



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR HPV E PERFIL DAS MULHERES
FRENTE AO EXAME DE PAPANICOLAOU NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ
DO MIPIBU/RN.**

ERMETON DUARTE DO NASCIMENTO

NATAL, RN
2008

ERMETON DUARTE DO NASCIMENTO

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR HPV E PERFIL DAS MULHERES
FRENTE AO EXAME DE PAPANICOLAOU NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ
DO MIPIBU/RN.**

Orientador: **Dr. José Veríssimo Fernandes**
CB/DMP/UFRN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

NATAL / RN
Dezembro de 2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR HPV E PERFIL DAS MULHERES
FRENTE AO EXAME DE PAPANICOLAOU NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ
DO MIPIBU/RN.**

ERMETON DUARTE DO NASCIMENTO

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes (Orientador)
DMP / CB / UFRN

Profa. Dra. Maria Goretti Freire Carvalho
Universidade Potiguar

Profa. Dra. Ma de Fátima F. de Melo Ximenes
DMP / CB / UFRN

Natal/RN, 05 de dezembro de 2008.

*Àquele que diretamente, foi o responsável pela minha vinda para o RN, me dando todo o suporte necessário à permanência no Estado. Dedico esse trabalho a você, meu grande amigo **Sebastião Pacheco Duque Neto.***

AGRADECIMENTOS

Àquele que sempre me fez acreditar que todo o sacrifício daria certo, que toda lágrima seria recompensada, que cada dificuldade seria convertida em felicidade. Àquele a quem devo todas as minhas forças e tudo o que conquistei, conquisto e sempre conquistarei, **DEUS**.

Ao **Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes**, meu orientador, pelos ensinamentos, pela confiança depositada e pela oportunidade de aprender sobre HPV.

Ao **Prof. Paulo Roberto Medeiros de Azevedo**, do Departamento de Estatística da UFRN, pela análise estatística deste trabalho.

A **Profª. Drª. Maria Goretti Freire Carvalho** pela análise citológica das amostras incluídas neste trabalho.

À **Profª Drª Maria de Fátima Freire de Melo Ximenes** por aceitar sem hesitar a minha orientação no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFRN e pelo coleguismo compartilhado durante esses três anos de DMP.

Aos Professores componentes da Banca Examinadora de Qualificação **Dr. Valter de Andrade Neto, Dr. Carlos Augusto Galvão Barbosa e Drª Mª de Fátima Ximenes**, pelas dicas e sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

Ao grande amigo de todas as horas **Sebastião Pacheco Duque Neto**, grande companheiro de caminhada, aquele que chorou e sorriu comigo, que com suas palavras sábias me elogiou e me repreendeu quando era preciso. Essa conquista não é só minha, pela sua presença constante e marcante, é nossa. Obrigado!!!

Às minhas colegas de trabalho, amigas e muitas vezes confidentes do Laboratório de Bacteriologia Médica (LaBMed), **Profª Maria Celeste de Melo, Profª Maria José de Britto Fernandes**, por tornarem o meu dia mais leve e agradável, e pela confiança que sempre depositam em mim. Obrigado pelo espaço físico e afetivo que sempre me ofertam.

À todos os colegas e amigos do LaBMed, **Eutália, Francisco, Myrian, Bibiana, Jannyce, Pedro, Luanda e Cláudio** pelo incentivo e alegrias diárias.

À todos os professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN, em especial as Professoras **Fabiana, Janeusa, Renata, Magnólia, Tereza, Regina e Vânia** pelo convívio alegre que temos.

Ao amigo, incentivador de todas as horas e de todos os momentos, aquele que sempre acreditou que eu conseguiria fazer, até nos instantes em que eu mesmo duvidava, **Prof Alexandre Flávio Queiroz**.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Doenças Infecciosas e Câncer (LDIC), **Renato, Adriana, Ítalo, Walkíria, Adriane, Aline, Bruno, Tiago, Carol, Juliana e Valeska** por toda a amizade e ajuda prática nas extrações de DNA, PCR e eletroforese que fizemos, e que nos custou tanto trabalho. Sem vocês eu tenho a certeza absoluta que a conclusão desse trabalho não teria sido possível.

Ao amigo **Renato César de Sousa**, um homem de coração bom e um incansável batalhador da causa biomédica, a quem tenho grande admiração pelo que é e uma imensa gratidão pela participação inicial do projeto HPV, pelas técnicas repassadas no processamento das amostras, das PCRs e das eletroforeses.

Aos amigos do Laboratório Martins, **André e Analéa Martins, Anna Elizabeth, Ticiane Palhano, Isaac Pinheiro e Priscila Alves**, local de aprendizado e alegrias, de onde eu nunca saí, apesar de não trabalhar mas naquele espaço. Obrigado por tudo.

Aos amigos, **Anna Elizabeth, Adriana Patrícia, Cristina Iglesias, Gláucia Polianna, Ítalo Maia, Ana Katarina, Maria Emília, Cleysivan NEMO e Virgínia Penélope** por toda a torcida em prol da vitória e por estarem sempre presentes.

A toda minha família, que mesmo estando distante estava presente.

Aos amigos recifenses, **Tatiana Crespo, Fabiana Gonçalves e Marcos Begoto** e ao amigo, potiguar “agregado”, **Cosme “Gonçalves”**, obrigado pelas horas de descontração.

Aos colegas do mestrado em Ciências Biológicas, pelo convívio agradável, em especial, **Milena, Andréa, Magali, Elieudo, Marcos, Cimária, Lígia, Eutália e Emanuelle**.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e a UFRN pelo espaço físico cedido.

A todos os meus alunos que indiretamente cooperaram para a realização desse trabalho, porque sempre renovaram as minhas forças ao assistirem minhas aulas, me fazendo perceber que o ensino é realmente a minha vocação.

E a todos que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho.

*"Quando alguém evolui,
evolui tudo que está à sua volta."*

Paulo Coelho

SUMÁRIO

Capítulo 1		
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO	4
2.2 A INFECÇÃO CERVICAL PELO HPV	10
2.3 OS CO-FATORES ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO PELO HPV	12
2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HPV	14
2.5 A INFECÇÃO PELO HPV E O CÂNCER DO COLO DE ÚTERO	15
2.6 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	18
2.7 O PROGRAMA DE CONTROLE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	20
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL:	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 ETAPA I	25
4.1.1 INQUÉRITO DOMICILIAR	25
<i>Conhecimento sobre o exame citológico de Papanicolaou</i>	26
4.1.1.1 <i>Atitude sobre o exame de Papanicolaou</i>	26
4.1.1.2 <i>Prática em relação ao exame citológico de Papanicolaou</i>	26
4.1.1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4.1.2 ETAPA II	27
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	27
4.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA DAS CÉLULAS CERVICAIS	27
4.2.2 ANÁLISE PARA DETECÇÃO DO DNA DO HPV E CHLAMYDIA TRACHOMATIS	28
4.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4.2.4	
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
Capítulo 2	39
Artigo 1	40
Capítulo 3	63
Artigo 2	64
Capítulo 4	83
Perspectivas Futuras	84
Apêndices	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática do genoma do HPV: E (<i>Early</i> do inglês) são genes precoces, L (<i>Late</i> do inglês) são genes tardios e URR é a região reguladora da replicação viral (Adaptado de MUÑOZ <i>et al.</i> , 2006).	5
Figura 02	Representação esquemática da patogênese dos HPVs oncogênicos. E6 e E7 codificam proteínas que se ligam as proteínas celulares p53 e pRB, respectivamente (Adaptado de BURD, 2003)	8
Figura 03	Replicação do HPV relacionada à diferenciação das células do epitélio escamoso estratificado da cérvix uterina mostrando um epitélio cervical normal e um infectado pelo vírus HPV (Adaptado de MUÑOZ <i>et al.</i> , 2006).	11
Figura 04	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação para neoplasia maligna do colo do útero (Adaptado de INCA, 2007)	16
Figura 05	Infecção por vírus do Papiloma humano e câncer. Porcentagem de casos relacionados com a infecção por HPV (Adaptado de TORRES <i>et al.</i> , 2006)	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação das variáveis sócio-demográficas em função dos resultados do exame citológico de Papanicolaou	69
Tabela 2	Distribuição das mulheres por faixa etária em função da frequência com que realizam o exame preventivo de Papanicolaou	70
Tabela 3	Avaliação dos fatores de risco em função dos resultados do exame citológico de Papanicolaou	71
Tabela 4	Prevalência da infecção por HPV em função do resultado do exame citológico de Papanicolaou	72
Tabela 5	Avaliação das variáveis sócio-demográficas em função da presença do HPV	73
Tabela 6	Avaliação dos fatores de risco em função da presença do HPV ...	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC-US	Atíпия de Célula Escamosa de Significado Indeterminado
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
C33	Linhagem de células negativa para HPV
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio Padrão
E	(early) Região precoce do genoma viral
L	(late) Região tardia do genoma viral
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Dissódico
E2F	Família de fatores de transcrição reguladores positivos do ciclo celular
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
E6	Proteína produto do gene E6 do HPV
E7	Proteína produto do gene E7 do HPV
E6-PA	Proteína celular que se associa a E6
HeLa	Linhagem de células positiva para o HPV18
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
HPV	Papilomavírus Humano
IC	Intervalo de Confiança
IL2	Interleucina 2
IL12	Interleucina 12
L1	Proteína principal do capsídeo, produto do gene L1 viral
L2	Proteína secundária do capsídeo, produto do gene L2 viral
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIC I	Neoplasia intraepitelial Cervical de grau leve
NIC II	Neoplasia intraepitelial Cervical de grau moderado
NIC III	Neoplasia intraepitelial Cervical de grau elevado
NK	Células Matadoras Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
RC	Razão de Chance

Pap	Papanicolaou
PAISM	Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher
PCR	Reação em Cadeia da Polimerização
p53	Proteína supressora de tumor, produto do gene TP53 humano
PSF	Programa de Saúde da Família
PM	Padrão Molecular
pRB	Proteína de codificada pelo gene de sensibilidade ao retinoblastoma
pb	Pares de bases
RNA	Ácido Ribonucléico
TBE	Tris-borato-EDTA
TEP	Tris 10Mm, EDTA 10mM e proteinase K
Th1	Linfócito T auxiliar 1 (Thelper 1)
TP53	Gene que codifica a proteína p53
URR	Região Reguladora
VLP	Partículas semelhantes a vírus

RESUMO

O vírus do papiloma humano (HPV) representa um dos principais agentes sexualmente transmissíveis entre as populações humanas de todo o mundo. Vários fatores estão associados à infecção e a persistência desse vírus no organismo. A infecção produtiva pelo HPV resulta em alterações no epitélio da cérvix uterina que podem evoluir para lesões de diferentes graus inclusive as malignas. Tais lesões podem ser visualizadas através do exame citológico de Papanicolaou (Pap), que apesar de simples, tem alto valor como teste de triagem na prevenção do câncer de colo do útero. Este estudo constou de duas etapas, com metodologias e abordagens distintas. O material coletado em cada etapa, sejam dados sócio-demográficos ou espécimes da cérvix uterina para análise, foram obtidas de pacientes diferentes e foram analisados separadamente. Na etapa I, avaliou-se o conhecimento, a atitude e a prática das mulheres em relação ao Pap por meio de entrevistas domiciliares de 267 mulheres das zonas rural e urbana do município de São José do Mipibu, utilizando questionário estruturado. Na etapa II, foram incluídas 605 mulheres com idade variando de 15 a 71 anos, média de 33,5 anos das quais foram coletados dois espécimes cervicais, sendo um para o exame citológico e o outro para análise molecular. Um questionário epidemiológico foi utilizado para obter informações, visando identificar fatores de risco associados à infecção. Para a análise molecular as amostras foram processadas utilizando protocolo de extração rápida de DNA de mamíferos. Para detecção do DNA da *C. trachomatis* e do HPV foi utilizada a técnica de PCR com os iniciadores CP24/27, e GP5+/GP6+ respectivamente. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e corados pela prata. Do total de mulheres analisadas na etapa I apenas 46,1% demonstram possuir conhecimento adequado sobre o teste de Pap. As proporções de atitude e prática adequadas foram significativamente maiores, 63,3% e 64,4% respectivamente. As mulheres com maior grau de escolaridade apresentaram melhores índices de adequação dos conhecimentos, atitudes e prática. O descuido, a falta de solicitação do exame pelo médico e a vergonha, se apresentaram como principais barreiras para a realização do exame. Na etapa II encontrou-se uma prevalência geral do HPV de 28,9%, sendo 26,7% nas mulheres com citologia normal ou alterações benignas, sendo 26,7% as que tinham atipia de célula escamosa de significado indeterminado (ASC-US) e 80% naquelas com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL). A prevalência da infecção pelo HPV foi maior nas pacientes com até 30 anos de idade, nas solteiras, e naquelas que tiveram mais de um parceiro sexual e estas apresentaram maior risco de aquisição da infecção pelo HPV e para o desenvolvimento de lesões da cérvix uterina.

Palavras chaves: HPV, Papanicolaou, Alterações citológicas

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) infection is the major sexually transmitted disease all over the world. There are many factors associated to infection and the virus persistency in the organism. This study aims to evaluate the women's knowledge, attitudes and practice about the Papanicolaou test (Pap), as well as analyze the HPV and *Chlamydia trachomatis* infections prevalences in sexually active women from the city of São José do Mipibu/RN/Brazil. This research was divided in two steps (step I and step II), using different methodologies and samples each. The samples collected in each step, even socio-demographic or from uterus cervix, are from different patients e were analyzed separated. In step I was evaluated 267 rural and urban zone women's knowledge, attitudes and practices about the Pap by home interview. In the step II were included 605 women with age ranged from 15 to 71 years old, with mean of 33,5 years old and from each one were collected two cervical samples, one for Pap and other for molecular biology, beside the epidemiological interview to investigate the correlation between prevalence of HPV infection and risk factors. To molecular analyses, the samples were processed using a mammal rapid DNA extraction technique protocol. For *C. trachomatis* DNA detection were used the CP24/27 primers, and GP5+/GP6+ to HPV. PCR products were analyzed by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels, followed by silver staining. The results of the step I showed that, in spite of only 46,1% of the interviewed women they have demonstrated to possess appropriate knowledge on the Pap test, the attitude and practice proportions were significantly larger, 63,3% and 64,4% respectively. The largest education degree presented association with adaptation of the knowledge, attitudes and practice, while neglect, lack of solicitation of the exam for the doctor and shame, came as main barriers for the accomplishment of the exam. In the stage II the HPV general prevalence was 28,9%, being 26,7% in the women with normal cytology or benign alterations, 26,7% in the ones that had atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and 80% in those with Low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). the HPV infection prevalence was larger in the patients with up to 30 years of age and in the unmarried women, and those that had more than one sexual partner presented larger infection risk. The results show that the sexual relationship with multiple partners increased the infection risk for HPV and consequently the possibility of the occurrence of lesions uterine cervix.

Key words: HPV, Papanicolaou, cytological alterations

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus constituem um grande grupo de vírus epiteliotrópicos com genoma de DNA não envelopados, que infectam a pele e mucosas de várias espécies de vertebrados, inclusive o homem, sendo altamente específicos, não apenas para seus respectivos hospedeiros, mas também em relação aos sítios anatômicos onde causam infecção em cada um deles (MEYERS, MAYER & OZBUN, 1997; VILLA, 1995a; BURD, 2003). Inclui-se nesse grupo o vírus do papiloma humano (HPV) com mais de uma centena de tipos diferentes, classificados em genótipos, de acordo com a seqüência de nucleotídeos de sua unidade de tradução L1, uma região altamente conservada do genoma viral que codifica a proteína principal do capsídio (DE VILLIERS, 1994; ZUR HAUSEN, 1996).

A associação bem estabelecida, entre atividade sexual e ocorrência das neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), indicava fortemente a possível participação de um agente infeccioso transmissível pelo contato sexual, no desenvolvimento dessas lesões (BRINTON & HOOVER, 1992; VILLA, 2003; MONSONEGO *et al.*, 2004), as quais são identificadas como precursoras do câncer do colo uterino, fazendo com que esse tipo de tumor, se comporte como uma doença sexualmente transmissível (MACIAG & VILLA, 1999).

Com a descoberta dos métodos moleculares, estudos realizados em diversas partes do mundo não apenas reforçaram essa hipótese, como apontaram de forma consistente, a infecção pelo papilomavirus humano com o principal fator de risco para o câncer de colo do útero e suas lesões precursoras (MUÑOZ, 2000; BOCH & SANJOSÉ, 2003). Evidências epidemiológicas e clínico-laboratoriais acumuladas nos últimos 25 anos, não deixam a menor dúvida da participação de certos tipos de HPV na etiologia dessas lesões, existindo uma relação direta, entre a infecção do epitélio da cérvix uterina, pelo HPV e a ocorrência de lesões de diferentes graus, incluindo o câncer de colo do útero (KOUTSKY *et al.*, 1992; MUÑOZ *et al.*, 2003; COGLIANO *et al.*, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2006).

Estudos sugerem que o estado imune, fatores hormonais associados ao uso prolongado de contraceptivos orais, tabagismo, início precoce das atividades sexual e reprodutiva, condições sócio-econômicas, nível de instrução, além de certas deficiências nutricionais e infecções concomitantes por *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida* spp., Herpesvírus, entre outros, podem funcionar como co-fatores contribuindo para progressão das lesões de baixo para as de alto grau, inclusive o câncer de colo do

útero (ROLÓN *et al.*, 2000; CASTELLSAGUÉ & MUÑOZ, 2003; SMITH *et al.*, 2004; SHIELDS *et al.*, 2004; SHEW *et al.*, 2006; SCHNATZ *et al.*, 2008).

A prevalência da infecção por HPV e a distribuição dos genótipos por ordem de prevalência, apresentam variações entre as populações de diferentes regiões geográficas. No Rio Grande do Norte, foi realizado um estudo por Fernandes (2004), envolvendo amostras obtidas de mulheres de diferentes regiões do Estado, com citologia normal e com lesões cervicais de diferentes graus, inclusive o câncer, utilizando a técnica de PCR. Neste estudo foi analisada a prevalência da infecção da cérvix uterina pelo HPV, sua relação com a ocorrência de lesões cervicais de diferentes graus, como características sócio-demográficas do segmento da população estudado bem como fatores de risco clássicos para doenças sexualmente transmissíveis. Os resultados obtidos apontam para evidências que sugerem um perfil epidemiológico da infecção pelo HPV no âmbito local, um pouco diferente daquele encontrado em outros países e até mesmo de outras regiões do Brasil.

De acordo com o estudo citado, a infecção pelo HPV nas mulheres do Rio Grande do Norte parece ocorrer mais precocemente, possibilitando o desenvolvimento do câncer de colo do útero em mulheres ainda jovens, com uma média de idade de 47 anos, que se situa em uma posição intermediária entre aquelas observadas em alguns países e algumas regiões do Brasil. Em São Paulo a média de idade encontrada para essas mulheres foi de 52 anos (Eluf-Neto *et al.*, 1994) e em Goiana foi 49 anos (Rabelo-Santos *et al.*, 2003). A média de idade das mulheres com câncer no RN foi acima da média de idade das mulheres africanas (34 anos), mas abaixo da média de idade das mulheres do Sul da Europa (56 anos) (BOSCH *et al.*, 1995), da Tailândia (50,3 anos) (CHICHAREON *et al.*, 1998), do Canadá (51,3 anos) (FRANCO *et al.*, 1996), e do Paraguai (49 anos) (RÓLON *et al.*, 2000).

A prevalência geral do HPV no RN foi de 52,5%, sendo 24,5% nas mulheres com citologia normal, 58,8% nas que tinham lesões pré-malignas e 74,3% das portadoras de câncer de colo do útero. O HPV 16 foi o tipo mais prevalente nos três grupos, com índices de prevalência de 15,4%, 24,0% e 55,0%, respectivamente. O segundo lugar nas mulheres com citologia normal e nas que tinham lesões pré-malignas foi o HPV 58 com índices de 2,7% e 9,8%, respectivamente e o HPV 33 nas mulheres com câncer, com 4,2%. O HPV 18, que em outros países em outras regiões do Brasil se apresenta como o segundo lugar em prevalência, neste estudo se apresentou em terceiro lugar nas mulheres com citologia normal e naquelas com câncer, com índices de 1,8% e 3,7%, respectivamente, e o quarto lugar nas mulheres com lesões pré-malignas, com índice de

2,2%. Esses resultados indicam que parece haver também diferenças na distribuição dos tipos do vírus que são mais prevalentes na Região Nordeste, tendo em vista que resultados semelhantes foram obtidos por Lorenzato *et al.*, (2000), em estudo realizado em mulheres da cidade do Recife.

O presente estudo foi realizado no município de São José do Mipibú, localizada a 40km da cidade do Natal, com uma população estimada de 38.381 habitantes, dos quais 13.460 são mulheres na faixa etária acima dos 10 anos de idade, onde foi detectada uma prevalência acima do esperado de alterações cervicais detectadas por meio do exame de Papanicolaou no período de 2001 a 2004. O programa SISCOLO do Ministério da Saúde e o sistema de notificação do câncer de colo uterino do DATASUS notificaram a Secretaria de Saúde do município e sugeriu que fosse investigada a causa dessa alta prevalência de lesões da cérvix uterina na população feminina local. Este fato chamou a atenção das autoridades de saúde do município e contribuiu para que o Ministério da Saúde financiasse o presente estudo que foi realizado com o apoio Secretaria de Saúde do Município. Este fato merece especial atenção principalmente porque quase metade da população local é composta por mulheres na faixa etária de maior risco, as quais estão expostas à infecção pelo HPV. Estes dados justificam a realização de estudos locais que permitam determinar o papel deste patógeno, bem como os fatores de risco para a ocorrência de tais lesões.

A obtenção de dados a respeito do perfil epidemiológico da infecção pelo HPV na população local, pode ter um papel importante na definição de políticas públicas baseadas na realidade local. Se confirmados esses dados e sendo identificados os fatores que estão envolvidos e contribuindo de alguma forma para essa alta frequência lesões cervicais, serão pospostas ações específicas voltadas para o enfrentamento do problema visando a prevenção da infecção pelo HPV e conseqüentemente das lesões de diferentes graus inclusive o câncer de colo do útero.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O papilomavírus humano

O vírus do papiloma humano (HPV) constitui um grande grupo de pequenos vírus ubíquos que infectam a superfície queratinizada da pele e mucosa de diferentes sítios anatômicos do corpo humano. Cerca de 120 tipos já foram catalogados e caracterizados como base no sequenciamento do seu gene L1 e mostram uma marcante variedade genômica entre eles. Oitenta e cinco genótipos já estão bem caracterizados (BURD, 2003). No Brasil algumas variantes com maior potencial oncogênico, principalmente do HPV 16 já foram identificadas (CERQUEIRA *et al.*, 2002; ALENCAR *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2008).

