Acesso em: 29 Dec. 2014.

THE THINPREP Pap test. The ThinPrep difference – Beyond the convencional Pap Smear. Hologic, Inc, 2010. Disponível em: <http://www.thinprep.com/hcp/thinprep_difference/beyond_conventional_pap.html>. Acesso em: 29 Dec. 2015.

WANG, X. C. *et al.* Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus among women from Henan, China. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 15, n.17, p. 7333-7336, 2014. Disponível em: <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume15_No17/7333-7336%207.6%20Xiaochuan%20Wang.pdf>. Acesso em: 13 Jan. 2015.

WRIGHT Jr, T.C. *et al.* Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology- negative results. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.136, n.4, p. 578-586, 2011. Disponível em: <<http://ajcp.ascpjournals.org/content/136/4/578.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 Jan. 2015.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation oh human cancers – a brief historical account. **Virology.** v. 384, n.2, p. 260-265, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682208007721>>. Acesso em: 16 Nov. 2014.

APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Formulário:

<p>IDENTIFICAÇÃO DE HPV 16, 18 E DE OUTROS 12 TIPOS DE ALTO RISCO EM MATERIAL DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO COM DIAGNÓSTICO DE ATÍPIAS ESCAMOSAS (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL E CARCINOMA ESCAMOSO).</p>		
IDENTIFICAÇÃO:		
IDADE:	PEDIDO:	
DATA DA COLETA:	DATA DA PCR:	CML:
CITOLOGIA :		
1() ASCUS 2() ASCH 3() AGH 4() LSIL 5() HSIL 6() CIS		
DNA – HPV: POSITIVO () NEGATIVO ()		
GENOTIPAGEM: 1()16 2()18 3() AR (Outros 12 tipos de Alto Risco)		