Os vírus do papiloma humano estão classificados na família ***Papillomaviridae***, gênero ***Papillomavirus*** (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000) que abrange um grande grupo de vírus epiteliotrópicos com genoma de DNA, os quais infectam a pele e mucosas, sendo altamente específicos, não apenas para seus respectivos hospedeiros, mas também em relação aos sítios anatômicos onde causam infecção em cada um deles (MEYERS, MAYER & OZBUN, 1997; VILLA, 1995a; BURD, 2003).

Os HPVs constituem um grupo de pequenos vírus com genoma de DNA de duplo filamento circular, associado a proteínas semelhantes às histonas com aproximadamente 8.000 pares de bases (FAVRE *et al.*, 1977; PFISTER *et al.*, 1978; VILLA, 2003) envolvido por um capsídio de simetria icosaédrica, constituído por 72 capsômeros, sem a presença de envelope, apresentando-se como partículas de aproximadamente 55nm (KLUG & FINCH, 1965; BURD, 2003; LONGWORTH & LAIMINS, 2004). A estrutura do genoma desses vírus foi definida por Crawford & Crawford, 1963, quando ficou demonstrada a presença de nove a dez unidades abertas de leitura distribuídas em três partes: uma região não codificante, URR (*Upstream Region Regulation*), uma região precoce E (de early) e uma região tardia L (de late) (ZUR HAUSEN, 1996; VILLA, 1999; MUÑOZ *et al.*, 2006), (Figura 01).

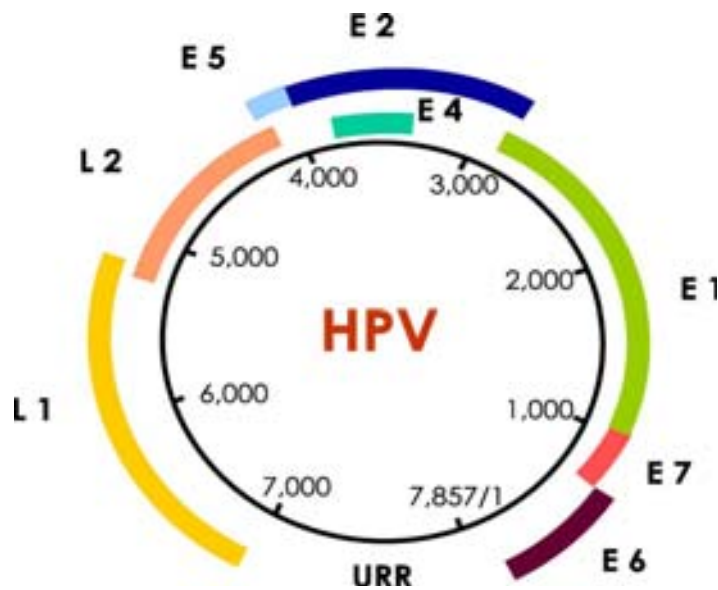


Figura 01: Representação esquemática do genoma do HPV: E (*Early* do inglês) são genes precoces, L (*Late* do inglês) são genes tardios e URR (*Upstream Region Regulation*) é a região reguladora da replicação viral (Adaptado de MUÑOZ *et al.*, 2006).

A região URR corresponde à cerca de 10% do genoma, e nos HPVs associados à infecção genital varia de tamanho, apresentando entre 800 e 900 pares de bases, com variação substancial na seqüência de nucleotídeos entre tipos individuais. Nessa região encontra-se a seqüência onde se inicia a replicação do DNA viral, e vários sítios ligantes para fatores de transcrição celular e viral, bem como seqüências promotoras que regulam a expressão dos genes virais. Além disso, apresenta seqüências responsivas para glicocorticóides, incluindo os hormônios progesterona e progestinas (CHAN, KLOCK & BERNARD, 1989; CAMPO; 1995; VILLA 2003), que regulam positivamente a expressão do gene E6 em HPV16 (MOODLEY *et al.*, 2003). A região precoce é composta por genes que estão envolvidos com a persistência da infecção, bem como na replicação do DNA viral e na ativação da infecção produtiva (ZUR HAUSEN, 1996). A região tardia do genoma do HPV é composta pelos genes L1 e L2, os quais codificam as proteínas estruturais constituintes do capsídio viral (LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

A região precoce é formada por seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) envolvidos em diferentes momentos do ciclo de replicação, mas geralmente se expressam no

começo do processo replicativo. O gene E1 codifica uma proteína que se liga especificamente a região URR e apresenta atividades ATPase e helicase ATP-dependente (CLERTANT & SEIF, 1984; SEO *et al.*, 1993) e interage com a DNA polimerase celular, sendo, portanto, essencial para replicação do DNA viral (VOUSDEN, 1993; ZUR HAUSEN, 1994). O gene E2 codifica duas ou, provavelmente, três proteínas virais diferentes, que se ligam ao DNA viral e atuam como fatores de transcrição. Essas proteínas podem apresentar função de trans-ativação ou repressão dos gens virais, dependendo de como os seus sítios ligantes interagem com a região URR (MCBRIDE, ROMANCZUK & HOWLEY, 1991).

O gene E4 codifica uma proteína cujo papel na biossíntese dos vírus, ainda não foi determinado. Ela não é requerida para a transformação ou persistência epissomal do DNA viral. Essa proteína é encontrada exclusivamente nas células das camadas mais diferenciadas do epitélio infectado, podendo ter papel na criação de condições favoráveis para maturação das partículas virais (ZUR HAUSEN, 1996; ZUR HAUSEN, 1999).

O gene E5 codifica uma proteína envolvida com a estimulação do crescimento e transformação da célula, e forma complexos com uma variedade de outras proteínas trans-membrana (CONRAD, BUBB & SCHLEGEL, 1993), e que apresenta atividade sinérgica com o fator de crescimento epidermal (EGF) na estimulação da proliferação de células epiteliais (VILLA, 1999). Diferentemente da proteína E5 produzida pelo papiloma virus bovino, a E5, dos papilomavírus humano não possui papel importante na atividade transformante na célula infectada, de forma que, sua participação na transformação maligna da célula humana infectada é dispensável (ZUR HAUSEN, 1996).

O gene E6 codifica uma proteína que possui aproximadamente 150 aminoácidos e dois domínios de ligação em dedos de zinco com os motivos Cys-X-X-Cys. A proteína E6 de HPVs de alto risco está distribuída tanto no núcleo como no citoplasma das células infectadas podendo interagir com aproximadamente 12 diferentes tipos de proteínas celulares (ZUR HAUSEN, 2002). A atenção dada a E6 deve-se, principalmente, a sua capacidade de interação com a proteína p53 da célula que se constitui um dos principais mecanismos de carcinogenese do HPV. A proteína p53 celular é um fator de transcrição que funciona como um importante supressor de tumor já bem caracterizado e que regula a expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, incluindo a p21, um inibidor de quinase dependente de ciclina. Em condições normais o aparecimento de danos ao DNA celular promove a ativação de p53 que por sua vez induz a expressão de altos níveis de p21 a qual ativa uma cascata de eventos, resultando na interrupção do

ciclo celular na fase G1, para que haja tempo de reparar tais danos antes que a molécula de DNA entre na fase de duplicação. Caso esse mecanismo de reparo não obtenha êxito, p53 promove um mecanismo que leva à morte celular por apoptose (KO & PRIVES, 1996). Uma dos mecanismos de defesa do hospedeiro nas infecções causadas por vírus é a sinalização e ativação de mecanismos que levam à morte da célula infectada por apoptose. Muitos vírus possuem mecanismos que bloqueiam a apoptose podendo favorecer o desenvolvimento de malignidade (LONGWORTH & LAIMINS, 2004). Para impedir a atividade proapoptótica de p53 e permitir a progressão do ciclo celular, E6 liga-se a p53 em um complexo ternário com uma proteína associada a E6, chamado E6AP. A formação deste complexo resulta na ubiquitinação de p53 e conseqüente degradação desta proteína pelo proteassomo 26S, sendo este fenômeno crucial no processo de carcinogênese induzido pelo HPV (HUIBREGTSE *et al.*, 1991; SCHOELL *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001). E6 pode também regular negativamente a atividade de p53 através de sua associação com p300/CBP, que é um co-ativador de p53 (LENCHNER & LAIMINS, 1994; ZIMMERMANN *et al.*, 1999). A p53 regula os pontos de checagem entre G1/S e G2/M do ciclo celular e sua diminuição resulta na perda deste controle, levando a duplicações do DNA com as alterações resultando em instabilidade cromossômica da célula hospedeira devido ao acúmulo de mutações (KESSIS *et al.*, 1993; THOMPSON *et al.*, 1997). E6 dos HPVs de alto risco pode também ativar a transcrição da subunidade catalítica da enzima telomerase, impedindo que as células entrem em senescência tornando-se imortais (MACDOUGALL & KLINGELHUTZ, 1999; KYO *et al.*, 2000; OH *et al.*, 2004).

O gene E7 codifica a outra oncoproteína viral também importante na imortalização celular e conseqüentemente no papel carcinogênico do HPV (LONGWORTH & LAIMINS, 2004). A ação central de E7 está na sua capacidade de se associar a proteínas da família RB, dentre as quais se incluem Rb, p107 e p130, que podem ser agrupadas e designadas apenas como proteína RB (pRB) (BEREZUTSKAYA *et al.*, 1997; CLASSON & DYSON, 2001). Na sua forma não fosforilada pRB forma um complexo com uma família de fatores de transcrição chamada E2F que se liga a promotores de genes envolvidos na progressão do ciclo celular da fase G1 para S, resultando na repressão da transcrição dos genes envolvidos nessa progressão do ciclo celular (WEINTRAUB *et al.*, 1995). Na progressão do ciclo celular da fase G1 para S, o complexo ciclina-quinase fosforila RB e promove a dissociação do complexo pRB/E2F, liberando E2F para a transcrição de genes envolvidos na síntese e duplicação do DNA. E7 liga-se a pRB promovendo a sua fosforilação e resultando na liberação de E2F, o que permite a expressão constitutiva de genes responsáveis pela duplicação do DNA celular mesmo quando este apresentar alterações,

favorecendo por conseqüência o processo de acumulação de mutações o que favorece a imortalização seguida de transformação celular (LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

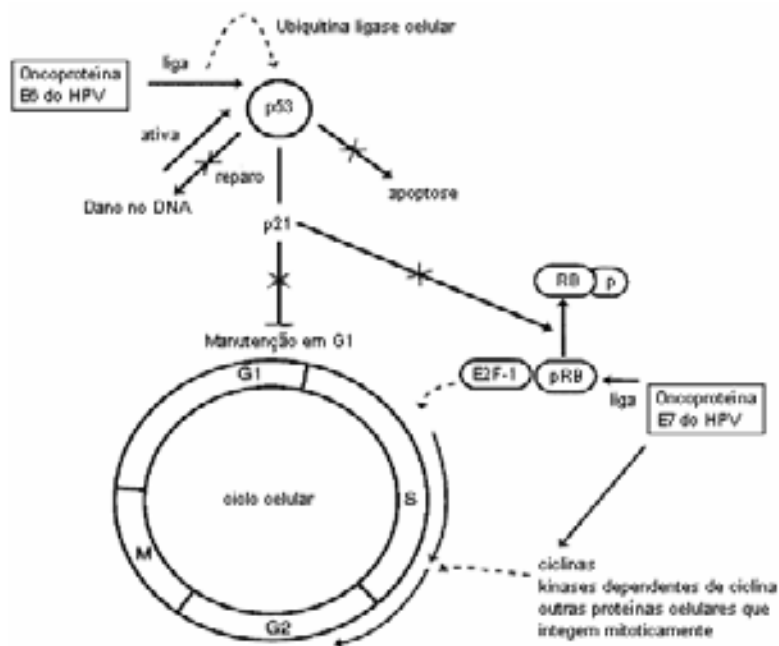


Figura 02. Representação esquemática da patogênese dos HPVs oncogênicos. E6 e E7 codificam proteínas que se ligam as proteínas celulares p53 e pRB, respectivamente (Adaptado de BURD, 2003).

A região tardia do genoma do HPV é composta pelos genes L1 e L2, os quais codificam proteínas estruturais que formam o capsídio viral (LONGWORTH & LAIMINS, 2004). O gene L1, é constituído por pouco mais de 1000 pares de bases e pode ser dividido em duas partes: uma região de, aproximadamente, 450 pares de bases, cuja seqüência de nucleotídeos é altamente conservada em todos os tipos de HPVs presentes nas infecções genitais, apresentando pequenas variações de um tipo para outro, as quais permitem diferenciá-los entre si, e uma região divergente, onde a seqüência de nucleotídeos apresenta variações maiores entre os diferentes tipos dos vírus (MANOS *et al.*, 1989; BROWN *et al.*, 1994). O produto desse gene é a proteína L1 que representa o principal constituinte do capsídio viral, tem peso molecular de aproximadamente 55kDa, é imunogênica, apresentando epítomos que induzem a formação de anticorpos reativos para esses determinantes antigênicos que interagem com os receptores celulares e por isso induz resposta imune tipo específica. O gene L2 codifica a proteína secundária do capsídio viral, que é menos conservada, quando comparada à L1. Tem peso molecular de

75kDa, e é também imunogênica, possuindo epítomos que induzem a produção de anticorpos reativos grupo-específico (HAGENSEE, YAEGASHI & GALLOWAY, 1993; BONNEZ *et al.*, 1993).

A classificação dos HPVs leva em consideração a seqüência de nucleotídeos de sua unidade de tradução L1, que é uma região altamente conservada do genoma viral (DE VILLIERS, 1994; ZUR HAUSEN, 1996). Tendo em vista a diversidade de tipos de HPVs, leva-se em consideração, como critérios para o reconhecimento de novos tipos de HPV, o sequenciamento completo dos genes L1, E6 e E7 do genoma viral, sendo considerados como novos tipos, aqueles que apresentam diferenças na seqüência de nucleotídeos desses três genes, maiores que 10% em relação às cepas de referência. Aqueles que apresentam variações nos referidos genes, entre 2 e 10% em relação aos protótipos, devem ser considerados como subtipos e os que apresentam variações menores ou iguais a 2% devem ser considerados como variantes de um mesmo tipo (DE VILLIERS, 1989). Em 1995, por ocasião da Conferência Anual de Papilomavírus, realizada na cidade de Quebec no Canadá, esses critérios foram revistos e atualmente, diferenças acima de 10% na seqüência de nucleotídeos apenas no gene L1, em relação aos tipos já descritos, é suficiente para caracterizar um novo tipo do vírus (ZUR HAUSEN, 1996).

Os HPVs foram numerados de acordo com a ordem de identificação, de forma que o HPV do tipo 1 foi o primeiro a ser descrito e o HPV16 o décimo sexto, e assim por diante. Até o presente, 85 tipos distintos de vírus já foram identificados e inteiramente seqüenciados. Vários outros tipos foram parcialmente caracterizados (ZUR HAUSEN, 2000).

Clinicamente, as infecções pelos HPVs causam um amplo espectro de lesões proliferativas cutâneas, muco-cutâneas e do epitélio das mucosas, sendo os vírus classificados em três grupos de acordo com a localização da infecção. Os HPVs cutaneotrópicos que infectam as superfícies queratinizadas da pele, onde ocorrem lesões benignas caracterizadas como verrugas comuns; os HPVs cutaneotrópicos associados a lesões malignas da pele em pacientes com epidermodisplasia verruciforme (EV). A EV é uma condição hereditária autossômica recessiva rara, a qual resulta de uma deficiência da imunidade mediada por células T, que torna os indivíduos susceptíveis a tumores de pele, associados a certos tipos de HPVs, principalmente nas áreas do corpo expostas à luz do sol, e os HPVs muco-genitotrópicos, que são aqueles que infectam a genitália externa, mucosa da cavidade oral e da laringe e, especialmente, a mucosa genital (PEREYRA, GERRA & VILLA, 1997). Os HPVs que infectam o trato genital, comumente,

associados às lesões benignas, apresentam propriedades biológicas diferentes daqueles encontrados nas lesões malignas permitindo, assim, classificá-los em dois grupos de acordo com o seu potencial oncogênico. Dos cerca de 40 tipos de HPVs integrantes do grupo mucosa, alguns, como os HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, e 81 são encontrados regularmente em lesões benignas localizadas na região anogenital, na orofaringe e raramente, estão associados a lesões malignas, por isso foram classificados no grupo de baixo risco para o câncer (LOWY, KIRNBAUER & SCHILLER, 1994; MUÑOZ *et al.*, 2003; VILLA, 2003). Outros possuem propriedades imortalizante e transformante de células e alguns deles são encontrados em mais de 90% dos espécimes obtidos de cânceres do colo uterino, (VAN DEN BRULE *et al.*, 1990; YOSHIKAWA *et al.*, 1991; MUÑOZ *et al.*, 2003) da vulva, do ânus, do pênis e de outros sítios anatômicos, com menor frequência (BOSCH *et al.*, 2002 ; HERRERO, 2003; PFISTER, 2003 ; PALAZZI *et al.*, 2003; SYRJÄNEN, 2003). Mais de 20 tipos de HPVs estão associados a tumores malignos e, por isso, foram classificados no grupo de alto risco, para o câncer, destacando-se entre eles os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (HERRERO *et al.*, 2000, BURD, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2003; VILLA, 2003), que apresentam estreita relação com o câncer do colo uterino e suas lesões precursoras (ZUR HAUSEN, 1996; VINCE *et al.*, 2001). O HPV 16 é o tipo mais prevalente no mundo inteiro, exceto na Indonésia, onde o tipo mais proeminente é o HPV 18 (SCHELLEKENS *et al.*, 2004).

2.2. A infecção cervical pelo HPV

O epitélio da cérvix uterina normal tem como base uma camada de células pequenas arredondadas, ainda imaturas, com núcleos grandes, com pouco citoplasma e intensa atividade de divisão. Ao passo que essas células se diferenciam tornam-se maduras e se deslocam para formar as camadas superiores do epitélio onde param de se dividir, adquirem mais citoplasma, param de se dividir, desenvolvem picnose nuclear e finalmente sofrem descamação, sendo então substituídas por novas células (Figura 03). Esse mesmo epitélio quando tem displasia, apresenta graus variados de atipia nuclear, com a presença de células imaturas na camada suprabasal com mitoses anormais e alterações no número de cromossomos (MORRISON, 1992). Essas alterações foram denominadas de atipia colicitótica (KOSS & DURFEE, 1956), cuja característica principal é a presença no epitélio, de células com um amplo halo perinuclear, com bordas bem delimitadas e, freqüentemente com binucleação, exibindo núcleos hipercromáticos com

contornos irregulares as quais são conhecidas como coilócitos. Quando existe displasia, os coilócitos aparecem inicialmente nas camadas intermediárias do epitélio, estendendo-se em seguida às camadas superficiais, onde se tornam mais exuberantes (VILLA, 1995a)

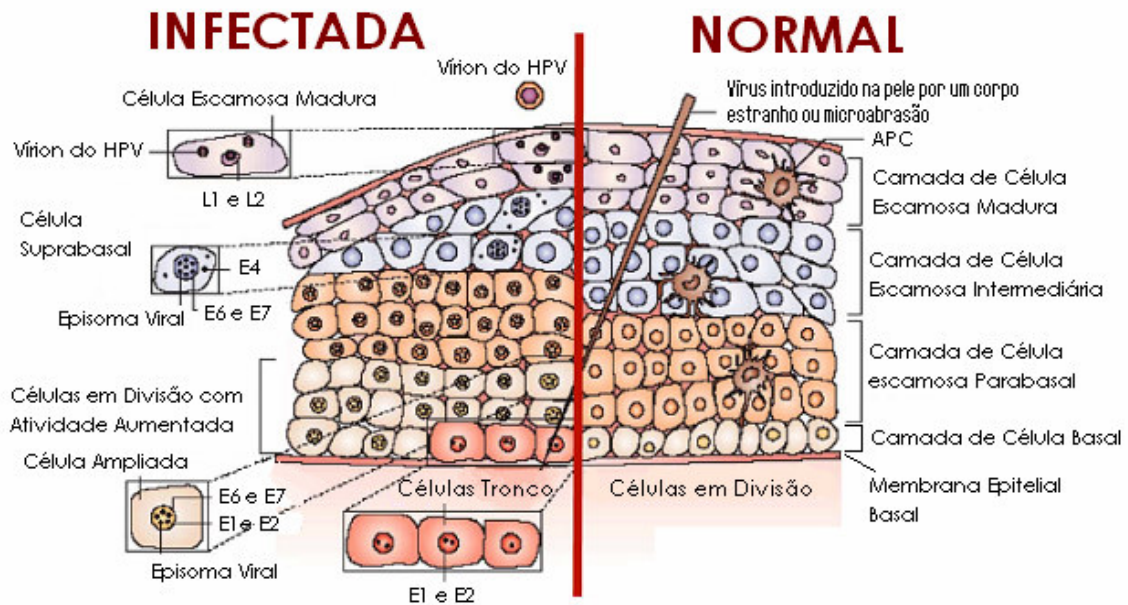


Figura 03. Replicação do HPV relacionada à diferenciação das células do epitélio escamoso estratificado da cérvix uterina mostrando um epitélio cervical normal e um infectado pelo vírus HPV (Adaptado de MUÑOZ *et al.*, 2006).

Meisels & Fortin, (1976) foram os primeiros pesquisadores a relacionar a atipia coilocítica encontrada no epitélio da cérvix uterina com a infecção por HPV, pelo fato daquelas alterações serem idênticas às encontradas nas células do condiloma vaginal e vulvar. Em estudos subseqüentes, realizados por Della Torre e colaboradores (1978), através de microscopia eletrônica, foi demonstrada a presença de partículas típicas dos vírus no interior dos coilócitos, bem como no tecido obtido de lesões condilomatosas. Em estudos posteriores, Kurman, Jenson & Lancaster (1983), empregando técnicas de imunohistoquímica, detectaram a presença de determinantes antigênicos do HPV no núcleo dessas células. Como a presença de partículas virais e dos antígenos de capsídio é descrita em alguns, mas não em todos os coilócitos, embora seja geralmente aceito, que essas células representam as alterações morfológicas causadas pelos vírus no epitélio infectado, esta característica não deve ser tomada, de forma isolada, como indicativo de infecção por HPVs. Este fato implica em uma séria limitação ao diagnóstico

da infecção por esses vírus, baseado apenas no exame citomorfológico de Papanicolaou (VILLA, 1995b; VINCE *et al.*, 2001).

2.3. Os co-fatores envolvidos na infecção pelo HPV

A infecção do epitélio da cérvix uterina por HPVs, é um evento muito freqüente entre as mulheres sexualmente ativas, podendo ocorrer infecções simultâneas por mais de um tipo desses vírus. A prevalência de co-infecção é maior em mulheres com alterações citológicas e diminui com o aumento da idade das pacientes (ROUSSEAU *et al.*, 2001; ROUSSEAU *et al.*, 2003). O curso natural da infecção pelo HPV, sofre influência de fatores intrínsecos dos vírus e do hospedeiro, além de fatores físicos, químicos e ambientais (VILLA, 1997; MUÑOZ, 2000), sendo que a maior parte dessas infecções é transitória e provavelmente, de pouco significado clínico, evoluindo para a cura espontânea após o período de um ano (VILLA, 1997; SELLORS *et al.*, 2003). Assim, o maior interesse reside, na pequena proporção de mulheres portadoras da infecção persistente da cérvix uterina, por HPVs de alto risco, as quais apresentam maior probabilidade de progressão para lesões cervicais dos diferentes graus, inclusive o câncer (LONDESBOROUGH *et al.*, 1996; FRANCO *et al.*, 1999a). A infecção do epitélio da cérvix uterina por HPVs de alto risco, resulta em uma complexa interação entre fatores virais e do hospedeiro, que contribui de alguma forma para transformação maligna da célula infectada (MUÑOZ, 2000 ; BOSCH & SANJOSÉ, 2003).

A progressão das lesões de baixo grau para o câncer do colo do útero parece passar por um processo contínuo e gradativo de alterações celulares pré-cancerosas, conhecidas como neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), passando pelos estágios de NIC I, NIC II e NIC III, este último, também chamado de carcinoma *in situ* (NELSON, AVERETTE & RICHART, 1984), até chegar ao câncer invasor (CAMPION *et al.*, 1986; WEBB, ROGERS & FIFE, 1987). Além disso, a progressão para o tumor, a partir de células normais infectadas por HPV depende, também, da combinação dos efeitos de múltiplos fatores, incluindo os ambientais, como é o caso de carcinógenos químicos e físicos e de fatores restritos do hospedeiro, tais como hormônios, resposta imune, herança genética e comportamento sexual da mulher e de seu parceiro (VILLA, 1997; MUÑOZ, 2000; COELHO *et al.*, 2004).

Os resultados de estudos caso-controle sugerem que fatores hormonais associados ao tabagismo (PLUMMER *et al.*, 2003), uso prolongado de contraceptivos orais (MOODLEY *et al.*, 2003), o início precoce das atividades sexual e reprodutiva,

condições sócio-econômicas, nível de instrução, infecções genitais inespecíficas e algumas deficiências nutricionais (GOODMAN *et al.*, 2001; ZIEGLER *et al.*, 2002), além de infecções concomitantes por *C. trachomatis* (ROLÓN *et al.*, 2000; MUÑOZ *et al.*, 2002; CASTELLSAGUÉ & MUÑOZ, 2003; SMITH *et al.*, 2004; HAMMOUDA *et al.*, 2004; SHIELDS *et al.*, 2004), *Trichomonas vaginalis* (SHEW *et al.*, 2006), *Candida* spp. (SCHNATZ *et al.*, 2008) e outros agentes, podem funcionar como co-fatores do câncer do colo do útero e de adenocarcinoma (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2006).

A *C. trachomatis* é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória que parasita células eucarióticas, é altamente especializada (CAVENINI *et al.*, 2002; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2006; STORNI *et al.*, 2006), estritamente patogênica para o ser humano e apresenta tropismo positivo pelo epitélio genital e conjuntival. São conhecidos 15 sorotipos distintos da espécie. Os sorotipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K são isolados, predominantemente, no trato urogenital, estando associados com DST, além de causarem conjuntivite em recém-nascidos e pneumonia do recém-nascido e de lactentes nascidos de mães infectadas (WILFERT & GUTMAN, 1986; RETTIG, 1988; TOMSON *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Armbuster-Moraes *et al.*, (2000) em mulheres gestantes, foi encontrada uma prevalência média de 48,0% de infecção por HPV, sendo o HPV16 o tipo mais freqüente, reforçando, assim, a idéia de que o hormônio progesterona pode aumentar o risco para a persistência viral e, conseqüentemente, para a transformação maligna das células infectadas pelos HPVs, especialmente o HPV16. Muitos desses co-fatores, embora não sejam determinantes, podem estar relacionados ao aumento da susceptibilidade do hospedeiro às infecções por HPV, como resultado de alterações da resposta imune a vírose (ROCK *et al.*, 2000; FERENCZY & FRANCO, 2002). Além disso, algumas características genéticas tais como a ocorrência de polimorfismo nos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e no gene da proteína supressora de tumor p53, códon 72 parecem estar associados com maior ou menor susceptibilidade a carcinogênese da cérvix uterina mediada pela infecção por HPV (SOUZA & VILLA, 2003).

2.4. Diagnóstico laboratorial do HPV

Durante muito tempo o diagnóstico da infecção pelo HPV foi uma tarefa muito difícil devido a grande dificuldade na realização de culturas de células e pelo baixo desempenho dos testes imunológicos para detecção de antígenos virais (SCHIFFMAN *et al.*, 1991). Por esse motivo, o diagnóstico da infecção pelo HPV através da técnica de Papanicolaou se tornou o único método disponível para o diagnóstico das neoplasias da cérvix uterina. Essa técnica se baseia na detecção de células com morfologia alterada obtidas da mucosa cervical por meio de raspado ou biópsia (SHERMAN *et al.*, 2003).

O exame citológico de Papanicolaou é de grande importância como teste de triagem, tendo em vista a sua grande abrangência, baixo custo e facilidade de execução, constituindo-se um recurso indispensável para o diagnóstico das lesões da cérvix uterina. No entanto, esse método apresenta uma grande desvantagem: a porcentagem de resultados falso-negativos varia de 15 a 50%, além de percentuais de cerca de 10% de resultados falso-positivos (COPPELSON & BROWN 1974; FRANCO, 2003). Assim, a sensibilidade média da citologia para a detecção de NIC e câncer do colo do útero é muito baixa (50 a 85%) e a especificidade é de aproximadamente 90%. A falta de sensibilidade desse método é compensada pela repetição do procedimento após pequenos intervalos de tempo (IARC Working, 1996).

Além da citologia, outros métodos vêm sendo empregados objetivando demonstrar a participação do HPV em lesões genitais, como por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do genoma viral (ROMAN & FIFE, 1989). Outras técnicas podem também detectar o genoma viral, como aquelas de hibridização “*in situ*” e de hibridização em superfície sólida (Southern blot) (CRUM *et al.*, 1996; MECANCE *et al.*, 1986), porém esses métodos requerem uma grande quantidade ou de produtos gênicos ou do DNA viral para o diagnóstico e se tornam, dessa forma, desvantajosos (THAM *et al.*, 1991).

A descoberta da técnica de PCR permitiu fazer a detecção de um amplo espectro de HPVs genitais de uma maneira relativamente simples, possibilitando a detecção do DNA viral em amostras de tecidos normais ou com diversos tipos de lesão (IMPRAIM *et al.*, 1987; SHIBATA, MARTIN & ARNHEIM, 1988; WRIGHT & MANOS, 1990. Por meio dessa técnica, utilizando-se um par de iniciadores que reconheçam uma seqüência específica de um DNA alvo, realizando-se de 30 a 40 ciclos de síntese, teoricamente, é possível amplificar essa seqüência em cerca de 10^{10} a 10^{12} vezes

(CHOW, THAM & TAY, 1990). Tendo em vista sua maior sensibilidade e especificidade (MANOS *et al.*, 1989; VAN DEN BRULE *et al.*, 1990, FINAN *et al.*, 2001), vários laboratórios passaram a adotar a PCR como metodologia de escolha para estudos epidemiológicos da infecção por HPV e do câncer do colo do útero (SCHIFFMAN, 1992).

Pelo fato de existir um grande número de HPV tornou necessário o estabelecimento de novos protocolos baseados na PCR (SCHIFFMAN *et al.*, 1991, FINAN *et al.*, 2001). O problema da variedade ou heterogeneidade de tipos virais foi reduzido pela introdução de um protocolo voltado para a amplificação de um segmento do gene L1 que apresenta seqüência de nucleotídeos extremamente conservada entre todos os tipos de HPVs genitais (MANOS *et al.*, 1989). Neste contexto, a amplificação dos tipos de HPVs mais relevantes, tornou-se possível, em uma única reação, devido ao uso de um par de iniciadores genéricos capazes de reconhecer essa seqüência consenso, (VILLA *et al.*, 1995; JACOBS *et al.*, 1995; DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995). Este procedimento é seguido por uma segunda amplificação utilizando-se iniciadores específicos para cada tipo de vírus, ou alternativamente, fazendo-se a hibridização com sondas de oligonucleotídeos, específicas para cada tipo, marcadas com biotina ou com isótopos radioativos para a identificação dos tipos de HPV infectantes (BAUER, GREER & MANOS, 1992; VILLA *et al.*, 1995). Mais recentemente esse espectro foi ainda mais ampliado, com a introdução do sistema PGM9/11, que consiste de uma mistura de iniciadores degenerados que têm como alvo uma região do gene L1, que permite amplificar até 51 tipos de HPVs (GRAVITT *et al.*, 2000). Uma desvantagem dessa abordagem é, não apenas a necessidade de se dispor de um grande número de iniciadores ou de sondas específicas para os vários tipos do vírus, mas também, pelo fato de algumas variantes dentro de cada tipo não serem detectadas (VILLA *et al.*, 1995).

2.5. A Infecção pelo HPV e o Câncer do colo do útero

O câncer de colo do útero (CCU) é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres (JIN; CASH; KENNEDY, 1999), com aproximadamente 500 mil novos casos por ano no mundo e leva à óbito cerca de 230 mil mulheres por ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior nos países em desenvolvimento quando comparado com os desenvolvidos. Estima-se 19 mil novos casos de CCU no Brasil, para os anos de 2008 e 2009, com um risco estimado de 19 casos para cada 100 mil mulheres. As maiores taxas

são observadas para as regiões Sul e Norte e as menores para as regiões Sudeste e Nordeste (INCA, 2007) (Figura 04).

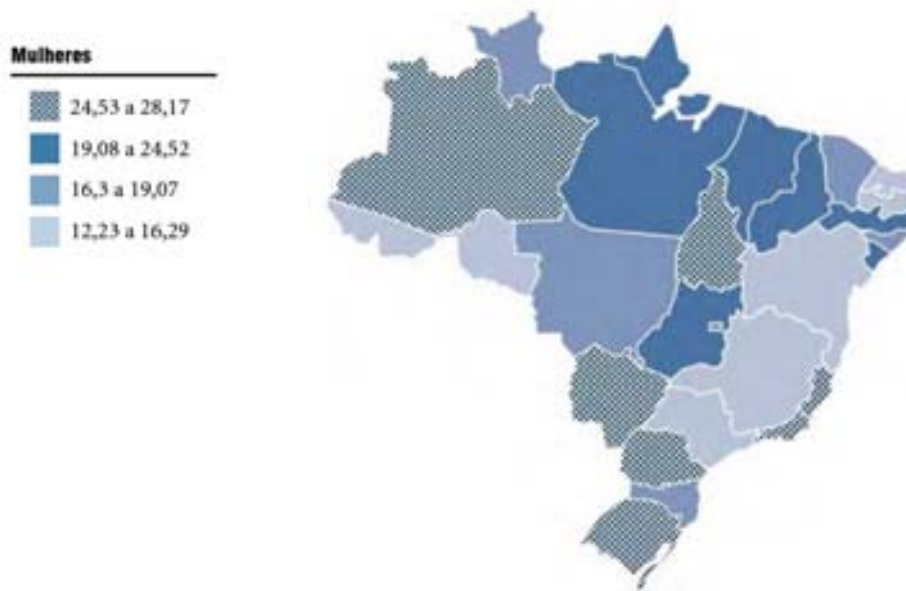


Figura 04 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação, para neoplasia maligna do colo do útero (Adaptado de INCA, 2007).

O CCU está fortemente associado a infecção da cérvix uterina pelo HPV de alto risco. Essa ligação entre a infecção genital pelo HPV e o câncer do colo uterino foi primeiro demonstrada por Harold zur Hausen, um virologista alemão e, atualmente, a magnitude dessa associação é maior que a relação entre o fumo e o câncer de pulmão (FRANCO *et al.*, 1995). Atualmente o HPV de alto risco é considerado causa necessária, embora não suficiente, para o câncer do colo de útero, estando presente em virtualmente todos os casos dessa patologia (TROTTIER; FRANCO, 2006; MUÑOZ, 2006). Desta forma não restam mais dúvidas do envolvimento desses tipos de HPVs no desenvolvimento do câncer do colo uterino tendo em vista que seqüências de seu genoma têm sido detectadas nas células de mais de 98% dos casos desse tipo de tumor, quando utilizadas técnicas suficientemente sensíveis (CASTELLSANGUÉ; MUÑOZ, 2003; SCHIFFINAN; KJAER, 2003; VILLA, 2003; MONSONEGO *et al.*, 2004; CUSCHIERI; CUBIE, 2005).

Estima-se que a infecção por HPV de alto risco seja responsável por 85% do câncer anal; 50% do câncer de vulva, vagina e pênis; 20% do câncer da orofaringe; e

10% dos cânceres de laringe e esôfago e por praticamente, 100% dos casos de câncer do colo do útero (SPENCE; FRANCO; FERENCZY, 2005) (Figura 5).

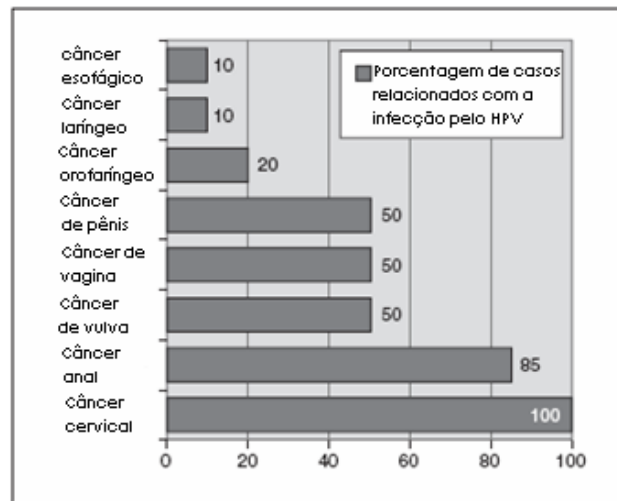


Figura 05 – Infecção por vírus do Papiloma humano e câncer. Porcentagem de casos relacionados com a infecção por HPV (Adaptado de TORRES *et al.*, 2006).

O câncer do colo uterino é o terceiro tipo mais freqüente de câncer que acomete mulheres em todo o mundo, sendo precedido pelos cânceres de pele não melanômicos e de mama (JIN; CASH; KENNEDY, 1999; INCA, 2007). Tem sido demonstrado que mulheres com espécimes cervicais positivos para o DNA de HPVs de alto potencial oncogênico, têm risco de desenvolver câncer do colo do útero de 15 a 50 vezes maior, quando comparadas àquelas sem a presença do DNA do vírus (TACHEZY *et al.*, 2003). Mulheres com mais de 35 anos são mais acometidas por câncer cervical, sugerindo uma infecção precoce, porém uma lenta progressão para o câncer (BURD, 2003).

O câncer do colo uterino representa mais de 25% de todos os casos de câncer em mulheres nos países desenvolvidos (HARRO *et al.*, 2001). Entretanto, nos países em desenvolvimento, essa incidência é maior, especialmente na América Latina (ALEIXO NETO, 1991; PARKIN *et al.*, 1992). O Brasil é considerado uma das áreas de alto risco para o câncer do colo uterino. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), só no ano de 2006 foram registrados 19.260 novos casos de câncer uterino no país.

O reconhecimento mundial do papel dos HPVs de alto risco na etiologia do câncer levou ao desenvolvimento de uma vacina profilática que tem como principal objetivo a prevenção do câncer do colo do útero. Essa vacina, composta pela proteína L1 do capsídio do HPV 16 e 18, tem demonstrado quase 100% de eficácia contra a infecção

persistente e lesões pré-malignas causadas por esses vírus. A primeira vacina licenciada em 2006 pela Merck Sharp and Dohme® foi registrada pelo nome comercial Gardasil e a segunda desenvolvida em 2007, ainda em fase de licenciamento pela Glaxo Smith Kline®, é conhecida como Cervarix (ADAMS *et al.*, 2007). Ambas as vacinas são compostas por VLPs (*Virus Like Particles*) estruturas semelhantes ao vírus formadas pela proteína L1, porém sem o genoma viral, combinadas com um adjuvante, e que são sintetizados em laboratório por cultura de células (LINHARES & VILLA, 2006).

A Gardasil ® é uma vacina quadrivalente composta por VLPs dos HPVs 6, 11, 16 e 18 associados a um adjuvante de sulfato de alumínio, que é produzida por tecnologia do DNA recombinante, usando como vetor de expressão o genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa vacina é administrada por injeções via intramuscular de 0,5mL em três doses, dentro de um período de seis meses (primeiro dia, segundo mês e sexto mês). Ela tem sido testada em 33 países com pessoas de diferentes etnias, comportamento sexual e que possuam outras infecções concomitantes, somando-se mais de 30.000 participantes, e tem apresentado 100% de eficácia (VILLA, 2007). A Cervarix ® é uma vacina bivalente composta por VLPs dos HPVs 16 e 18, que também usa o adjuvante sulfato de alumínio mas é produzida em cultura de baculovírus. A sua estratégia vacinal é semelhante aquela da Gardasil ® (HARPER, 2008).

2.6. Diagnóstico citológico

Segundo o INCA considera-se que anualmente ocorram no Brasil cerca de 17 mil novos casos de câncer do colo, com uma taxa de mortalidade estimada em 4 mil casos (INCA 2003). Muito se tem evoluído em estudos na procura de novas tecnologias para diagnóstico de lesões com potencial evolutivo para o carcinoma escamoso, tais como teste para detectar o DNA-HPV, dentre outros (CAVALCANTI *et al.*, 1997; CARTA *et al.* 1999; TUON *et al.*, 2002), mas segundo a Organização Panamericana de Saúde o exame de Papanicolaou é ainda considerado a ferramenta por excelência para o diagnóstico precoce das neoplasias do colo do útero, tendo em vista o baixo custo e a facilidade de execução, o que permite uma ampla utilização (GAMARRA *et al.*, 2005).

O exame de Papanicolaou ou colpocitologia oncológica atualmente é normatizado em todo o mundo pelo Sistema Bethesda em sua última versão de 2001 e adaptada no Brasil pela Nomenclatura Brasileira para Liberação de Laudos dos Exames Citopatológicos de 2002 (NB, 2002), onde são consideradas: as lesões ou anormalidades epiteliais escamosas ou atípicas em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US); as

atipias em células escamosas de significado indeterminado em que não é possível descartar lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (ASC-H); as lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL); as lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e o carcinoma escamoso. Entre as atipias glandulares são consideradas aquelas de significado indeterminado e o adenocarcinoma (*in situ* e invasor) (ELEUTÉRIO JR & ALMEIDA., 2000; ELEUTÉRIO., 2001).

Por ser o exame citológico um método presuntivo, tem sido uma constante a preocupação com seu controle de qualidade. E um dos melhores parâmetros para avaliar a eficácia do método é a sua correlação com os achados histopatológicos de biópsias (CAVALCANTI *et al.*, 1997, MASSAD *et al.*, 2001; TUON *et al.*, 2002; MASSAD & COLLINS, 2003) e a colposcopia (PARHAM *et al.*, 1991; CARTA *et al.*, 1999, GONZALES SANCHEZ *et al.*, 2003). Tem sido observado por diversos autores que a sensibilidade da citologia oncótica convencional pode variar de 50 a 95%, com uma correlação histológica entre 70 a 85% (MASSAD *et al.*, 2001; TUON *et al.*, 2002).

Diferentes estudos mostraram correlação entre a diminuição da mortalidade por câncer do colo do útero e a realização do Exame de Papanicolaou (ROBLES *et al.*, 199; ISLA, 2002; GAMARRA *et al.*, 2005). Tanto o diagnóstico precoce quanto o controle dessas neoplasias baseiam-se, há mais de 40 anos, na observação de alterações morfológicas de esfregaços cervicais estabelecido pelo médico greco-americano George Papanicolaou, seu inventor. No Brasil, esse exame está disponível na rotina do sistema único de saúde (SUS) desde 1989 como parte do programa de controle de câncer de colo de útero.

Segundo a Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (2002) o diagnóstico da infecção por HPV leva em conta os dados da história da paciente, exame físico e exames complementares como a pesquisa direta do vírus (pela técnica de PCR, por exemplo) ou ainda pela detecção indireta da presença do vírus através da visualização das alterações provocadas pela infecção nas células e no tecido cervical. Geralmente, o diagnóstico é feito através da clínica, quando as lesões se apresentam visíveis, e confirmado através do exame colposcópico ou anatomopatológico, algumas substâncias como ácido acético e o iodo podem ser usados e auxiliam no diagnóstico (ISOLAN, 2004). Entretanto, na fase inicial essa patologia raramente produz sintomas; secreções, sangramento após relação sexual ou sangramento irregular ocorrem na fase mais avançada da doença (GREENWOOD *et al.*, 2006).

Os primeiros estágios detectados pelo exame citológico são as alterações nas células do epitélio. Trata-se de uma lesão precursora de baixo grau, facilmente tratável, e

com grande possibilidade de regredir. Neste estágio, as alterações histológicas estão limitadas à superfície epitelial e o tratamento cirúrgico é curativo em 100% dos casos. Na ausência do tratamento, uma parte delas, entre 30% a 40%, evolui para lesões de alto grau, um precursor do câncer, com poucas chances de regressão (MARTINS *et al.*, 2005).

A utilização de testes de biologia molecular para detecção do HPV, por ser uma técnica cara e mais demorada, vem sendo empregado como técnica adjuvante ao Papanicolaou na identificação de mulheres com maior risco de desenvolver as atipias e o câncer cervical, e para a identificação dos genótipos do vírus bem como para a classificação de acordo com o potencial oncogênico (SANTOS *et al.*, 2004). Entretanto, na forma latente, utiliza-se a biologia molecular, que complementa o diagnóstico na forma clínica e subclínica (ISOLAN, 2004).

No Papanicolaou a coleta de material ectocervical é efetuada com a espátula de Ayres e a coleta de material endocervical é realizada com uma escova endocervical.

O material coletado é espalhado de maneira uniforme sobre uma lâmina de microscopia, previamente identificada, e imediatamente fixado, para evitar a dessecação e deformação das células. O fixador citológico utilizado pode ser líquido, como álcool etílico 70 a 90%, ou aerosol contendo álcool isopropílico e polietileno glicol (Carbowax®). Após a fixação do material é realizada a coloração citológica pela técnica de Papanicolaou e procedida a leitura da lâmina para identificação citológica (GOMPEL; KOSS, 1997; MCKEE, 1997; KURMAN; SOLOMON, 1997; SCHNEIDER; SCHNEIDER V, 1998; DEMAY, 1999).

2.7. O programa de Controle do Câncer do Colo do Útero

No Brasil, o programa de controle do câncer de colo do útero foi implantado em 1984, no âmbito do Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher (PAISM), e se baseia na estratégia de rastreamento pelo teste de Papanicolaou. O principal objetivo dos programas de controle do câncer cérvico-uterino é detectar lesões cervicais neoplásicas pré-invasoras e invasoras e identificar mulheres com alterações celulares que indiquem risco de desenvolver ou já ter desenvolvido o câncer da cérvix uterina (SANTOS *et al.*, 2004).

Em 1996, o Ministério da Saúde, por meio do INCA, Implementou o Programa “Viva Mulher”, envolvendo cinco capitais brasileiras e um estado, tendo como população-alvo, mulheres na faixa etária de 25 aos 59 anos. Em 1998, as ações do “Viva Mulher” foram

estendidas a todos os municípios brasileiros por meio de uma campanha nacional. Tal programa consiste no desenvolvimento e na prática de estratégias que reduzem a mortalidade e as repercussões físicas, psíquicas e sociais do câncer de colo do útero e de mama. Portanto, são oferecidos serviços de prevenção e detecção precoce em estágios iniciais da doença, assim como tratamento e reabilitação em todo o território nacional (NOVAIS *et al.*, 2006).

Desde então, tem-se observado crescente ampliação da oferta de exames citopatológicos no país: antes de 1998 o número de exames realizados não ultrapassava 7 milhões por ano. Em 1998, ano em que houve a campanha, esse número passou para 10,3 milhões. De 1999 a 2001 foram processados na rotina, em média, 7,8 milhões por ano e em 2002, ocorreu uma nova intensificação da oferta de exames visando aumentar a sua cobertura, resultando em 12,2 milhões de exames; no período de 2003 a 2004 foram realizados na rotina, em média, 10,4 milhões de exames por ano (MARTINS *et al.*, 2005). Outras campanhas foram realizadas nos anos de 2005/06.

Em todo o território Brasileiro, no ano de 1998, segundo dados do Ministério da Saúde, o SUS registrou que apenas 550 mil mulheres foram submetidas à coleta da citologia de Papanicolaou por mês. No entanto, durante o programa elevou-se à marca da coleta de exames citológicos para 3,263 milhões, em apenas 45 dias. Foram identificadas, nesse universo, 1,2 milhão de mulheres com algum tipo de infecção genital e 53,9 mil mulheres com CCU. Do total dos casos positivos para câncer, 49,2 mil estavam no estágio inicial da doença ou com alguma lesão precursora e 4,7 mil mulheres encontravam-se em estágio de câncer invasivo. A importância do programa pode ser avaliada pela quantidade de diagnósticos da doença no estágio inicial, já que nessa fase o CCU tem cura em 100% dos casos (NETO *et al.*, 2001).

Em países onde a citologia oncológica foi ampliada para a maior parte da população, observou-se uma diminuição importante da incidência e mortalidade por esse tumor. No entanto no Brasil, apesar da implantação do programa da mulher e da ampliação da cobertura do exame de Papanicolaou, não tem havido redução das taxas de incidência e de mortalidade do CCU tendo a taxa de mortalidade aumentada nas últimas décadas de 3,44/100 mil mulheres, em 1979, para 4,59/100 mil, em 2000 (AMORIM *et al.*, 2006). Isso pode ser explicado pelo fato de que, apenas uma fração muito pequena, não superior a 15%, da população feminina brasileira está envolvida em um programa de prevenção do CCU.

No entanto, mesmo em países desenvolvidos, com a cobertura da população por programas de prevenção, existe uma porcentagem importante de mulheres que continuam sucumbindo à doença devido a falhas do teste de Papanicolaou (LINHARES & VILLA, 2006). A limitação do acesso aos serviços de saúde, por barreiras sócio-econômicas, culturais, e geográficas também se apresenta como responsável pela baixa cobertura dos exames de citologia oncológica, sendo um problema a ser enfrentado pelos gestores do programa de controle do câncer de colo de útero (AMORIM *et al.*, 2006).

Atualmente, segundo Merighi *et al.*, (2002), o controle do câncer de colo uterino constitui a sexta prioridade do pacto pela Vida do MS (2006). Entre os resultados positivos do programa, tem-se o número de exames realizados, atribuído em especial às campanhas, a padronização de procedimentos, a expansão da atividade para todas as unidades federadas, a intensificação da informação sobre a doença para as mulheres, a introdução e atual disponibilização da cirurgia ambulatorial e da estratégia de segmento. Embora os inquéritos de avaliação tenham mostrado ampliação do acesso às ações do programa em todas as capitais, no Brasil a prevenção do câncer não recebe atenção caracterizada por ações educativas. Esta situação é consequência da falta de conscientização da população sobre a importância do diagnóstico precoce e da falta de definição dos serviços de saúde sobre o caminho a ser seguido pela mulher, desde a primeira queixa até o diagnóstico e o tratamento especializado (MERIGHI *et al.*, 2002).

Os problemas ainda presentes incluem o custo do programa, que é crescente em todas as esferas do SUS, as diferenças regionais quanto ao acesso e à qualidade das ações e a capacitação ainda insuficiente das equipes do Programa de Saúde da Família (PDF) para a execução de ações do programa. As metas para o período de 2005 a 2007 são: o aumento da cobertura e da qualidade dos exames, a capacitação de pessoal e a mobilização social. Portanto, as diferenças observadas na mortalidade por CCU entre os países em desenvolvimento e os desenvolvidos, podem ser atribuídas diretamente ao fato de se fazer ou não o exame preventivo, uma vez que nos países em desenvolvimento os programas de rastreamento são pouco desenvolvidos e persistem limitações ao acesso das mulheres aos serviços de saúde.

Ainda existem mulheres que não fazem o exame de Papanicolaou, desconhecem a razão pela qual ele é feito e que não estão orientadas quanto à periodicidade do mesmo. Dessa forma fica clara a importância do empenho dos profissionais de saúde, para garantir a adesão da mulher ao programa preventivo do câncer cérvico-uterino. Muitos são os fatores determinantes, sendo que um deles é o pouco conhecimento que se tem

sobre a relação da mulher com a prevenção desta doença, independente ou não da qualidade dos serviços de saúde. Assim sendo, acredita-se que somente uma equipe de saúde humanizada poderá desenvolver com a mulher uma relação intersubjetiva e levando em conta suas bagagens social, cultural, familiar e religiosa (MERIGHI *et al.*, 2002).

Como resultado da atuação do programa e da ampliação do rastreamento por meio do exame de Papanicolaou tem sido observado, nos últimos anos, uma maior detecção das formas *in situ* e redução da proporção de formas invasoras, o tratamento nessa fase da doença é extremamente eficaz. No entanto, essas ações todas geram custos assistenciais elevados, decorrentes de consultas médicas, exames laboratoriais, biópsias e tratamentos medicamentosos, quimioterápicos, radiológicos e cirúrgicos, tudo isso deve ser considerado quando se analisa a possibilidade da oferta de vacina pelo SUS (REALATÓRIO DO SENADO FEDERAL, 2007). Dessa forma, o ideal é que o diagnóstico seja feito em fase precoce das lesões, quando o tratamento é mais eficaz e de menor custo. Assim, a alta incidência do carcinoma de células escamosas do colo do útero é uma consequência da eficiência dos programas de controle e tratamento, da doença, adotados em países como o Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Analisar a prevalência do HPV e da *Chlamydia trachomatis* em mulheres sexualmente ativas, do município de São José do Mipibu–RN, em função das características sócio-demográficas da população estudada visando identificar fatores de risco para a infecção por esses patógenos e suas relações com alterações citológicas.

3.2. Objetivos específicos:

- Detectar a presença do HPV e da *C. trachomatis* em espécimes cervicais de mulheres do município de São José de Mipibu com citologia normal e com diferentes graus de lesões da cérvix uterina.
- Investigar a influência de outros fatores de risco para a infecção por HPV e o desenvolvimento das lesões dela decorrentes.
- Avaliar os conhecimentos, atitudes e prática das mulheres do município de São José do Mipibú em relação ao exame citológico de Papanicolaou.
- Propiciar a obtenção de informações a respeito do perfil epidemiológico da infecção por HPV na comunidade, possibilitando aos profissionais que atuam na área de saúde do município, a adoção de medidas de prevenção mais efetivas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em duas etapas com abordagens distintas. A primeira constou de um inquérito domiciliar visando avaliar o conhecimento atitude e prática das mulheres das áreas urbana e rural do município de São José de Mipibu/RN em relação ao exame preventivo de Papanicolaou. A segunda trata-se de um estudo de prevalência da infecção por HPV e sua relação com a ocorrência de lesões da cérvix uterina e fatores de risco associados. Na primeira etapa foram analisados dados obtidos apenas por meio de entrevista domiciliar. A segunda envolveu a participação de mulheres diferentes da primeira e as participantes foram abordadas ao se dirigirem às unidades de saúde do mesmo município para realizar o exame de Papanicolaou. Neste caso além da entrevista, de cada mulher foram coletados dois espécimes da cérvix uterina a serem submetidos à análise laboratorial.

Essa pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Apêndice I).

4.1. ETAPA I

4.1.1. Inquérito domiciliar

Foi realizada uma pesquisa descritiva com abordagem quantitativa, realizada por meio de um inquérito domiciliar, envolvendo 267 mulheres dos diferentes distritos da área rural e bairros da área urbana do Município de São José do Mipibú/RN, todas consideradas de classe sócio-econômica baixa, com idade variando entre 15 e 69 anos, selecionadas por meio de amostragem aleatória simples e arroladas entre o período de março e setembro de 2007. Para a realização da pesquisa foi solicitada autorização prévia à Secretaria de Saúde do município, a qual foi concedida. O processo de abordagem ocorreu por meio de contato direto através de uma visita domiciliar, durante o qual as mulheres foram informadas sobre o objetivo da pesquisa e a forma de sua participação. Após os esclarecimentos necessários e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, procedeu-se à coleta de dados sobre as características sócio-demográficas além de informações destinadas a avaliação dos graus de conhecimento, atitude e prática das mulheres em relação ao exame citológico de Papanicolaou. Para isso, realizou-se uma entrevista utilizando-se um questionário

estruturado (Anexo II), o qual foi elaborado fazendo-se, algumas adaptações às perguntas de questionários aplicados em estudos semelhantes realizados anteriormente. Para a análise dos dados, obtidos foram adotadas as seguintes definições:

4.1.1.1. Conhecimento sobre o exame citológico de Papanicolaou

- Considerou-se ter conhecimento adequado, as mulheres que afirmaram saber da existência do exame e que o mesmo serve para prevenir câncer em geral, ou especificamente o câncer de colo do útero.
- Considerou-se ter conhecimento inadequado, aquelas que responderam, nunca ter ouvido falar do exame, ou que já ouviu falar, mas não sabe para que serve.

4.1.1.2. Atitude sobre o exame de Papanicolaou

- Considerou-se ter atitude adequada, as mulheres que responderam, espontaneamente, que consideram importante ou necessária à realização do exame para prevenir, câncer em geral, ou quando se referiram especificamente ao câncer do colo do útero.
- Considerou-se ter atitude inadequada, as mulheres que responderam que não consideram importante ou que não é necessário à realização do exame ou ainda, que não tenha opinião sobre a importância de fazê-lo.

4.1.1.3. Prática em relação ao exame citológico de Papanicolaou

- Considerou-se como prática adequada, as mulheres que responderam que fazem o exame uma vez por ano ou que realizaram pelo menos uma vez nos últimos três anos e que vão continuar fazendo.
- Considerou-se como prática inadequada, as mulheres que responderam, nunca terem feito o exame, ou que já fizeram, mas deixaram de fazê-lo a mais de três anos.

4.1.1.4. Análise Estatística

Tanto a estatística descritiva quanto os testes de associação dos dados para avaliação sobre conhecimento, atitudes e práticas a respeito do exame de Papanicolaou

foram realizadas por meio de χ^2 (qui-quadrado), utilizando o Programa Statística 7.0.® O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

4.2. ETAPA II

4.2.1. Obtenção das amostras.

Foram coletados dados epidemiológicos e espécimes cervicais de mulheres maiores de 14 anos de idade e sexualmente ativas, excluindo-se as grávidas, as que tiveram parto ou aborto a menos de dois meses e as que fizeram histerectomia. De cada mulher, foram coletadas duas amostras da ecto e endocérvice, com escova, uma para o exame citológico de Papanicolau e outra para detecção do DNA do HPV, mantida em PBS contendo vancomicina e 25U/ml de nistatina. As mulheres que concordaram, responderam a um questionário padronizado para identificação de fatores de risco para infecção por HPV (Anexo IV). Conforme determinado por análise estatística baseada em dados da população (censo IBGE 2005), uma amostra representativa da população consiste de 605 pacientes entre positivas e negativas para DNA de HPV.

4.2.2. Extração do DNA das células cervicais

Os tubos contendo as escovas foram agitados em vórtex para remoção das células aderidas às cerdas da escova, esta última foi em seguida retirada e os tubos submetidos à centrifugação a 4000rpm por 10 min, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em PBS sem antibiótico. Os tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 384 μ L de tampão de lise (SDS 0,1%, Tris HCl 10 Mm pH, EDTA 1 mM pH 8,0) e transferido para um tubo de 1,5 mL estéril, onde foram adicionados 12 μ L de proteinase K 5 mg/mL e mantido em incubação por 3 horas a 55°C para em seguida ser aquecido a 95°C por 10 min. Em temperatura ambiente foram adicionados 4 μ L de RNase na concentração final de 100 μ g/mL e depois incubado a 37°C durante 40 minutos. Foram adicionados 200 μ L de acetato de amônio 5M, e os tubos foram agitado 50x por inversão e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 10 min a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e adicionado igual volume de Isopropanol P.A, gelado. O tubo foi agitado 50x por inversão e incubado por uma noite a -20°C. No dia seguinte os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C. Desprezamos o sobrenadante e adicionamos 600 µL de Etanol a 70%, gelado. O DNA foi ressuspensão por inversão e centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado novamente e os tubos foram deixados abertos e invertidos sobre papel toalha por 15 min para secar. Após secagem, foram adicionados aos tubos 50 µL de água MilliQ estéril e foram incubados a 65°C por 15 min para dissolução do DNA. Em seguida foram estocados a -20°C até o momento da análise.

A qualidade do DNA foi avaliada através da amplificação de uma seqüência do gene da beta-globina humana usando os iniciadores PCO3+/PCO4+ (SAIKI *et al.* 1985). Todas as amostras positivas para β-globina foram testadas quanto à presença de DNA do HPV e da *Chlamidia trachomatis*.

4.2.3. Análise por PCR para β-globina HPV e *C. trachomatis*

A qualidade do DNA foi avaliada pela amplificação de uma seqüência do gene da beta-globina e de um plasmídeo existente na *C. trachomatis*, usando os iniciadores PCO3+/PCO4+ e CP24/CP27 respectivamente (SAIKI *et al.* 1985) em um termociclador da Marca MJ Research. As condições da reação foram: um passo inicial de desnaturação por 4 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de um minuto a 95°C para desnaturação, um minuto a 50°C para anelamento e um minuto a 72°C para extensão. Foi realizado um último passo de 10 minutos a 72°C para extensão final. Todas as amostras positivas para β-globina foram testadas quanto à presença de DNA do HPV usando os iniciadores GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN *et al.* 1995). As condições da reação foram: um passo inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de um minuto a 95°C para desnaturação, dois minutos a 45°C para anelamento e um minuto e 30 segundos a 72°C para extensão. Foi realizado um último passo de 10 minutos a 72°C para extensão final. Para cada reação, utilizou-se DNA extraído de células HeLa, uma linhagem celular derivada de câncer de colo do útero que possui o DNA do HPV18 como controle positivo, DNA de células C33, uma linhagem celular negativa para HPV e água como controles negativos da reação. O resultado foi visualizado após eletroforese vertical em gel de poliácridamida a 8%, em tampão TBE (SAMBROOK *et al.*,1992), e coloração pela prata (SANGUINETTI *et al.*,1994).

4.2.4. Análise estatística

Para os parâmetros de prevalência e associação da infecção pelo HPV e cofatores, a análise de significância estatística foi realizada por meio do teste de χ^2 (qui-quadrado) simples empregando o programa *Sistema R* (sistema livre), para cálculos de razões de chance (RC), com seus respectivos intervalos de confiança (IC) e valor de probabilidade (p). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p \leq 0,05$.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; JASANI, B.; FIANDER, A. Human papilloma virus (HPV) prophylactic vaccination: Challenges for public health and implications for screening. **Vaccine**, 25 3007–3013. 2007.
- ALEIXO NETO, A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, 25: 326-333, 1991.
- ALENCAR, T.R. *et al.* New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. **Virus Genes**. 35:1–4. 2007.
- BASEMAN, J.G.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, 32S: S16 - S24, 2005.
- BOSCH, F.X. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**. 87:786-802, 1995.
- BOSCH, F.X.; SANJOSÉ. S. Chapter 1: Human papillomavírus and cervical cancer-burden and assessment of casuality. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 31: 3 –13, 2003.
- CARTA, G. *et al.* Colposcopy, cytology and histology in the diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Clin Exp Obstet Gynecol**. 26(2):60-6. 1999.
- CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavírus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 31: 20 –28, 2003.
- CASTELLSAGUÉ, X. *et al.* Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention. **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 98, No. 5, March 1, 2006.
- CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; OLIVEIRA, L.H.S. Infecções causadas por Papilomavírus humanos: correlação com colposcopia, citologia, histopatologia e hibridização *in situ*. **J Bras Patol**. 33:62-9. 1997.
- CAVENINI, R.; DONATI, M.; SAMBRI, V. Chlamydia trachomatis – the agent. **Breast Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. v.16, n.6, p.761-773, 2002.
- CERQUEIRA, D.M. *et al.* New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. **Virus Genes** (2008) 37:282–287
- CHINCHAREON, S. *et al.* Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, 90:50-57, 1998.
- COGLIANO, V. *et al.* Carcinogenicity of human papillomaviruses. **The lancet**, 6 (4): 2004, 2005.
- CRUM, C.P. *et al.* In situ hybridization analysis of HPV DNA sequences in early cervical neoplasia. **American Journal Pathology**, 123: 174-182, 1996.

CUSCHIERI, K.S.; CUBIE, H.A. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. **Journal of Clinical Virology**, 32S: S34 –S42, 2005.

DE RODA HUSMAN, A.M. *et al.* The use of general primers GP5/GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequence improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, 76:1057-1062, 1995.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol** 32 Supp. 1: S7 – 15, 2005.

ELUF-NETO, J. *et al.* Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal Cancer**, 69:114-119, 1994.

ELEUTÉRIO JR, J.; ALMEIDA, G.M. Lesões limítrofes do Sistema Bethesda (ASCUS e AGUS): o que realmente significam. **Femina**. 28: 21-4. 2000.

ELEUTÉRIO, J.R.J. Bethesda 2001. Ascus: manter ou eliminar? **Femina**. 29: 543-4. 2001.

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

FERNANDES, J.V. Estudo da prevalência de infecção por papillomavirus em mulheres do Rio Grande do Norte, através da detecção do DNA viral. **Tese de Doutorado**, UFRJ, RJ, Brasil. 2004.

FISHER, S.G. Epidemiology: a tool for the study of human papillomavirus-related carcinogenesis. **Intervirol**, 37: 2-15, 1994.

FRANCO, E.L. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. **Review Infection Disease**, 13: 1195-1206, 1991.

FRANCO, E.L. *et al.* Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, 86: 1558-1559, 1994.

FRANCO, E.L. *et al.* Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **The journal of Infection Disease**, 172: 756-763, 1995.

FRANCO, E.L. *et al.* Human papillomavirus DNA in invasive cervical carcinoma and its association with patients survival: a nested case-control study. **Cancer Epidemiology Biomarker & Prevention**, 5:271-275, 1996.

FRANCO, E.L. *et al.* Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. in: Franco EL, MONSONEGO J., Editors. **New Developments in Cervical Cancer Screening and Prevention**. London (U. K.):Blackwell 14-22, 1999.

FRANCO, E.D.; FRANCO, E.L. Cancer of the uterine cervix. **BMC womens Health**. 4 suppl 1: S13, 2004.

GAHLINGER, P.M. Abramson JH. Computer programs for epidemiologic analysis: **PEPI, Stoen Mountain: USD**, 1995.

GIULIANO, A.R. *et al.* Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig-McGill HPV Natural History Study. **J. Infect Dis** 10: 108 -1516, 2003.

GOLDSCHMIDT, P. *et al.* Detection by broad-range real-time PCR assay of Chlamydia species infecting human and animals. **Br J Ophthalmol**.v.90, p.1425–1429. 2006.

GONZALEZ SANCHEZ, J.L. *et al.* Cytologic correlation between the Bethesda system and colposcopic biopsy. *Ginecol Obstet Mex.* 66:330-4. 1998.

GOODMAN, M. T. *et al.* Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism *C677T* and Dietary Folate with the Risk of Cervical Dysplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. Vol. 10, 1275–1280, 2001.

GRAVITT, P.E. *et al.* Improved amplification of genital human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, 38: 357 – 361, 2000.

HA, P.K.; CALIFANO, J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, 15 (4): 188 - 196, 2004.

HARPER , D. M. Impact of vaccination with Cervarix™ on subsequent HPV-16/18 infection and cervical disease in women 15–25 years of age. **Gynecologic Oncology**. 110, S11–S17. 2008.

HERRERO, R. *et al.* Variación Geográfica del cáncer invasor del cuello uterino en Costa Rica. **Boletín of Sanitario Panamericano**, 114: 130 – 141, 1993.

HERRERO, R. *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplásica in rural Costa Rica. **Journal of the National Cancer Institute**, 92: 464 - 474, 2000.

HERRERO, R. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 31: 47 – 51, 2003.

HOPMAN, E.H.; KENEMANS, P.; HELMERHORST, T.J. Positive predictive rate of colposcopic examination of the cervix uteri: an overview of literature. **Obstet Gynecol Surv.** Feb; 53(2):97-106. 1998.

INCA, 2007. **Estimativas 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94p. ISBN 978-85-7318-126-5.

IARC - Working Group. **IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans**, Vol. 38, Tobacco Smoking. Lyon (France):International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1996.

JENKINS, R.M.; SHERLAWJOHNSON, C.; GALLIVAN, S. Can papillomavirus testing be used to Improve cervical cancer screening. **International Journal Cancer**, 65: 768-773, 1996.

LINHARES, A. C.; VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **J Pediatr** (Rio J). 82 (3 Suppl):S25-34. 2006.

MANOS, M.M. *et al.* The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. **Cellular Molecular Diagnostic Human Cancer**. 7: 209-214, 1989.

MASSAD, L.S.; COLLINS, Y.C. MEYER P.M. Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda System. **Gynecol Oncol**. 82:516-22. 2001.

MASSAD, L.S.; COLLINS, Y.C. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. **Gynecol Oncol**. 89:424-8. 2003.

MECANCE, D.J. *et al.* 1986. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. **International Journal Cancer**, 37: 55-59, 1986.

MILLA VILLEDA, R.H. *et al.* Colposcopy and cervical biopsy in patients with routine Papanicolaou smear. **Ginecol Obstet Mex**. Jun;65:235-8. 1997.

MONSONEGO. J. *et al.* Cervical cancer control, priorities and new directions. **International Journal of cancer**, 108: 329 – 333, 2004.

MOODLEY, M.; MOODLEY, J.; CHETTY, R.; HERRINGTON, C. S. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review. **Int J Gynecol Cancer**. 13, 103—110. 2003.

MORRISON, E.A.B. Natural history of cervical infection with human papillomavirus. **Clinical Infection Disease**, 18: 172-180, 1994.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, 19: 1- 5, 2000.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, 348:518-27, 2003.

MUÑOZ, N. *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** 24 s3: s3/1 – s3/10, 2006.

NORONHA, V. *et al.* Papillomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32:235-240, 1999.

PALAZZI, M.A. *et al.* Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma. **Acta Ophthalmology Scandinavia** , 81 (4): 396 – 398, 2003.

PARKIN, D.M. *et al.* Cancer incidence in the five continents. Comparability and quality of data. **VI, IARC Scientific Publications, IARC** 173-479, 1992.

PARHAM, D.M.; WIREDU, E.K.; HUSSEIN, K.A. The cytological prediction of cervical intraepithelial neoplasia in colposcopically directed biopsies. **Cytopathology**. 2(6):285-90. 1991.

PISANI, P.; PARKIN, D.M.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. **International journal of Cancer**, 55: 891-903, 1993.

PLUMMER, R. *et al.* Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control Study. **Cancer Causes and Control** 14: 805–814, 2003.

PFISTER, H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 31: 52 – 56, 2003.

RABELO-SANTOS, S.H. *et al.* Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98: 181-184, 2003.

RETTIG, P.J. Perinatal Infections with *Chlamydia trachomatis*. **Clin Perinatol.** v.15, p.321-349, 1988.

ROLÓN, P.A. *et al.* Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. **International Journal Cancer**, 85: 486 – 491, 2000.

ROUSSEAU, M.C. *et al.* Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. **The Journal of Infectious Disease**, 184: 1508 – 1517, 2001.

ROUSSEAU, M.C. *et al.* Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. **Sexual Transmission Disease**, 30 (7): 581 – 587, 2003.

SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230:1350 –1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 Ed., **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1992.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17: 915 – 919, 1994.

SCHIFFMAN, M.H. *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, 85: 958- 964, 1993.

SCHIFFMAN, M.H.; KAJAER, S.K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 31: 14 –19, 2003.

SCHNATZ, P. F. *et al.* The Prevalence of Cervical HPV and Cytological Abnormalities in Association with Reproductive Factors of Rural Nigerian Women. **Journal of Women's Health**. v.17, n.2, 2008

SELLORS, J.W. *et al.* Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **Canada Medicine Association Journal**, 168 (4): 421 – 425, 2003.

- SHEW, M. L.; *et al.* Association of Condom Use, Sexual Behaviors, and Sexually Transmitted Infections With the Duration of Genital Human Papillomavirus Infection Among Adolescent Women. **Arch Pediatr Adolesc Med.** 160:151-156. 2006.
- SHIELDS, T.S. *et al.* A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S women exposed to oncogênico types of human papillomavirus. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 13: 1574 – 1582, 2004.
- SMITH, J.S, *et al.* *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **International Journal of Cancer**, 111: 431 – 439, 2004.
- SNIJDERS, P.J, *et al.* HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **J Pathol**, 208 (2): 152 – 164, 2006.
- STEENBERGEN, R.D. *et al.* HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **Journal of Clinical Virology**, 32S: S25 – S33, 2005.
- STORNI, E. *et al.* Comparative PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of the plasmid geneorf3 of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 48, 313–318. 2006.
- THAM, K.M. *et al.* Diagnostic sensitivity of polymerase chain reaction and southern blot hybridization for The detection of human papillomavirus DNA in biopsy specimens from cervical lesions. **American Journal of Clinical Pathology**, 95: 638-646, 1991.
- THOMSON, N. R. *et al.* *Chlamydia trachomatis*: Genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. **Genome Res.** v.18: 161-171. 2008.
- TUON, F.F.B. *et al.* Avaliação da sensibilidade e especificidade dos exames citopatológico e colposcópico em relação ao exame histológico na identificação de lesões intra-epiteliais cervicais. **Rev Assoc Med Brás.** 48:140-4. 2002.
- TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine** 24S1:S1/4-S1/15. 2006.
- VILLA, L.L. O Papel do Papilomavírus na Neoplasia Genital Feminina. In: ABRÃO, F.S. **Tratado de Oncologia Genital e Mamária.** Ed Roca, São Paulo SP, p. 39-48, 1995.
- VILLA, L.L. Human papillomavirus and cervical cancer. *Advances in Cancer Research*, Vol. 71, **Academic Press**, San Diego. p. 321-441, 1997.
- VILLA, L.L, *et al.* Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J GenVirol** 81: 2959-2968, 2000.
- VILLA, L.L, *et al.* Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference HPV 2001. **Virus Research**, 89: 163 – 173, 2002.
- VILLA, L.L. Vaccines against papillomavirus infections and disease. **Salud Publica Mexico**, 45 Suppl 3: S443 – 448, 2003.

VILLA, L. L. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. *International Journal of Infectious Diseases*. 11 (Supplement 2), S17--S25. 2007.

ZIEGLER, R. G.; WEINSTEIN, S. J.; FEARS, T. R. Nutritional and Genetic Inefficiencies in One-Carbon Metabolism and Cervical Cancer Risk. **J. Nutr.** 132: 2345S–2349S, 2002.

WALBOOMERS, J.M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, 189:12-19, 1999,

WILFERT, G.M.; GUTMAN, L.T. *Chlamydia trachomatis* infections in infants and children. **Adv Pediatr**, v.33, p.49-75, 1986.

WOODMAN CJ, *et al.* Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. **The Lancet**, 357:1831-1836, 2001.

Capítulo 2

ARTIGO 1

TÍTULO: Conhecimentos, atitudes e prática do exame de Papanicolaou entre mulheres de São José de Mipibu-RN.

AUTORES: J. V. Fernandes, S. H. L. Rodrigues, Y. G. A. S. Costa, L. C. M. Silva, A. M. L. Brito, E. D. Nascimento, P. R. M. Azevedo, T. A. A. M. Fernandes.

REVISTA: Revista de saúde Pública

SITUAÇÃO: Manuscrito enviado para publicação

Título: Conhecimentos, atitudes e prática do exame de Papanicolaou entre mulheres de São José de Mipibu-RN.

Title: Knowledge, attitudes and practice related to Papanicolau smear test among São José de Mipibu's Women

Título curto: Exame de Papanicolau em mulheres de São José do Mipibú

José Veríssimo Fernandes¹, Silvia Helena Lacerda Rodrigues¹, Yuri Guilherme Alexandre Silva da Costa¹, Luiz Cláudio Moura da Silva¹, Alípio Maciel Lima de Brito¹, Ermeton Duarte do Nascimento¹, Paulo Roberto Medeiros de Azevedo², Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes³.

1 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Sen. Salgado Filho, S/N, Lagoa Nova, CEP: 59072-970, Natal, RN, Brasil

2 - Departamento de Estatística. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Sen. Salgado Filho, S/N, Lagoa Nova, CEP: 59072-970, Natal, RN, Brasil.

3 – Departamento de Ciências Biomédicas. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Rua Atirador Miguel Antônio da Silva Neto, S/N, Aeroporto, CEP: 59607-360, Mossoró, RN, Brasil

Correspondência

Prof. José Veríssimo Fernandes

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Sen. Salgado Filho, S/N, Lagoa Nova, CEP: 59072-970, Natal, RN, Brazil. Fax: +55-84-32119210; e-mail: veris@cb.ufrn.br

Suporte Financeiro: CNPq/Ministério da Saúde – Processo 401060/05 - 5

RESUMO

OBJETIVO

Avaliar os conhecimentos, atitudes e prática das mulheres pesquisadas, frente ao exame de Papanicolaou e verificar a existência de associação entre estes comportamentos e as características sócio-demográficas, visando identificar possíveis barreiras para a realização do exame.

MÉTODOS

Realizou-se um inquérito domiciliar de natureza descritiva, com abordagem quantitativa, no qual foram entrevistadas 267 mulheres do município de São José do Mipibu/RN, selecionadas de forma estratificada aleatória. Utilizou-se um questionário contendo perguntas pré-codificadas e abertas, cujas respostas foram descritas e analisadas, quanto à adequação dos conhecimentos, atitudes e prática das mulheres, em relação ao exame de preventivo de Papanicolaou, conforme critérios previamente definidos. Foram realizados testes de associação entre as características sócio-demográficas consideradas e os comportamentos estudados, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados mostraram que, apesar de apenas 46,1% das mulheres entrevistadas terem demonstrado possuir conhecimento adequado sobre o exame, proporções de adequação significativamente maiores foram observadas em relação às atitudes e prática do exame (63,3% e 64,4%), respectivamente. O maior grau de escolaridade apresentou associação com adequação dos conhecimentos, atitudes e prática, enquanto que descuido, falta de solicitação do exame pelo médico e vergonha, se apresentaram como principais barreiras para a realização do exame.

CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam que o médico exerce um papel importante sobre os conhecimentos, atitudes e prática do exame de Papanicolaou, na comunidade pesquisada, e revelam a carência de informações sobre o objetivo do exame, suas vantagens e benefícios para a saúde de mulher.

DESCRITORES: Esfregaço vaginal. Neoplasias do colo do útero. Prevenção de Câncer de Colo Uterino

ABSTRACT

OBJECTIVE

To evaluate the knowledge, attitude and practice about the Papanicolaou smears test (Pap test), check association between these behaviors and the socio-demographic characteristics of the investigated women, aiming to identify possible hurdles to the realization of the exam.

METHODS

A home inquiry of descriptive nature was performed, with quantitative approach in which we had interviewed 267 women from São José de Mipibu/RN, selected in randomly. A questionnaire was used containing previously encoded and personal questions, whose answers were described and analyzed, as for the adequacy of the knowledge, attitude and practice of the women regarding the Pap test preventive examination, according to previously definite criteria. Association tests were carried out between Socio-demographic characteristics and the studied behaviors, with signification level of 5 %.

RESULTS

The results showed that in spite of only 46,1 % of the interviewed women had demonstrated to have adequate knowledge about the exam, significantly higher proportions of adequacy were observed regarding the attitude and practice of this medical proceeding (63,3 % and 64,4 %), respectively. The higher level of education presented association with adequacy of the knowledge, attitude and practice, whereas carelessness, lack of solicitation of the exam by the physician and shame were the main obstacles to the realization of the Pap test.

CONCLUSIONS

The results show up that the physician plays an important play role on the knowledge, attitude and practice of the preventive examination, in the investigated community, and reveals the lack of information on the objective of the Pap test, it's advantages and benefits for the woman's health.

DESCRIPTORS: Vaginal smears, Uterine cervical neoplasms, Cervix neoplasms prevention

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino (CCU) é a segunda causa de morte por câncer entre mulheres no mundo, com maior incidência nos países em desenvolvimento.^{13,24} No Brasil, representa o terceiro mais comum tipo de neoplasia maligna que acomete mulheres, depois do câncer de pele não melanoma e do câncer de mama.^{4,12} As taxas brutas de incidência, por 100.000 mulheres, estimada para o ano de 2008 foi de 19,18 para o país, 17,58 para a Região Nordeste e de 15,8 para o Estado do Rio Grande do Norte (RN)⁴. A etiologia do CCU está diretamente associada a infecção persistente por papilomavírus humano (HPV) com alto potencial oncogênico, considerada causa necessária, embora não suficiente para desenvolvimento dessa neoplasia, tendo em vista a presença do DNA viral em 99,7% dos casos da doença.^{17, 23,24}

A história natural do CCU revela que, esta neoplasia maligna, destaca-se, entre aquelas que apresenta maior potencial de prevenção e cura, em virtude de sua lenta evolução, passando por vários estágios de lesões intra-epiteliais pré-cancerosas, antes de chegar a forma invasiva.^{10,21} Esta característica associada à relativa facilidade de diagnóstico, permite que a doença seja detectada ainda nos estágios iniciais, quando o tratamento apresenta altas taxas de cura.³ Além disso, o caráter infeccioso de sua etiologia, possibilita a adoção de medidas preventivas, inclusive vacinação, contra os dois tipos de HPV com maior potencial oncogênico.^{3,17,25}

O teste de Papanicolaou (Pap) é um método simples que permite detectar alterações da cérvix uterina, a partir de células descamadas do epitélio e se constitui até hoje, o método mais indicado para o rastreamento do CCU, por ser um exame rápido e indolor, de fácil execução, realizado em nível ambulatorial, que tem se mostrado efetivo e eficiente para aplicação coletiva, além de ser de baixo custo.^{10,16} A avaliação da efetividade do Pap em reduzir as taxas de mortalidade pelo CCU, feita por estudos comparativos de tendências temporais, mostrou uma redução significativa dessas taxas

em alguns países, após a introdução de programas de rastreamento. Estudos epidemiológicos do tipo caso-controle realizados, inclusive no Brasil, revelaram risco mais elevado de CCU, entre mulheres que nunca fizeram o teste de Pap, além de aumento do risco proporcional ao tempo decorrido desde o último exame.^{7,11}

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) adotou em 1998, a norma da Organização Mundial da Saúde, que propõe o controle do CCU nas mulheres com idade entre 25 e 60 anos, a cada três anos, após dois resultados negativos com intervalo anual. Contudo, estimativas indicam que, cerca de 40% das mulheres brasileiras nunca fizeram o exame.²⁰ Dentre as razões para esta baixa adesão podemos destacar: dificuldade em acessar os serviços de saúde, a natureza do exame que envolve a exposição da genitália, motivo de desconforto emocional para algumas mulheres, em virtude de pudores e tabus, além das condições sócio-econômicas e da falta de conhecimento sobre o câncer ginecológico.¹

A realização do teste de Pap tem se confrontado na prática, com algumas barreiras presentes nos mais diversos aspectos da vida da mulher, dificultando o alcance da cobertura desejada. As informações a respeito da cobertura e de fatores associados à não realização do exame por mulheres do Nordeste do Brasil, ainda são escassas. Este estudo teve como objetivo, avaliar os conhecimentos, atitudes e prática das mulheres do município de São José de Mipibu-RN, em relação ao teste de Pap, verificar associação entre a adequação desses comportamentos e as características sócio-demográficas da população estudada, visando identificar possíveis barreiras para a realização do exame.

MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Município de São José de Mipibu, Estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil, no período de março a setembro de 2007. Trata-se de um inquérito domiciliar de natureza descritiva com abordagem quantitativa. A população alvo da pesquisa foram mulheres das áreas rural e urbana do município, com idade variando de 15 a 69 anos, selecionadas por meio de amostragem aleatória estratificada. O tamanho da amostra foi calculado com base no número estimado de mulheres residentes naquele município, dentro da faixa etária estabelecida. Na definição do plano amostral a população foi dividida em dois estratos, correspondentes às áreas rural e urbana. Em seguida, a população urbana foi subdividida em três estratos de acordo com a classe sócio-econômica em: média, baixa e muito baixa. A fórmula utilizada para o cálculo do tamanho da amostra foi:

$$n = \frac{Np(1-p)}{ND + p(1-p)}$$

onde: n= tamanho da amostra; N= total de mulheres com idade entre 15 e 69 anos; p = proporção de mulheres com idade entre 25 e 59 na população estudada e $D = \varepsilon^2/4$, sendo ε um limite de erro de estimação de p. Para verificar a existência de associação entre as características estudadas e os conhecimentos, atitudes e prática do exame foi utilizado o teste χ^2 de associação. O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

Os critérios de inclusão foram: mulheres residentes no município dentro da faixa etária estabelecida, que já tinham iniciado a atividade sexual, que concordaram em participar da pesquisa e se dispuseram a responder a uma entrevista por meio de questionário estruturado.^{5,9} Quatro entrevistadores foram treinados para aplicação dos questionários. Após receberem os esclarecimentos sobre a pesquisa e seus objetivos, as mulheres que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre esclarecido e responderam as perguntas do questionário. Para análise dos dados sobre conhecimentos, atitudes e prática das mulheres em relação ao teste de Pap, foram adotadas as definições utilizadas em outra pesquisa,⁹ conforme apresentadas a seguir:

- **Conhecimento adequado:** quando as mulheres responderam que já tinham ouvido falar do exame, e sabiam que era para prevenir câncer, seja de forma geral ou, especificamente, o de colo uterino.
- **Conhecimento inadequado:** quando as mulheres disseram já ter ouvido falar do exame, mas não souberam dizer a sua finalidade.
- **Atitude adequada:** quando as mulheres consideraram necessária a realização do exame periodicamente, apontando corretamente as razões para fazê-lo.
- **Atitude inadequada:** quando as mulheres consideraram pouco necessário, desnecessário ou não tinham opinião a respeito da realização do exame.
- **Prática adequada:** quando as mulheres afirmaram ter realizado o último exame, havia no máximo três anos.
- **Prática inadequada:** quando as mulheres disseram ter realizado o último exame, havia mais de três anos, uma única vez na vida, ou nunca fizeram.

A existência de associação entre adequação dos comportamentos estudados, frente ao teste de Pap e as características sócio-demográficas consideradas neste estudo, bem como para as atividades sexual e reprodutiva, e uso de métodos contraceptivos foi também avaliada. Para construção do banco de dados e análise das informações obtidas a partir dos questionários, foi utilizado o software SPSS 13.0.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

RESULTADOS

A análise dos questionários individuais permitiu traçar um perfil das mulheres participantes da pesquisa com base nas características sócio-demográficas, bem como nas características relativas às atividades sexual e reprodutiva. A amostra estudada foi composta por 267 mulheres com idade variando de 15 a 69 anos, média de 37,8 (\pm 14,85 anos), que já haviam iniciado a atividade sexual, sendo que 34,8% viviam na zona rural e 65,2% na área urbana do município em diferentes bairros. A maioria (58,4%) era de mulheres com idade abaixo de 40 anos, tinha vida sexual ativa, professava a religião católica, era casada ou vivia em união estável com o companheiro, teve entre um e seis filhos, tinha grau de instrução até o ensino fundamental incompleto, não trabalhava fora de casa e tinha renda familiar de até um salário mínimo.

No que se refere ao grau de conhecimento das mulheres entrevistadas, sobre o teste de Pap, constatou-se que, 98,1% delas, já tinham ouvido falar do exame, no entanto, apenas 46,1% demonstraram possuir conhecimento adequado sobre o referido teste, de acordo com os critérios previamente estabelecidos. A principal fonte de informação sobre o exame foi o médico, mencionado por 40,1% das entrevistadas, seguido de amigas ou parentes 20,2%, agentes comunitários de saúde 19,8%, rádio e TV 8,4% e unidades básicas de saúde 6,5% (Tabela 1). A grande maioria das mulheres entrevistadas (96,2%) considerou necessária à realização do exame, porém, apenas 63,3% delas apresentaram atitude adequada, expressando de forma consciente o reconhecimento de suas vantagens e benefícios, justificando corretamente a importância de fazê-lo periodicamente. Dentre aquelas que apresentaram atitude adequada, 66,9% justificaram a necessidade da realização do exame como forma de se prevenir do câncer de colo do útero e 33,1% de se previne de câncer, de forma geral (Tabela 2).

Quanto à prática do teste de Pap, 85,0% das mulheres entrevistadas afirmaram ter realizado o exame alguma vez, ao longo da vida, 15,0% nunca fizeram e, 64,4%

declararam ter realizado este procedimento médico pelo menos uma vez, a cada três anos, conforme recomendação do Ministério da Saúde (MS), o que foi considerado, neste estudo como prática adequada do exame. Dentre as mulheres que apresentaram prática adequada 75,6% procuraram espontaneamente os serviços de saúde para fazer o exame, 22,7% fizeram por solicitação do médico e 1,7% por recomendação de amigas ou familiares. Em relação às barreiras para a prática do exame, constatou-se que a principal razão alegada para a não fazê-lo, com a frequência recomendada pelo MS foi o descuido, citado por 22,1% das entrevistadas, seguido da não solicitação do médico (7,4%) e por sentir vergonha (6,3%), conforme apresentado (Tabela 3).

Analisando-se a existência de associação entre adequação dos conhecimentos, atitudes e prática das mulheres, frente ao exame e as características sócio-demográficas estudadas, constatou-se que, o grau de escolaridade exerceu influência sobre os três tipos de comportamentos analisados. O trabalho fora de casa, a frequência com que a mulher vai ao ginecologista e a paridade, influenciaram apenas na prática do exame; a situação conjugal influenciou tanto nos conhecimentos, quanto na atitude, enquanto que o uso de métodos contraceptivos exerceu influência sobre os conhecimentos e a prática do exame (Tabela 4). Quando a associação foi analisada em função de outras variáveis, constatou-se que o local de residência exerceu influência sobre os conhecimentos e atitudes das mulheres pesquisadas em relação ao teste de Pap e que, a existência de vida sexual ativa e consulta ao médico durante o ano que antecedeu a realização da pesquisa influenciaram apenas na prática do exame. Com relação à renda familiar foi encontrado um p valor muito próximo do nível de significância considerado, no que se refere a adequação da atitude das mulheres frente ao exame (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Estima-se que o rastreamento de mulheres na faixa etária dos 25 aos 65 anos por meio do teste de Pap, e o tratamento adequado das lesões precursoras, pode reduzir em cerca de 80% a mortalidade por CCU, dependendo do grau de cobertura, da qualidade do exame e do acompanhamento das pacientes.^{4,2,8,18} A cobertura do exame não depende apenas de sua oferta pelo sistema de saúde, mas principalmente, da adesão das mulheres que, por sua vez, depende dos conhecimentos sobre o exame, suas vantagens e benefícios. Neste estudo, buscou-se avaliar a adequação dos conhecimentos, atitudes e prática das mulheres, frente ao teste de Pap, visando identificar possíveis fatores associados à não realização do exame e, contribuir para o aprimoramento das ações de prevenção e controle do CCU.

A validade do relato feito pelas próprias mulheres em relação à realização do exame apresenta algumas limitações. É possível que algumas delas não saibam fazer a distinção apropriada entre o exame ginecológico e o procedimento de coleta de material para o exame de Pap. Além disso, o exame pode não ter sido realizado com a finalidade preventiva, mas por motivo de queixas ginecológicas em consulta realizada com finalidade curativa, o que poderia levar a uma estimativa de adesão, acima da real. Contudo, Kahn et al.¹⁴ demonstraram que esse tipo de estudo apresentou alto grau de validade.

A análise das características sócio-demográficas revelou que, uma parcela significativa das participantes (48,0%), era de mulheres jovens, na faixa etária dos 15 aos 35 anos, com baixo grau de escolaridade, sendo 12,3% analfabetas; a maioria não trabalhava fora, tinha baixa renda familiar, professava a religião católica; tinha vida sexual ativa, era casada ou vivia em união estável com o companheiro; teve entre um e seis filhos, consultou ao ginecologista no ano que antecedeu á pesquisa e já tinha utilizado algum método contraceptivo.

Considerando-se a realização do teste de Pap, pelo menos uma vez na vida, a cobertura do exame foi de 85,0%, índice semelhante ao observado em São Luis do Maranhão,⁶ mas um pouco abaixo do encontrado em mulheres do município de São Paulo.¹⁸ Contudo, quando se toma como parâmetro a recomendação do MS, de realização do exame pelo menos uma vez, a cada três anos, o índice de cobertura observado neste estudo, foi reduzido para 64,4%, valor semelhante ao encontrado para mulheres do Brasil como um todo,²² (66,0%) e ao relatado em São Luis,⁶ mas um pouco abaixo do índice de cobertura de 77,3%, observado em São Paulo,¹⁸ e em Pelotas, Rio Grande do Sul¹² (68,9%). É importante destacar que 35,6% das mulheres deste estudo, não realizaram o exame com a frequência preconizada pelo MS, sendo que 15,0% delas afirmaram nunca ter realizado este procedimento médico, em toda sua vida.

A quase totalidade das mulheres entrevistadas (98,1%) declarou que sabia da existência do teste de Pap, mas apenas 46,1%, soube dizer que este exame serve para prevenir câncer, seja de uma forma geral, ou especificamente, o de colo uterino, demonstrando possuir conhecimento adequado. O grau de conhecimento apresentado pelas mulheres deste estudo foi semelhante ao relatado para mulheres Argentinas⁹ (49,5%), mas abaixo do índice apresentado por mulheres de uma comunidade rural da África do Sul¹⁵ (59,2). As fontes pelas quais as mulheres ficaram sabendo da existência do exame, por ordem de importância foram: o médico (40,1%), amigos ou parentes (20,2%), agentes comunitários de saúde (19,8%), rádio e TV (8,4%), unidades de saúde (6,5%) e outras fontes (2,8%). Diante destes resultados, é possível supor que, as mulheres ao serem informadas sobre o exame e da necessidade de fazê-lo, periodicamente, não foram devidamente esclarecidas sobre o objetivo de sua realização, enquanto medida preventiva que visa detecção e tratamento precoce de lesões da cérvix uterina, evitando haja a progressão para o CCU.

A adequação dos conhecimentos sobre o exame apresentou associação com o local de residência, grau de instrução, situação conjugal e uso de métodos contraceptivos, sendo maior nas mulheres que vivem na área urbana, nas que possuem maior nível de escolaridade, nas solteiras e naquelas que faziam uso de algum método contraceptivo. Isso poderia ser explicado pelo fato de que, as mulheres que vivem na área urbana e com mais escolaridade, tiveram maior facilidade de acesso às informações sobre o exame e mais oportunidade para fazê-lo. Com relação às mulheres solteiras e as que utilizam algum método contraceptivo, possivelmente deve-se a uma maior procura por orientação médica, no sentido de evitar gravidez indesejada. Não foi constatada neste estudo, a existência de associação entre conhecimento adequado do exame, e idade, religião, trabalho fora de casa, renda familiar, vida sexual ativa, consulta ao ginecologista no ano que antecedeu a pesquisa e paridade.

Com relação à atitude, frente ao teste de Pap, constatou-se que a grande maioria das entrevistadas (96,2%) considerou necessária a realização do exame, no entanto, apenas 63,3% delas apresentaram atitude adequada, fazendo referência às vantagens e benefícios que este propicia à sua saúde, informando corretamente a motivação para sua realização periódica. Este índice é semelhante ao relatado para mulheres da África do Sul¹⁵ (60,6%) e situa-se acima do observado nas gaúchas¹⁹ (45,6%), mas abaixo do índice relatado para mulheres argentinas⁹ (80,5%). Das mulheres que apresentaram atitude adequada em relação ao exame, 66,9% justificaram a necessidade de sua realização periódica, para se prevenir do câncer de colo do útero e 33,1% para se prevenir contra câncer. Estes resultados mostram que uma parcela significativa das mulheres (36,7%) apesar de considerar necessária a realização do exame, não sabia dos benefícios que ele representa para sua saúde. Isso evidencia que, ao serem informadas sobre o exame, essas mulheres não foram devidamente esclarecidas sobre sua importância, enquanto método de triagem que permite o

diagnóstico e tratamento precoce de lesões, antes da progressão para formas malignas sendo, um recurso indispensável na prevenção do CCU.

A adequação da atitude, frente o teste de Pap apresentou associação com o grau de instrução, situação conjugal, local de residência e renda familiar, tendo sido observados maiores índices de adequação nas mulheres que vivem na área urbana, nas solteiras, naquelas que possuem maiores níveis de escolaridade e maior renda familiar. Estes resultados são concordantes com aqueles relatados para mulheres argentinas⁹, em relação à escolaridade, e para as gauchas¹⁹, no que se refere à maior escolaridade e situação conjugal. São concordantes ainda, com os resultados obtidos em mulheres de Campinas, São Paulo¹, no que tange à maior escolaridade e renda familiar. A associação observada entre atitude adequada frente ao exame, e maior escolaridade, maior renda, residência em área urbana e ausência de convivência conjugal, se devem provavelmente, a maior facilidade de acesso aos serviços de saúde e às informações sobre as vantagens e benefícios da realização do exame por estas mulheres.

A oferta do exame de Pap vista de forma isolada, enquanto medida preventiva do CCU, por si só, não é suficiente para garantir a redução do índice de mortalidade entre mulheres por essa patologia. O efeito benéfico esperado do exame depende do grau de conscientização das mulheres e da maior adesão à prática deste procedimento, com a periodicidade recomendada. Neste estudo ficou evidenciado que apesar de 85,0% das entrevistadas terem realizado o exame alguma vez na vida, apenas 64,4% o fizeram com a regularidade preconizada pelo MS, portanto, apenas essa parcela das mulheres entrevistadas apresentou prática adequada do exame, de acordo os critérios previamente estabelecidos.

Dentre as mulheres que tiveram prática adequada, a maioria (54,6%) afirmou ter procurado os serviços de saúde para realizar o exame de forma espontânea, apontando como motivação principal para fazê-lo, a prevenção do câncer de colo do útero. Outras

razões foram apontadas tais como: toda mulher precisa fazer esse exame periodicamente (14,5%), o exame não incomoda (4,1%), o exame é gratuito (2,3%). O outro grupo de mulheres que também apresentaram prática adequada, afirmaram ter feito o exame por recomendação médica (22,7%), de amigas ou familiares (1,7%). As razões mais citadas dentre aquelas que funcionaram como barreiras para a prática do exame foram: descuido (22,1%), não solicitação do médico (7,4%), vergonha (6,3%) o exame incomoda (3,2%) e outros (3,2%). O índice de prática adequada apresentado pelas mulheres deste estudo foi o dobro do encontrado nas mulheres argentinas⁹, e um pouco acima do relatado para as da África do Sul¹⁵ e, semelhante ao descrito para as gaúchas de Pelotas¹⁹. Com relação às razões alegadas pelas mulheres deste estudo para a não realização do exame, observou-se alguma semelhança com aquelas apontadas pelas mulheres argentinas⁹.

A adequação da prática do exame apresentou associação com escolaridade, trabalho fora de casa, frequência de consulta ao ginecologista, paridade, uso de algum método contraceptivo e vida sexual ativa. Apresentaram melhores índices de adequação as mulheres com maior nível de instrução, as que trabalham fora de casa, as que consultam ao médico com maior frequência, as que tinham vida sexual ativa, as que tiveram entre quatro e seis filhos, e aquelas que utilizam algum método contraceptivo. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos para mulheres argentinas⁹, no que se refere à maior frequência de consulta ao médico e paridade, e com os relatados para as de Campinas, São Paulo¹, no que tange a escolaridade. A prática mais adequada do teste de Pap entre as mulheres com maior escolaridade e as que trabalham fora de casa, pode está relacionada como, a maior oportunidade e facilidade de acesso às informações sobre o exame. Por outro lado, as mulheres com vida sexual ativa, frequentam mais os serviços de saúde, seja à procura de um método contraceptivo para controle familiar, ou para fazer os exames do pré-natal e acompanhamento da gestação,

no caso das grávidas, e por isso, são mais orientadas a fazerem o exame preventivo do CCU.

Diante destes resultados, fica evidente que o médico ainda exerce um papel de fundamental importância sobre a adequação dos conhecimentos atitudes e prática e, conseqüentemente sobre os índices de cobertura do exame preventivo de Papanicolaou, nas mulheres da comunidade pesquisada. Este fato merece atenção especial por parte dos gestores da saúde do município, no sentido de incentivar a todos os profissionais da área, para que se empenhem o quanto mais possível, para oferecer as informações corretas sobre o objetivo do exame, suas vantagens e benefícios, visando melhorar o grau de conscientização das mulheres, sobre a importância e necessidade de fazê-lo com a periodicidade recomendada pelo MS.

REFERÊNCIAS

1. Amorim VMSL, Barros MBA, César CLG, Carandina L, Goldbaum M. Fatores associados à não realização do exame de Papanicolaou: um estudo de base populacional no Município de Campinas, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2006;22(11):2329-38.
2. Bonilha JL, Valença CFM, Nicelli JP, Zanovelo EM, Silva J, Cury PM. Controle de qualidade em colpocitologia: visão rápida com campo marcado. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(6):441-8.
3. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55:244-65.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Administração a Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
5. Brenna SMF, Hardy E, Zeferino LC, Namura I. Conhecimento, atitude e prática do exame de Papanicolaou em mulheres com câncer de colo do uterino. *Cad Saude Publica*. 2001;17(4):909-14.
6. De Oliveira MMHN, Da Silva AAM, Brito LMO, Coimbra LC. Cobertura e fatores associados à não realização do exame de Papanicolaou em São Luis, Maranhão. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(3):325-34.
7. Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJLM, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*. 1994;69(1):114-9.
8. Franco R, Amaral RG, Montemor EBL, Montis DM, Morais SS, Zeferino LC. Fatores Associados a resultados falso-negativos de exames citopatológicos do colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(8):479-85.
9. Gamarra CJ, Paz EPA, Griep RH. Conhecimentos, atitudes e prática do exame de Papanicolaou entre mulheres argentinas. *Rev Saude Publica*. 2005;39(2):270-6.

10. Greenwood SA, Machado MFAS, Sampaio NMV. Motivos que levam mulheres a não retornarem para receber o resultado de exame Papanicolaou. *Rev Latino-am Enfermagem*. 2006;14(4):503-9.
11. Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, de Briton RC, Gaitan E et al. Screening for cervical cancer in Latin America: a case-control study. *Int J Epidemiol*. 1992;21(6):1050-6.
12. Hackenhaar AA, Cesar JA, Domingues MR. Exame citopatológico de colo uterino em mulheres com idade entre 20 e 59 anos em Pelotas, RS: prevalência, foco e fatores associados à sua não realização. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(1):103-11.
13. International Agency for Research on Cancer-IARC[homepage on the Internet]. IARC confirms efficacy of cervix cancer screening for women 25-65 in reducing mortality. Press release nº 151. Lyon; 2004 [cited 2004 May 3]. Available from: http://www.iarc.fr/ENG/Press_Releases/Summary.pdf
14. Kahn JA, Goodman E, Kaplowitz RA, Slap GB, Emans SJ. Validity of adolescent and young adult self-report of Papanicolaou smear results. *Obstet Gynecol*. 2000;96:625-31.
15. Lartey M, Joubert G, Cronje HS. Knowledge, attitudes and practices of rural women in South Africa regarding the Pap smear. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003;83:315-6.
16. Martins LFL, Thuler LCS, Valente JG. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(8):485-92.
17. Muñoz M, Castellsagué X, De González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24(Suppl 3):1-10.
18. Pinho AA, França Júnior I. Prevenção do câncer de colo do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. *Rev Bras Saude Matern Infant*. 2003;3(1):95-112.

19. Racho D, Vargas VRA. Análise da prática e atitude sobre o exame preventivo de câncer do colo do útero em uma comunidade universitária. *RBAC*. 2007;39(4):59-63.
20. Ramos AS, Palha PF, Costa-Júnior ML, Sant'Anna SC, Lenza NFB. Perfil de mulheres de 40 a 49 anos cadastradas em um núcleo de saúde da família, quanto à realização do exame preventivo de Papanicolaou. *Rev Latino-am Enfermagem*. 2006;14(2):170-4.
21. Steenbergen RDM, De Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. 2005;32(Suppl):25-33.
22. Szwarcwald CL, Viacava F, Vasconcellos MTL, Leal, MC, Azevedo LO, Quiroz RSB et al. Pesquisa Mundial de Saúde 2003: o Brasil em números. *RADIS*. 2004;23:14-33.
23. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 24(Suppl 1):4-15.
24. Villa LL. Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Publica Mex*. 2003;45(Suppl 3):443-8.
25. Villa LL. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine*. 2006;24(Suppl 1):23-8.

Tabela 1. Fonte de informação e adequação do conhecimento sobre o exame de Papanicolaou. São José do Mipibu/RN, Brasil, 2007. (N=267)

Características	N	%
Sabia da existência do exame:		
Sim	262	98,1
Não	5	1,9
Conhecimento:		
Adequado	123	46,1
Inadequado	144	53,9
Por quem foi informado da existência do exame:		
Pelos agentes comunitários de saúde	52	19,8
Pelo médico	105	40,1
No posto de saúde	17	6,5
Por amigos ou parentes	53	20,2
Pelo rádio /TV	22	8,4
Na escola	5	2,0
Por colegas de trabalho	2	0,8

Tabela 2. Atitude das mulheres frente à realização do exame de Papanicolau e razões de sua necessidade. São José do Mipibu/RN, Brasil, 2007. (N=267)

Características	N	%
Como considera a realização do exame:		
Necessária	257	96,2
Desnecessária	10	3,8
Atitude:		
Adequada	169	63,3
Inadequada	98	36,7
Razões para a necessidade de realizar o exame:		
Porque previne o câncer do colo do útero	113	66,9
Porque previne câncer	56	33,1
O médico disse para fazer	12	7,1
Os agentes comunitários de saúde disseram para fazer	8	4,7
Amigas ou parentes disseram para fazer	12	7,1

Tabela 3. Prática e adequação da prática do exame de Papanicolaou e barreiras apontadas pelas mulheres para a sua realização. São José do Mipibu/RN, Brasil, 2007. (N=267)

Características	N	%
Tipo de prática:		
Realizou o exame alguma vez na vida	227	85,0
Nunca fez o exame	40	15,0
Prática:		
Adequada	172	64,4
Inadequada	95	35,6
Razões para a prática adequada do exame:		
O exame previne o câncer do colo do útero	94	54,6
O médico disse para fazer	39	22,7
Toda mulher precisa fazer esse exame	25	14,5
O exame não incomoda	7	4,1
O exame é gratuito	4	2,3
Recomendação de familiares ou amigos	3	1,7
Barreiras para a prática do exame:		
Vergonha	6	6,3
A não solicitação do médico	7	7,4
O exame incomoda	3	3,2
Falta de tempo	2	2,1
Descuido	21	22,1
O posto de saúde fica distante	1	1,1

Tabela 4. Avaliação da adequação do conhecimento, atitude e da prática das mulheres sobre o exame de Papanicolau, em função das características estudadas. São José do Mipibu/RN, Brasil, 2007. (N=267)

Característica	Conhecimento Adequado			Atitude Adequada			Prática Adequada			
	Total	N	%	p	N	%	p	N	%	p
Idade: (anos)										
≥ 40	111	47	42,3	0,3030	70	63,1	0,9469	66	59,5	0,2726
≤ 39	156	76	48,7		99	63,5		103	66,0	
Local de residência:										
Zona rural	93	17	18,3	0,0000	17	18,3	0,0000	62	66,7	0,4035
Zona urbana	174	106	60,9		152	87,4		107	61,5	
Escolaridade:										
Nunca estudou	33	6	18,2		5	15,2		1	3,0	
Fund. Incomp.	132	56	42,4		55	41,7		57	43,2	
Fund. Comp.	12	8	66,7		7	58,3		7	58,3	
Médio incomp.	25	13	52,0	0,0014	15	60,0	0,0106	13	52,0	0,0098
Médio comp.	60	37	61,7		38	63,3		42	70,0	
Superior	5	3	60,0		3	60,0		3	60,0	
Situação conjugal										
Solteira	86	50	58,1	0,0055	63	73,0	0,0224	49	57,0	
Casada	131	58	44,3		81	61,8		89	67,9	0,2554
Outros	50	15	30,0		25	50,0		31	62,0	
Religião										
Católica	214	99	46,3	0,5828	137	64,0	0,4338	137	54,0	0,6183
Evangélica	41	17	41,5		23	56,1		26	63,4	
Outras	12	7	58,3		9	75,0		6	50,0	
Trabalho fora:										
Sim	68	31	45,6	0,9268	38	55,9	0,1418	51	75,0	0,0204
Não	199	92	46,2		131	65,8		118	59,3	
Renda familiar:										
Até um salário mínimo	167	73	43,7	0,5144	99	59,3	0,0897	100	59,9	0,3198
2 a 4	86	44	51,2		58	67,4		59	68,6	
≥ 5	14	6	42,6		12	85,7		10	71,4	
Foi ao médico no último ano:										
Sim	217	100	46,1	0,9915	138	63,6	0,8330	158	72,8	0,0000
Não	50	23	46,0		31	62,0		11	22,0	
Vida sexual ativa										
Sim	193	87	45,1	0,6003	117	60,6	0,1432	136	70,5	0,0001
Não	74	36	48,6		52	70,3		33	44,6	
Contraceptivo:										
Sim	166	96	57,8	0,0320	99	59,6	0,1119	120	72,3	0,0001
Não	101	27	26,7		70	69,3		49	48,5	
Paridade										
Nenhum	57	33	57,9	0,1625	41	71,0		27	47,4	0,0008
1 a 3	128	58	45,3		82	64,0	0,1843	95	47,2	
4 a 6	59	22	37,3		31	52,5		37	62,7	
7 ou mais	23	10	43,5		15	65,2		10	43,5	
Total	267	123	46,1		169	63,3		169	63,3	

Capítulo 3

ARTIGO 2

TÍTULO: INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DE MIPIBU/RN E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS

AUTORES: E.D. NASCIMENTO¹, R.C.V. SOUSA¹, W.A. SOUZA¹, R.V. MEISSNER¹, M.G.F. CARVALHO², T.A.A.M. FERNANDES³, P.R.M. AZEVEDO⁴, M.F.F.M. XIMENES¹, J.V. FERNANDES^{1*}.

REVISTA: Epidemiology and Infection

SITUAÇÃO: Manuscrito em preparação para envio à revista científica

TITLE: INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DE MIPIBU/RN E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS

AUTHORS: E.D. NASCIMENTO¹, R.C.V. SOUSA¹, W.A. SOUZA¹, R.V. MEISSNER¹, M.G.F. CARVALHO², T.A.A.M. FERNANDES³, P.R.M. AZEVEDO⁴, M.F.F.M. XIMENES¹, J.V. FERNANDES^{1*}.

1. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Sen. Salgado Filho, S/N, Campus Universitário, Lagoa Nova, CEP: 59072-970, Natal - RN, Brasil.

2. Universidade Potiguar. Av. Senador Salgado Filho, nº 1610, Lagoa Nova, CEP: 59056-000, Natal/RN, Brasil.

3. Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Rua: Atirador Miguel Antônio da Silva Neto, S/N, Aeroporto, CEP: 59607-360 - Mossoró, RN, Brasil.

4. Departamento de Estatística Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Petrópolis CEP: 59.010 - 180, Natal - RN, Brasil

Key Words: Risk factors, HPV, cervical lesions, PCR

Running title: HPV prevalence in women from Natal

***Corresponding author:** José Veríssimo Fernandes

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Centro de Biociências, Departamento de Microbiologia e Parasitologia,

Av. Senador. Salgado Filho, S/N, Campus Universitário, Lagoa Nova,

CEP: 59072-970, Natal, RN, Brasil.

Fax: +55-84-32119210; e-mail: veris@cb.ufrn.br

Sources of support: CNPq, CAPES

Total counts: **7 authors; 1 text file, 3 table**

1. INTRODUÇÃO

Os vírus do papiloma humano (HPV) constituem um grupo de vírus epiteliotrópicos que infecta a pele e mucosas do trato genital e outros sítios anatômicos do corpo humano (MEYERS; MAYER; OZBUN, 1997; VILLA, 1995a; BURD, 2003; TROTTIER; FRANCO, 2006), sendo uma das principais causas de infecção sexualmente transmissíveis entre mulheres sexualmente ativas, de todo o mundo, especialmente as mais jovens (SELLORS *et al.*, 2003, MONSONEGO *et al.*, 2004). São conhecidos atualmente mais de 120 tipos diferentes de HPVs, dos quais cerca de 40 infectam o trato genital (MUÑOZ, 2000, MUÑOZ *et al.*, 2003, COELHO *et al.*, 2004).

O advento da biologia molecular permitiu o estabelecimento de protocolos padronizados e a realização de estudos bem controlados que apontaram, de forma consistente, a infecção por certos tipos de HPV como o principal fator de risco para o câncer de colo do útero e suas lesões precursoras (MUÑOZ, 2000; BOCH & SANJOSÉ, 2003; COGLIANO *et al.*, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2006). A prevalência da infecção por HPV e a distribuição dos genotipos por ordem de prevalência, apresentam variações entre as populações de diferentes regiões geográficas e até mesmo dentro da mesma região, o que torna cada vez mais indispensável à realização de estudos locais (TROTTIER; FRANCO, 2006).

Muitas mulheres adquirem o vírus na adolescência e desenvolvem uma infecção transitória que, em geral, passa por uma fase produtiva inicial, com alterações citológicas que podem ser observadas em um esfregaço de células descamadas do epitélio da cérvix uterina, corado pelo método de Papanicolau. Após essa fase, a infecção pode regredir, espontaneamente para a cura, o que parece ocorrer na maioria dos casos (SELLORS *et al.*, 2003; STEENBERGEN *et al.*, 2005), ou pode ocorrer apenas o desaparecimento das lesões aparentes, e o vírus permanecer em estado de latência, em células da camada basal do epitélio, por tempo indeterminado. Em alguns casos a infecção progride diretamente para a forma crônica do tipo produtiva, sem passar por esse período de latência viral, podendo evoluir em ambos os casos, para a imortalização, seguida de transformação maligna da célula infectada. (VILLA, 2002; MUÑOZ, 2000; BOSH; SANJOSÉ, 2003).

Estudos recentes estimam que em todo mundo cerca de meio milhão de novos casos de câncer de colo uterino são notificados a cada ano, sendo virtualmente a totalidade deles, associados à infecção por HPV, resultando em cerca de 250,000 mortes (WHO, 2006). No Brasil, para o ano de 2008, estimam-se que ocorrerão 19 mil novos

casos de câncer de colo de útero, sendo 250 só no Estado do Rio Grande do Norte (INCA, 2007).

Estudo realizado por Fernandes *et al.* (2008), envolvendo um segmento da população feminina da cidade de Natal/RN, revelou que 45,5% das mulheres analisadas apresentavam algum tipo de lesão da cérvix uterina, dentre as quais 59,8% tinham infecção por um ou mais tipos de HPV. Nas mulheres com citologia normal ou apenas com alterações benignas, a prevalência da infecção por HPV foi de 24,5%, sendo na maioria delas, detectada a presença do DNA de HPVs de alto risco.

Dados do programa SISCOLO, do Ministério da Saúde, mostram que o município de São José do Mipibú/RN, localizado a 40km da cidade do Natal, notificou no período de 2001 a 2004, um número, acima do esperado, de mulheres com alterações citológicas da cérvix uterina compatíveis com infecção por HPV. Este fato despertou a atenção das autoridades de saúde locais e merece especial atenção tendo em vista que, quase metade da população feminina do município, é composta por mulheres na faixa etária de maior risco de infecção pelo HPV e que estão expostas ao vírus.

Neste estudo, analisou-se a prevalência da infecção pelo HPV na população feminina local, em função das características sócio-demográficas e de algumas variáveis consideradas como fatores de risco clássicos para doenças sexualmente transmissíveis e suas relações com a presença de alterações citológicas da cérvix uterina. O objetivo principal foi avaliar o papel do HPV na etiologia de tais lesões, bem como identificar possíveis fatores de risco associados à infecção por esse patógeno, visando contribuir para a definição de políticas públicas voltadas para a implementação de medidas preventivas com base na realidade local.

2. METODOLOGIA

2.1. População estudada e coleta da amostra

Amostras cervicais foram coletadas de 605 mulheres da cidade de São José do Mipibú (Estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil) que aceitaram participar deste estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todas as participantes responderam um questionário padronizado, destinado à obtenção de informações sobre características sócio-demográficas, comportamento sexual e reprodutivo, uso de contraceptivo oral, prática de tabagismo e história familiar de câncer. De cada mulher, foram coletadas duas amostras da ecto e endocérvice, por meio de escova cervical, sendo uma para o exame citológico de Papanicolau e outra para detecção do DNA do HPV por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual foi mantida em PBS contendo vancomicina e 25U/ml de nistatina.

2.2. Extração do DNA a partir da células descamadas da cérvix uterina

As células dos raspados cervicais foram ressuspensas em 400 µl de tampão de lise (Triton X-100 0.5%, Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, e EDTA 1 mM) e 20 µl de proteinase K 10mg/mL e encubado a 56°C por 3h, seguida por encubação a 95°C por 10 min. Depois foi adicionado acetato de amônio (concentração final), o DNA extraído foi purificado usando isopropanol e etanol.

2.3. Detecção do DNA do HPV e da *Chlamydia trachomatis*

As amostras de 605 mulheres foram submetidas a uma triagem pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em um termociclador da Marca MJ Research, usando os primers PCO3+/PCO4+ e CP24/CP27 (SAIKI *et al.* 1985) que são específicos para a amplificação de um segmento do gene β-globina e de um plasmídeo existente na *C. trachomatis*, respectivamente. As condições da reação foram: um passo inicial de

desnaturação por 4 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de um minuto a 95°C para desnaturação, um minuto a 50°C para anelamento e um minuto a 72°C para extensão. Foi realizado um último passo de 10 minutos a 72°C para extensão final. Apenas as amostras positivas para o gene β -globina foram incluídas neste estudo.

Para a detecção do DNA do HPV foram usados os primers GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN *et al.* 1995). As condições da reação foram: um passo inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de um minuto a 95°C para desnaturação, dois minutos a 45°C para anelamento e um minuto e 30 segundos a 72°C para extensão. Foi realizado um último passo de 10 minutos a 72°C para extensão final.

Para cada reação, utilizou-se DNA extraído de células HeLa, uma linhagem celular derivada de câncer de colo do útero que possui o DNA do HPV18 como controle positivo, DNA de células C33, uma linhagem celular negativa para HPV e água como controles negativos da reação. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% seguida pela coloração com prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994). Os espécimes foram considerados positivos para o DNA do HPV se fosse identificado uma banda de 450pb no gel.

2.4. Análise Estatística

Para verificar a existência ou não de aumento do risco de ocorrência de alterações da cérvix uterina em função da presença do HPV e de outros fatores de risco estudados, foi calculada a Razão de Chance (RC), com 95% de Intervalo de Confiança (IC), de acordo com o modelo de ajuste multivariado para todas as variáveis. A significância estatística entre os grupos analisados foi verificada através do teste de χ^2 (qui-quadrado). Para realizar os testes estatísticos foi usado o programa Sistema R (sistema livre), nos cálculos de razões de chance (RC), com seus respectivos intervalos de confiança (IC) e seus p valores. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p \leq 0,05$.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

3. RESULTADOS

Foram analisados espécimes cervicais de 605 mulheres com idade variando de 14 a 71 anos, média 33,5 anos ($\pm 12,4$ anos) a maioria era de etnia não branca, casada, sem instrução ou que tinha no máximo ensino fundamental completo, que iniciou as atividades sexual e reprodutiva, antes de completar 18 anos, teve entre um e três filhos, já usou contraceptivos orais, não tem habito de fumar e se declarou monogâmica.

Do total de amostras analisadas por meio do exame citológico de Papanicolaou, 565 (93,3%) apresentaram resultados dentro dos padrões de normalidade ou tinham apenas alterações benignas e 40 (6,6%) apresentaram algum tipo de alteração da cérvix uterina. Dentre aquelas que apresentaram alterações citológicas, 15 tinham apenas células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e 25 apresentaram lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL).

Analisando-se os resultados do exame citológico em função das características sócio-demográficas do segmento da população estudado, constatou-se que 50,1% das mulheres analisadas tinham até 30 anos de idade, a grande maioria delas (90,1%) apresentou resultado do exame citológico dentro dos padrões de normalidade ou tinham apenas alterações benignas. Considerando-se apenas as mulheres cujo resultado do exame citológico revelou algum tipo de alteração celular, a grande maioria, (80,0%) das que tinham ASC-US e (72,0%) daquelas com LSIL, tinham até 30 anos de idade. Observou-se associação entre idade cronológica e a presença de alterações da cérvix uterina, detectadas por meio do teste de Pap ($p=0,0390$), revelando que as mulheres com idade menor ou igual à 30 anos apresentaram frequência significativamente maior de alterações citológicas, em relação as demais faixas etária.

A maioria das mulheres pesquisadas foi classificada neste estudo, como de etnia não branca e (55,0%) delas, apresentou algum tipo de alterações no exame citológico. No entanto, não foi observada a existência de associação entre etnia e a ocorrência de alterações citológicas. Em relação à situação conjugal a maior parte das mulheres pesquisadas era casada e dentre elas a maioria apresentou alterações citológicas classificadas como ASC-US, enquanto que a maioria dentre aquelas que tinham LSIL era de mulheres solteiras. Quanto ao grau de instrução, a maioria das mulheres tinha no máximo ensino fundamental completo e um percentual significativo delas (44,1%) não tinha instrução alguma ou tinha apenas instrução elementar. Considerando-se apenas as mulheres com citologia alterada, 73,3% das que tinham ASC-US e 72,0% daquelas com LSIL tinha no máximo ensino fundamental completo (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação das variáveis sócio-demográficas em função dos resultados do exame citológico de Papanicolaou.

Variáveis Sócio-demográficas	Resultado do exame citológico						p
	Alterações benignas		ASC-US		LSIL		
Idade (anos)	N	%	N	%	N	%	
≤ 30	273	90,1	12	4,0	18	5,9	
31 – 40	132	95,0	2	1,4	5	3,6	
41 – 50	97	99,0	1	1,0	0	0,0	0,0390*
≥ 50	63	97,0	0	0,0	2	3,1	
Etnia							
Branca	192	91,4	7	3,4	11	5,2	0,3623
Não branca	373	94,4	8	2,0	14	3,5	
Estado civil							
Solteira	192	91,4	4	1,9	14	6,7	
Casada	322	93,8	10	2,9	11	3,2	0,1386
Outros	51	98,1	1	1,9	0	0,0	
Grau de instrução							
Sem instrução ou elementar	250	93,6	9	3,4	8	3,0	
Fundamental completo	186	93,9	2	1,0	10	5,0	0,5480
Médio completo	114	92,7	3	2,4	6	4,9	
Superior	15	88,2	1	5,9	1	5,9	
Faz o exame preventivo							
Está fazendo pela primeira vez	133	90,4	5	3,4	9	6,1	0,2588
Já tinha feito antes	432	94,3	10	2,2	16	3,5	
Freqüência com que faz o exame							
Está fazendo pela primeira vez	133	90,4	5	3,4	9	6,1	
Faz uma vez por ano	327	94,7	8	2,3	10	2,9	
Faz a cada dois anos	71	94,6	2	2,7	2	2,7	0,03775*
Faz a cada três anos	16	100,0	0	0,0	0	0,0	
Faz a cada quatro anos ou mais	18	81,8	0	0,0	4	18,2	

* Estatisticamente significativa

Das 605 mulheres incluídas neste estudo, 458 (75,7%) afirmaram que já haviam feito o exame preventivo outras vezes e 147 (24,3%) disseram estar realizando o procedimento pela primeira vez. Dentre aquelas que já haviam feito o exame antes, 75,7% disseram fazê-lo anualmente, 16,4% a cada dois anos, 3,5% a cada três anos e 4,8% a cada quatro anos ou mais. Constatou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre as mulheres que estavam fazendo o exame preventivo pela primeira vez e aquelas que já haviam realizado o procedimento anteriormente, em relação a ocorrência de alterações citológicas da cérvix uterina. Contudo, observou-se associação entre a freqüência com que o exame citológico é realizado e a ocorrência de lesão de baixo grau da cérvix uterina ($p=0,03775$), observando-se uma proporção significativamente menor de LSIL entre as mulheres que declararam fazer o exame preventivo anualmente, quando comparadas àquelas que estavam realizando o procedimento pela primeira vez, ou que disseram fazê-lo a cada quatro anos ou mais. A distribuição das mulheres por faixa etária

em função da frequência com que realizam o exame preventivo mostrou que, a maioria das mulheres deste estudo (57,0%), afirmou que faz o exame anualmente, 72,1% realizam o procedimento pelo menos uma vez, a cada três anos e 24,3% das mulheres estavam realizando o exame preventivo pela primeira vez, sendo que 43,5% delas tinha menos de 20 anos de idade (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das mulheres por faixa etária em função da frequência com que realizam o exame preventivo de Papanicolaou.

Idade	Frequência com que faz o exame preventivo de Papanicolaou										Total
	Fez pela primeira vez		Faz uma vez por ano		Faz a cada dois anos		Faz a cada três anos		Faz a cada quatro anos		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<20	64	43,5	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	65
21-30	70	47,6	139	40,3	22	29,3	3	18,8	4	18,2	238
31-40	4	2,7	96	27,8	25	33,3	4	25,0	10	45,5	139
41-50	5	3,4	65	18,8	21	28,0	5	31,3	2	9,1	98
>50	4	2,7	44	12,8	7	9,3	4	25,0	6	27,3	65
Total	147	24,3	345	57,0	75	12,4	16	2,7	22	3,6	605

Todas amostras que foram processadas para extração de DNA e analisadas por PCR, para amplificação de um segmento do gene da β -globina humano e de uma seqüência do plasmídeo presente na *Chlamydia trachomatis*, se apresentaram positivas para a amplificação da β -globina, mostrando que o método de extração utilizado apresentou 100% de eficiência na obtenção de DNA em condições de ser amplificado por PCR. Contudo, apenas 30 delas se apresentaram positivas para *C. trachomatis*, revelando uma prevalência geral de 5,0% de infecção por essa bactéria. Do total de 605 amostras que foram analisadas por PCR utilizando os primers genéricos GP5+/GP6+ para a amplificação de um segmento de 140 pb do gene L1 viral, 175 se mostraram positivas para a presença do DNA do HPV, revelando uma prevalência geral de 28,9% da infecção por esse patógeno.

Quando analisou-se os fatores de risco considerados, em função dos resultados do exame citológico, constatou-se que, considerando-se apenas as mulheres com citologia alterada, a maioria delas tinha até 30 anos de idade, teve o primeiro intercuro sexual com menos de 18 anos, teve apenas um parceiro sexual ao longo da vida, no caso das mulheres que tinham ASC-US e dois ou mais parceiros para aquelas com LSIL, teve entre uma e três gestações, já havia usado algum tipo de contraceptivo oral e era não fumante.

Em relação à presença de infecção da cérvix uterina por *C. trachomatis*, observou-se que a maioria das mulheres com alterações citológicas foram negativas no teste de detecção do DNA da bactéria. As mulheres com LSIL apresentaram prevalência significativamente maior de infecção por HPV, ($p=0,00000$). Não foi observada neste estudo, associação entre a idade do primeiro intercurso sexual, da primeira gestação, número de gestações, número de parceiros sexuais ao longo da vida, prática do tabagismo, uso de contraceptivos orais e infecção da cérvix uterina por *C. trachomatis* e aumento de risco para qualquer tipo de lesão da cérvix uterina (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação dos fatores de risco em função dos resultados do exame citológico de Papanicolaou.

Fatores de risco	Resultado do exame citológico						p
	Alterações benignas		ASC-US		LSIL		
Idade (anos)	N	%	N	%	N	%	
≤ 30	273	90,1	12	4,0	18	5,9	0,0390
31 – 40	132	95,0	2	1,4	5	3,6	
41 – 50	97	99,0	1	1,0	0	0,0	
≥ 50	63	97,0	0	0,0	2	3,1	
Idade da 1ª Relação							
≤ 17	318	92,4	9	2,6	17	4,9	0,8401
18 – 20	159	94,6	4	2,4	5	3,0	
> 20	88	94,2	2	2,1	3	3,2	
Idade da 1ª Gestação							
Não teve	105	96,3	3	2,7	1	0,9	0,4604
≤ 17	171	91,0	6	3,2	11	5,8	
18 – 20	145	94,1	2	1,3	7	4,5	
> 20	144	93,5	4	2,6	6	3,9	
Nº Gestações							
0	84	95,4	3	3,4	1	1,1	0,2358
1 – 3	312	91,5	9	2,6	20	5,8	
4 – 6	113	96,6	1	0,8	3	2,5	
≥ 7	56	95,0	2	3,4	1	1,7	
Nº Parceiros sexuais							
1	295	93,9	8	2,5	11	3,5	0,5190
2	156	92,3	6	3,5	7	4,1	
≥ 3	114	93,4	1	0,8	7	5,7	
Tabagismo							
Sim	101	94,4	3	2,8	3	2,8	0,7318
Não	464	93,2	12	2,4	22	4,4	
Uso de contraceptivos							
Sim	398	93,2	11	2,5	18	4,2	0,9588
Não	167	93,8	4	2,2	7	3,9	
Infecção por HPV							
Sim	151	86,2	4	2,3	20	11,4	0,0000
Não	414	96,3	11	2,5	5	1,1	
<i>C. trachomatis</i>							
Sim	28	93,4	0	0,0	2	6,7	0,5291
Não	537	93,3	15	2,6	23	4,0	

Analisando-se a presença da infecção por HPV em função do resultado do exame citológico, observou-se índices de prevalência de 26,7% nas mulheres com citologia normal ou apenas com alterações benignas, 26,7% naquelas com como ASC-US e 80,0% nas que tinham LSIL, constatando-se a existência de uma forte associação entre a presença do DNA viral e a ocorrência de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau ($p=0,0000$), conforme mostrado (Tabela 4).

Tabela 4. Prevalência da infecção por HPV em função do resultado do exame citológico de Papanicolaou.

PCR para HPV	Tipo de alteração cervical diagnosticada no exame de Papanicolaou						p
	Alterações Benignas		ASC-US		LSIL		
	N	%	N	%	N	%	
Positivo	151	26,7	4	26,7	20	80,0	0,0000
Negativo	414	73,2	11	73,3	5	20,0	
Total	565		15		25		

A análise das características sócio-demográficas do segmento da população estudado, em função da presença de infecção por HPV revelou que, as mulheres com até 30 anos de idade, apresentaram maior risco de adquirir a infecção da cérvix uterina por HPV (RC=2,64; IC=1,32-5,27) e que, as mulheres casadas apresentaram menor risco de infecção por esse patógeno, do que as solteiras (RC=0,52; IC=0,36-0,76). Mostrou ainda que, as mulheres que estavam fazendo o exame pela primeira vez na vida, apresentaram maior risco de infecção por HPV, tomando-se como referência aquelas que já haviam feito o exame anteriormente (RC=1,75; IC=1,18-2,60), bem como aquelas que declararam fazer o exame anualmente (RC=2,04; IC=1,34-3,09). As características étnicas e o grau de instrução não apresentaram nas mulheres deste estudo, qualquer evidência de aumento de risco para a infecção por HPV (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação das variáveis sócio-demográficas em função da presença do HPV

Variáveis sócio-demográficas	Resultado da PCR para HPV				RC	IC
	Negativo		Positivo			
Idade (anos)	N	%	N	%		
≤ 30	197	65,0	106	35,0	2,64	[1,32-5,27]*
31 – 40	103	74,1	36	25,9	1,72	[0,81-3,64]
41 – 50	76	77,5	22	22,4	1,42	[0,63-3,17]
≥ 51	54	83,1	11	16,9	1	[Referência]
Etnia						
Branca	139	66,2	71	33,8	1	[Referência]
Não branca	291	73,6	104	26,3	0,70	[0,49-1,00]
Estado civil						
Solteira	133	63,3	77	36,7	1	[Referência]
Casada	263	76,6	80	23,3	0,52	[0,36-0,76]*
Outros	34	65,4	18	34,6	0,91	[0,48-1,73]
Grau de instrução						
Sem instrução ou elementar	194	72,6	73	27,3	0,90	[0,31-2,65]
Fundamental completo	133	67,2	65	32,8	1,17	[0,40-3,47]
Médio completo	91	74,0	32	26,0	0,84	[0,28-2,58]
Superior	12	70,6	5	29,4	1	[Referência]
Faz o exame preventivo						
Está fazendo pela primeira vez	91	61,9	56	38,1	1,75	[1,18 - 2,60]*
Já tinha feito antes	339	74,0	119	26,0	1	[Referência]
Freqüência que faz o exame						
Está fazendo pela primeira vez	91	61,9	56	38,1	2,04	[1,34 - 3,09]*
Faz uma vez por ano	265	76,9	80	24,6	1	[Referência]
Faz a cada dois anos	50	66,7	25	33,3	1,66	[0,96 - 2,85]
Faz a cada três anos	10	62,5	6	37,5	1,99	[0,70 - 5,64]
Faz a cada quatro anos ou mais	14	63,6	8	36,4	1,89	[0,77 - 4,67]

* Estatisticamente significativo

A análise dos fatores de risco considerados, em função da presença de infecção da cérvix uterina por HPV, revelou que apenas a idade cronológica e o relacionamento com múltiplos parceiros sexuais apresentaram associação com a detecção do DNA viral. A infecção foi mais prevalente nas mulheres mais jovens, diminuindo, em seguida com o aumento da idade. As mulheres com até 30 anos de idade, apresentaram maior risco de adquirir infecção por HPV, tomando-se como referência, aquelas com idade acima de 50 anos (RC=2,64; IC=1,32-5,27). As mulheres que admitiram relacionamento sexual com três, ou mais parceiros ao longo da vida apresentaram maior risco de infecção por HPV, tomando-se como referência aquelas que se declararam monogâmicas (RC=1,87; IC=1,21-2,90). A idade do primeiro intercuro sexual e da primeira gestação, o número de gestações, a prática do tabagismo, e o uso de algum tipo de contraceptivo oral não apresentaram evidência de aumento de risco para aquisição da infecção pelo HPV. A infecção da cérvix uterina pela *C. trachomatis*, apesar de ter ficado próximo do limite de

significância estatística (RC=1,66; IC=0,79-3,58), não aumentou de risco para a infecção da cérvix uterina pelo HPV (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação dos fatores de risco considerados em função da presença do HPV

Fatores de risco	Resultado da PCR para HPV				RC	[IC]
	Negativo		Positivo			
Idade (anos)	N	%	N	%		
≤ 30	197	65,0	106	35,0	2,64	[1,32 – 5,27]*
31 – 40	103	74,1	36	25,9	1,72	[0,81 – 3,64]
41 – 50	76	77,5	22	22,4	1,42	[0,63 – 3,17]
≥ 51	54	83,1	11	16,9	1	[Referência]
Idade da 1ª Relação						
≤ 17	247	71,8	97	28,2	1,07	[0,64 - 1,79]
18 – 20	115	68,4	53	31,5	1,25	[0,71- 2,2]
> 20	68	73,1	25	26,9	1	[Referência]
Idade da 1ª Gestação						
Não teve	77	70,6	32	29,3	1,01	[0,59 – 1,73]
≤ 17	136	72,3	52	27,6	0,93	[0,58 – 1,48]
18 – 20	108	70,1	46	30,0	1,03	[0,63 – 1,68]
> 20	109	70,8	45	29,2	1	[Referência]
Nº Gestações						
0	60	68,2	28	31,8	1	[Referência]
1 – 3	240	70,4	101	29,6	0,90	[0,54 – 1,49]
4 – 6	82	70,1	35	29,9	0,91	[0,50 – 1,66]
≥ 7	48	81,3	11	18,6	0,49	[0,22 – 1,09]
Nº Parceiros sexuais						
1	229	72,9	85	27,1	1	[Referência]
2	129	76,3	40	23,7	0,84	[0,54 – 1,29]
≥ 3	72	59,0	50	41,0	1,87	[1,21 – 2,90]*
Tabagismo						
Sim	76	71,0	31	29,0	1,0	[0,63 – 1,58]
Não	354	71,1	144	29,0	1	[Referência]
Uso de contraceptivos						
Sim	298	69,8	129	30,2	1,24	[0,84 – 1,84]
Não	132	74,1	46	25,8	1	[Referência]
C. trachomatis						
Sim	18	60,0	12	40,0	1,68	[0,79 – 3,58]
Não	412	71,6	163	28,3	1	[Referência]

* Estatisticamente significativo

4. DISCUSSÃO

Análise dos questionários individuais das pacientes mostrou que o perfil sócio-demográfico do segmento da população estudado caracterizou-se pela presença de uma proporção significativa de mulheres jovens (50,1%) com idade até 30 anos, média geral de 33,5 anos, sendo a maioria formada por mulheres de etnia não brancas, casadas, e com grau de instrução máxima correspondente ao ensino fundamental e eram não fumantes. No que se refere às atividades sexual e reprodutiva, a maioria das mulheres participantes deste estudo, iniciou a vida sexual com menos de 18 anos, teve apenas um parceiro ao longo da vida, usou algum tipo de contraceptivo oral e teve entre uma e três gestações.

Com relação à realização do exame citológico de Papanicolaou, visando à prevenção do câncer de colo do útero, uma parcela expressiva das mulheres pesquisadas (29,3%), declarou estar fazendo o exame pela primeira vez. Isto se deve provavelmente, à elevada proporção de mulheres neste grupo (43,5%), com idade menor ou igual a 20 anos. A maioria das mulheres analisadas (57,0%) afirmou que realiza o exame citológico uma vez por ano. No entanto, mesmo quando se adicionou a este grupo as mulheres que disseram ter feito esse exame, com intervalo de no máximo três anos, frequência considerada aceitável pelo Ministério da Saúde, para as mulheres que tiveram resultado negativo no último exame realizado, apenas 72,0% se enquadram nessa condição. Isto significa que, uma parcela importante das mulheres (28,0%), não está realizando o exame preventivo com a frequência mínima preconizada pelo Ministério da Saúde, revelando a necessidade da intervenção por meio de ações educativas, visando melhorar a conscientização das mulheres para realização do exame preventivo.

A prevalência de alterações da cérvix uterina, detectadas por meio do exame citológicos de Papanicolaou, nas mulheres deste estudo, foi de 6,6%, sendo 2,5% de ASC-US e 4,1% de LSIL, índices um pouco acima da média dos encontrados pelos laboratórios brasileiros 1,26% e 0,84%, respectivamente, conforme registros do DataSUS, o que corroboram com os achados de Thuler *et al.*, (2007), os quais indicam que 40% dos laboratórios do Rio Grande do Norte apresentam um percentual de alterações citológicas acima da média do país.

Os resultados deste estudo são semelhantes ao obtidos por Rama e colaboradores *et al.* (2008) em São Paulo para mulheres com citologia dentro dos padrões de normalidade (92,2%), porém diferente em relação àquelas que apresentaram alterações citológicas classificadas como ASC-US e LSIL, 1,4% e 3,8%, respectivamente.

Das características sócio-demográficas analisadas, apenas a idade e a frequência com que a mulher realiza o exame citológico de rotina, apresentaram associação com a ocorrência de alterações da cérvix uterina. As mulheres com até 30 anos de idade apresentaram proporções significativamente maiores de alterações citológicas, tanto de ASC-US, como de LSIL, quando comparadas aquelas de outras faixas etárias. Por outro lado, as mulheres que disseram realizar o exame citológico uma vez por ano, apresentaram proporções significativamente menores de LSIL, tomando-se como parâmetro aquelas que declararam estar fazendo o exame pela primeira vez. Resultado semelhante foi observado para as mulheres que afirmaram realizar o referido procedimento a cada quatro anos ou mais. No entanto, essa diferença não foi significativa quando comparadas com as mulheres que disseram realizar o exame a cada dois ou três anos.

Dos fatores de risco considerados, apenas a infecção por HPV apresentou associação com a ocorrência de alterações citológicas da cérvix uterina, observando-se uma proporção significativamente maior de lesões classificadas com LSIL, quando se comparou com as mulheres que apresentaram teste negativo para detecção do DNA viral. A idade do primeiro intercurso sexual, da primeira gestação, o número de gestações, a prática do tabagismo, uso de contraceptivos orais e a infecção da cérvix uterina por *C. Trachomatis* não apresentaram, neste estudo, qualquer evidência de associação com ocorrência de alterações citológicas detectadas por meio do exame de Papanicolaou.

A prevalência da infecção por HPV nas mulheres com citologia normal ou com alterações benignas foi de 26,7%, índice semelhante aquele encontrado por Fernandes *et al*, 2008, em estudo realizado em mulheres de Natal. Não foi observada diferença de prevalência da infecção pelo HPV entre as mulheres com citologia normal e aquelas com ASC-US. A prevalência da infecção por HPV nas mulheres com lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LSIL) foi de 80,0% apresentando valor bem acima daquele encontrado por Fernandes *et al.*, (2008), em mulheres de Natal que foi de 59,8%. A alta prevalência da infecção pelo HPV nas mulheres normais ou com alterações benignas pode ser devido à elevada proporção na amostra estudada, de mulheres que iniciaram a atividade sexual antes de completar 18 anos, uma fase da vida da mulher em que vulnerabilidade biológica ao vírus é maior. Isto também pode se atribuído, pelo menos em parte, a possíveis resultados falso-negativos no exame citológico. Além disso, as infecções persistentes causadas por HPV de alto risco, podem ser manter na forma latente por períodos de tempos variados, sem apresentar qualquer tipo de alteração (TROTTIER; FRANCO, 2006).

A análise das características sócio-demográficas do segmento da população estudado em relação ao risco de aquisição de infecção da cérvix uterina por HPV, revelou que as mulheres com idade até 30 anos apresentaram chance quase três vezes maior de se infectar por esse patógeno, tomando-se como referência as mulheres com idade superior a 50 anos. Resultados semelhantes aos obtidos por Ferreccio *et al.*, (2008) em mulheres chilenas e por Roteli-Martins *et al.*, (2007) nas de Porto Alegre, São Paulo e Campinas. As mulheres casadas apresentaram menor risco de se infectarem pelo HPV que as solteiras. Esses resultados são concordantes com aqueles obtidos por Fernandes *et al.*, (2008) para mulheres de Natal. A maior prevalência da infecção nas mulheres solteiras se deve, possivelmente, a maior liberdade para relacionamentos sexuais com um maior número de parceiros, quando comparadas às casadas ou que mantém relacionamentos estáveis.

Com relação à frequência de realização do exame preventivo e o risco de infecção, constatou-se que, as mulheres que estavam fazendo o procedimento pela primeira vez, apresentaram chance quase duas vezes maior de infecção, quando comparadas àquelas que disseram já ter feito o exame anteriormente. A estratificação das mulheres que já haviam feito o exame outras vezes, pelos diferentes intervalos de tempos entre um exame e outro, revelou que somente as mulheres que estavam fazendo o exame pela primeira vez, apresentaram maior risco de infecção, tomando-se como referência aquelas que fazem o exame uma vez por ano. Isto pode ser explicado pela maior incidência da infecção por HPV em mulheres jovens (BASEMAN; KOUTSKY, 2005), com é o caso daquelas que compõem este grupo, bem como pelo fato de grande parte dessas mulheres só vieram a realizar o exame preventivo pela primeira vez, alguns anos após o início da atividade sexual, ou seja, após um certo período de exposição ao vírus.

Das variáveis consideradas como fatores de risco analisadas neste estudo, somente a idade cronológica e o relacionamento sexual com múltiplos parceiros ao longo da vida, apresentaram associação com maior risco de infecção pelo HPV. As mulheres com idade até 30 anos foram aquelas que apresentaram maior risco de adquirir a infecção, observando-se uma tendência de redução dos índices de prevalência com o aumento da idade. Esses resultados são concordantes com aqueles obtidos em outros estudos (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; TROTTIER; FRANCO, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008), exceto que neste estudo não foi observada a ocorrência de um segundo pico de incidência da infecção após a menopausa. Acredita-se que isto se deve ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa que pode resultar na cura da infecção ou a manutenção do vírus em estado de latência, seguida de reativação após a

menopausa, devida a redução da imunidade específica ou a aquisição de nova infecção (TROTTIER; FRANCO, 2006).

O relacionamento sexual com três ou mais parceiros, ao longo da vida aumentou quase duas vezes a chance de adquirir a infecção pelo HPV, semelhante ao observado em outros estudos (FERRECCIO *et al.*, 2008; NAUD *et al.*, 2006). A idade do primeiro intercurso sexual, da primeira gestação, o número de gestações, tabagismo, uso de contraceptivos orais e infecção cervical por *C. trachomatis*, não apresentaram evidências de aumento de risco para a aquisição de infecção pelo HPV, resultados semelhantes aos observados por Fernandes *et al.* (2008), para mulheres de Natal.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BASEMAN, J.G.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, 32S: S16 - S24, 2005.

BOSCH, F.X.; SANJOSÉ. S. Chapter 1: Human papillomavírus and cervical cancer-burden and assessment of casuality. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 31: 3 –13, 2003.

BURD EM. Human papillomavírus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 1 – 17, 2003

COELHO. F.R. *et al. Brazilian Journal Medicine Biology Review*, 37: 83 – 88, 2004.

COGLIANO, V. *et al.* Carcinogenicity of human papillomaviruses. **The lancet**, 6 (4): 2004, 2005.

DE RODA HUSMAN, A.M. *et al.* The use of general primers GP5/GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequence improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, 76:1057-1062, 1995.

FERNANDES, A.A.M.F.; *et al.*, Human Papillomavirus in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39: 573-578, 2008.

FERRECCIO, C. *et al.*, Baseline assessment of prevalence and geographical distribution of HPV types in Chile using self-collected vaginal samples. **BMC Public Health**. 8:78. 2008.

GAHLINGER, P.M.; ABRAMSON, J.H. Computer programs for epidemiologic analysis: **PEPI, Stoen Mountain: USD**, 1995.

INCA, 2007. **Estimativas 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94p. ISBN 978-85-7318-126-5.

MEYERS C, MAYER TJ, OZBUN MA. Synthesis of infectious human papillomavírus type 18 in differentiating epithelium trnasfected with viral DNA. **Journal of Virology**, 71: 7381-7386, 1997.

MONSONEGO. J. *et al.* Cervical cancer control, priorities and dew directions. **International Journal of cancer**, 108: 329 – 333, 2004.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, 19: 1- 5, 2000.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, 348:518-27, 2003.

MUÑOZ, N. *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** 24 s3: s3/1 – s3/10, 2006.

NAUD, P. *et al.* Factors predicting intermediate endpoints of cervical cancer and exposure to human papillomavirus (HPV) infections in young women screened as potential targets for prophylactic HPV vaccination in south of Brazil. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 124: 110–118. 2006.

RAMA, C. *et al.* Previous screening for cervical cancer among women with cytological and histological abnormalities. **Rev. Saúde Pública**. 42 (3): 411-419. 2008.

ROTELI-MARTINS, C.M. *et al.* Association between age at first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection: results of a Brazilian screening program. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 29(11):580-587. 2007.

SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230:1350 –1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 Ed., **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1992.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17: 915 – 919, 1994.

SELLORS, J.W. *et al.* Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **Canada Medicine Association Journal**, 168 (4): 421 – 425, 2003.

STEENBERGEN, R.D. *et al.* HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **Journal of Clinical Virology**, 32S: S25 – S33, 2005.

THULER, L.C.S.; ZARDO, L.M.; ZEFERINO, L.C. Assessment of cytology laboratory performance within the Brazilian Unified Health System. **J Bras Patol Med Lab**. v. 43. n. 2. p. 103-114. 2007.

TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine** 24S1:S1/4-S1/15. 2006.

VILLA, L.L. O Papel do Papilomavírus na Neoplasia Genital Feminina. In: ABRÃO, F.S. **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**. Ed Roca, São Paulo SP, p. 39-48, 1995.

VILLA, L.L. *et al.* Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference HPV 2001. **Virus Research**, 89: 163 – 173, 2002.

Capítulo 4

Perspectivas Futuras

Tipagem dos HPVs e análise molecular das variantes de HPV16

As amostras positivas para HPV no teste de triagem serão submetidas a uma nova amplificação por PCR utilizando o sistema GPMY09/11 e os produtos da reação serão enviados ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer (São Paulo), onde serão tipados por hibridização *dot blot* com sondas específicas e seqüenciados pela equipe da Dra. Luisa Lina Villa. As amostras positivas para o HPV16 serão seqüenciadas para a identificação de possíveis variantes deste genotipo viral.

APÊNDICES

Apêndice I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte a respeito da pesquisa intitulada:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Parecer 115 – 2007 (Final)

Protocolo nº:	028/07 – CEP – UFRN
Folha de Rosto e CAAE:	FR - 128443 – CAAE – 0034.0.051.000-07
Projeto de Pesquisa:	Análise do perfil epidemiológico da infecção por HPV na população feminina do Estado do Rio Grande do Norte.
Grupo:	III
Área de Conhecimento:	Ciências da Saúde – Medicina Preventiva
Pesquisador Responsável:	José Veríssimo Fernandes
Instituição Onde Será Realizado:	Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN
Período de coleta de dados:	Março de 2007 a dezembro de 2008
Número Total de sujeitos:	711 (mulheres entre 18 e 69 anos)
Revisão Ética em	26 de junho de 2007

RELATO

Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

Orientações ao Pesquisador: em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatórios parciais semestralmente e final (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.65);

O formulário para o Relatório Final está disponível na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br)

Natal, 26 de junho de 2007.


Dulce Almeida

Vice-Coordenadora do CEP-UFRN

Apêndice II – Modelo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação do projeto.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
Responsável pelo Projeto Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes
Telefones: 3211 - 9210 ou 3215 – 3437, Ramal 205
E-mail: veris@cb.ufrn.br

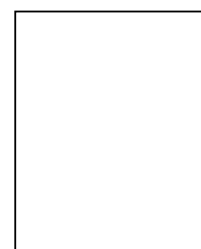
CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO:

Declaro que estou de acordo em participar do presente estudo, e que estou respondendo de livre e espontânea vontade, as perguntas contidas no presente questionário. Fui devidamente esclarecida sobre os objetivos da pesquisa e o destino das informações prestadas ao entrevistador. A minha participação não implicará em custos ou prejuízos, sejam de caráter econômico, social, psicológico ou moral, nem receberei qualquer pagamento pela minha participação. Estou ciente de que posso me negar a participar da referida pesquisa, se assim o desejar e que será mantido o anonimato e o sigilo referente a minha identificação bem como das informações por mim prestadas durante a entrevista.

Número da entrevistada: _____

Assinatura da doadora

Assinatura do tutor ou responsável (no caso das menores de idade)



Polegar Direito

Assinatura de uma testemunha

COMPROMISSO DO PESQUISADOR:

Asseguramos que as questões acima referidas foram discutidas previamente com cada indivíduo e feitos os esclarecimentos necessários, por isso, consideramos que, os propósitos da presente pesquisa foram compreendidos pela pessoa abordada a qual decidiu colaborar de livre e espontânea vontade prestando as informações solicitadas, a quais serão necessárias à realização do estudo. Reafirmamos que será garantido o sigilo sobre as informações prestadas por ocasião da entrevista.

Assinatura do Pesquisador:

Data ____/____/____

Apêndice III – Questionário para obtenção dos dados sobre os Conhecimentos, atitudes e prática do exame de Papanicolaou entre mulheres de São José de Mipibu-RN.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
Responsável pelo Projeto Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes
E-mail: veris@cb.ufrn.br, Telefone: 3215 - 3437, Ramal 205

Questionário Epidemiológico para avaliação do grau de conhecimento sobre o exame citológico

Atenção: em primeiro lugar o entrevistador deve se apresentar e explicar o objetivo da pesquisa e sua importância e em seguida, perguntar se a pessoa deseja participar, esclarecendo que **não precisa se identificar** e que ela deve responder as perguntas de acordo com seu entendimento sobre o assunto, sem nenhuma preocupação. Após responder ela deve assinar o termo de concordância.

As perguntas formuladas no presente questionário devem ser feitas pelo entrevistador com o máximo de cuidado para evitar influenciar a resposta das entrevistadas. Fazer a pergunta e esperar a resposta sem interferência.

Número entrevista: _____ Data da coleta ____/____/____

Local onde a pessoa mora: _____

1. Qual a sua idade? _____ anos

2. Qual o seu estado civil?

Solteira Casada Viúva Divorciada Outros

3. Qual a sua escolaridade?

Nunca estudou Ensino fundamental incompleto Ensino fundamental completo
 Ensino médio incompleto Ensino médio completo Ensino superior

4. Trabalha fora?

Não Sim. Qual a profissão? _____

5. Qual a sua renda familiar aproximada, em salários mínimos?

Menos de um Um Dois Três Quatro Cinco Mais de cinco.

6. Qual a sua religião?

Católica Evangélica Espírita Outras Não tem religião

7. Tem vida sexual ativa:

Não Sim

8. Já teve filhos?

Não Sim. Quantos filhos teve? _____

9. Teve algum aborto?

Não Sim. Quantos?: _____

10. Usa método contraceptivo?

Não Sim. **Qual destes abaixo relacionados?**

Laqueadura de trompas Diu Camisinha Pílula anticoncepcional Outros

11. Procurou os serviços de saúdes nestes últimos 12 meses?

Não Sim

12. Foi ao ginecologistas nestes últimos 12 meses?

Não Sim

13. Tem conhecimento da existência de um exame ginecológico que as mulheres devem fazer?

Não Sim

Se a resposta for sim:

A. Sabe para que serve este exame? _____

B. De que forma ficou sabendo da existência dele?

Pelo seu médico Pelos agentes comunitários de saúde

Por amigas ou parentes Pela Igreja Por colegas de trabalho Na escola

No posto de saúde No rádio /TV

14. Como você considera a realização deste exame?

Desnecessária Necessária

A. Se a resposta for desnecessária, qual a principal razão para considerá-la desnecessário?

Porque não sente nada Porque este exame não evita doenças não sabe dizer

B. Se a resposta for necessária, qual a principal razão para considerá-lo necessário?

Porque previne o câncer Porque previne o câncer do colo do útero

Porque o médico falou que era importante fazer Porque uma amiga falou para fazer

O agente de saúde disse que era para fazer Outros

15. Qual a sua situação em relação ao exame?

Nunca fiz Já fiz mas deixei de fazer Já fiz e continuo fazendo

A. Se a resposta for, nunca fiz este exame, qual a principal razão para não fazê-lo?

Porque tem vergonha de fazer O seu médico não pede Porque incomoda

Porque o posto de saúde fica distante Por falta de tempo Por descuido

Não tem com que deixar as crianças Porque não pode faltar ao trabalho

B. Se a resposta for, já fiz este exame, mas deixou de fazê-lo, qual a principal razão?

Porque tem vergonha de fazer O seu médico não pede Porque incomoda

Porque o posto de saúde fica distante Por falta de tempo Por descuido

Não tem com que deixar as crianças Porque não pode faltar ao trabalho

C. Se a resposta for “já fiz e continuo fazendo”, qual a principal razão?

- Porque é gratuito Porque não incomoda Porque previne câncer do colo do útero
- Porque o médico recomendou Porque familiares ou amigos dizem para fazer
- Porque sabe que toda mulher sexualmente ativa deve fazer esse exame anualmente.

D. Se a resposta for “já fiz e continuo fazendo”, com que frequência tem realizado este exame?

- Faço uma única vez Faço a cada três anos Faço a cada dois anos
- Faço anualmente Faço semestralmente

Apêndice IV – Questionário para obtenção dos dados epidemiológicos sócio-demográficos e fatores de risco entre mulheres do município de São José de Mipibu-RN.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

Questionário Epidemiológico:

As informações aqui prestadas serão absolutamente confidenciais e acessíveis apenas às pessoas envolvidas diretamente no atendimento às pacientes e ao coordenador do projeto. Não será usado em nenhum momento nomes das pacientes em qualquer tipo de divulgação.

01. Nome: _____ Prontuário N^o: _____
02. Número da amostra: _____ Data da coleta : ____/____/____
03. Qual a sua Idade: _____ anos.
04. Município onde mora: _____ à quanto tempo: _____ anos
05. Grau de instrução: Nunca estudou Ensino fundamental incompleto Ensino fundamental completo
 Ensino médio incompleto Ensino médio completo Ensino superior
06. Estado civil: Solteira Casada Divorciada Viúva Outros
07. Em qual dessas cores você se considera: Branca Morena Mulata Parda Negra
08. Com que idade teve a primeira relação sexual: _____ anos
09. Tem ou já teve mais de um parceiro sexual ao longo da vida: Não Sim, em caso afirmativo quantos? _____
10. Já usou ou usa preservativo nas relações sexuais com parceiros não fixos: Não Sim
11. Já teve alguma gravidez: Não Sim, em caso afirmativo, quantas ? _____ com que idade engravidou pela primeira vez? _____ anos.
12. Teve algum aborto: Não Sim, se teve quantos: _____
13. Usa ou usava anticoncepcional: Não Sim, em caso afirmativos, durante quantos tempo? _____ anos
14. Faz ou já fez uso de bebida alcoólica: Sim Não, se afirmativo com que frequência:
 Todos os dia Uma vez por semana Duas vezes por semana Três vezes por semana
15. Tem o hábito de fumar: Não Sim, em caso afirmativo, há quanto tempo ----- anos e quantos cigarros fuma por dia aproximadamente? _____

16. Faz o exame de prevenção ao câncer do colo do útero: Não Sim, em caso afirmativo, com que frequência? Uma vez por ano A cada dois anos A cada três anos A cada quatro anos

17. Foi informada da importância de fazer esse exame preventivo: Não Sim, em caso afirmativo de que modo ficou sabendo: _____

18. Tem história de câncer na família: Não Sim, em caso afirmativo, que tipo de câncer? _____ e o grau de parentesco? _____