

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

FATORES DE RISCO PARA
RECIDIVA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS EM
PACIENTES INFECTADAS E NÃO-INFECTADAS
PELO HIV, SUBMETIDAS À CONIZAÇÃO POR
CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA

CLAUDIA TEIXEIRA DA COSTA LODI

Belo Horizonte
2009

CLAUDIA TEIXEIRA DA COSTA LODI

**FATORES DE RISCO PARA
RECIDIVA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS EM
PACIENTES INFECTADAS E NÃO-INFECTADAS
PELO HIV, SUBMETIDAS À CONIZAÇÃO POR
CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Programa: Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica .

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo de Melo.

Coorientadora: Prof. Dra. Márcia Antoniazi Michelin.

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG**

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Prof^a Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof^a. Elisabeth Ribeiro da Silva

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Faculdade de Medicina

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Joel Alves Lamounier

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia: João Gilberto de Castro e Silva

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Prof^a. Alamanda Kfoury Pereira

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Prof. Agnaldo Silva Filho

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Prof. Henrique Vitor Leite

Prof. Sérgio Augusto Triginelli

Prof. Victor Hugo de Melo

Francisco de Assis Nunes Pereira (Disc. Titular)

Inês Katerina Damasceno Carvalho (Disc. Suplente)



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **CLAUDIA TEIXEIRA DA COSTA LODI**, nº de registro 2007670458. Às quinze e trinta horas do dia **vinte e seis do mês de agosto de dois mil e nove** reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar em exame final, o trabalho intitulado: **“FATORES DE RISCO PARA RECIDIVA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS EM PACIENTES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV, SUBMETIDAS À CONIZAÇÃO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUENCIA ”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde da Mulher, pelo programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Reprodução Humana e Patologia Ginecológica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Victor Hugo de Melo, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Victor Hugo de Melo/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APDT</u>
Profa. Márcia Antoniazzi Michelin/co-orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Apta</u>
Prof. Fernando Marcos dos Reis	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Profa. Paula Ávila Fernandes	Instituição: UFTM	Indicação: <u>Apta</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APDT APTA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de agosto de 2009.

Prof. Victor Hugo de Melo /orientador Vic H

Profa. Márcia Antoniazzi Michelin/ Co-orientadora Marcia Antoniazzi Michelin

Prof. Fernando Marcos dos Reis Fernando Marcos dos Reis

Profa. Paula Ávila Fernandes Paula Ávila Fernandes

Prof. Antonio Carlos Vieira Cabral/Coordenador Antonio Carlos Vieira Cabral

PROF. ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina/UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Victor Hugo de Melo, Fernando Marcos dos Reis, Paula Ávila Fernandes, Márcia Antoniazi Michelin, aprovou a defesa da dissertação intitulada **“FATORES DE RISCO PARA RECIDIVA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS EM PACIENTES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV, SUBMETIDAS À CONIZAÇÃO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUENCIA”** apresentada pela mestrandia **CLAUDIA TEIXEIRA DA COSTA LODI** para obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Reprodução Humana e Patologia Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 26 de agosto de 2009.

Prof. Victor Hugo de Melo
Orientador

Profa. Márcia Antoniazi Michelin
Co-orientadora

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Profa. Paula Ávila Fernandes

Ao meu pai,
pelo seu exemplo de vida,
seu carinho, incentivo
e sua presença sempre.

A minha mãe, com saudade,
pelo seu exemplo de fé,
coragem e dedicação.

Ao meu marido, pelo incentivo,
compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos, pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e, especialmente:

Ao **Professor Dr. Victor Hugo de Melo**, meu orientador, exemplo de dedicação, pela atenção, disponibilidade, apoio e compreensão durante todas as fases deste trabalho.

À **Professora Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin**, coorientadora, pela atenção, apoio e realização de toda a técnica de biologia molecular desta pesquisa.

À **Dr^a. Maria Inês de Miranda Lima**, minha grande amiga, quem primeiro me deu a oportunidade de realizar este trabalho, pelo seu carinho, incentivo e amizade.

Ao **Professor Dr. Eddie Fernando Cândido Murta**, pela colaboração e receptividade em seu serviço.

A todos do **Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON)**, pelo carinho durante o meu período de estágio no laboratório.

Ao **Dr. Alexandre Tafuri**, que disponibilizou as peças estocadas em seu laboratório.

À direção do **Laboratório Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatologia da Regional Noroeste – SMSA/PBH**, que disponibilizou as peças estocadas naquele laboratório.

Ao **Eduardo Henrique de Oliveira**, estatístico, que me auxiliou na revisão das análises estatísticas.

A todos os **colegas do CTR-DIP Orestes Diniz**, Dr^a. Ângela Cristina Labanca de Araújo, Dr. Iwens Moreira Faria, Dr. Homero Caporali de Oliveira, Dr^a. Christine Miranda Corrêa e Dr. Benito Pio Ceccato, pelo companheirismo durante esses anos.

Às amigas, **Dr^a. Adriana Almeida de Souza Lucena**, **Dr^a. Cristiana Oliveira Rodrigues**, **Dr^a. Miriam Viviane Maciel Barros Guimarães** e **Dr^a. Nara Chartuni P. Teixeira**, pelo apoio, companheirismo e carinho.

À **Sr^a. Sônia Maria Penido de Freitas**, bibliotecária na Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, pelo auxílio em toda a revisão bibliográfica deste estudo.

À **Dr^a. Sheila Adad**, quem realizou sistematicamente todas as revisões histológicas dos blocos.

Ao **Dr. Carlos Alberto Ribeiro**, que ajudou na seleção dos blocos parafinados deste trabalho.

A todos do **NUPAD**, em especial à **Dr^a. Dora Mendes del Castillo** e **Dr^a. Nara de Oliveira Carvalho**, pelo apoio e contribuição para meu aprendizado em laboratório.

À **Prof^a. Magda Barbosa Roquette Taranto**, pela colaboração e revisão do Português.

A **todas as pacientes**, razão deste estudo, pela colaboração na realização deste projeto.

***“Não tenho um caminho novo.
O que tenho de novo é um jeito de caminhar”.***

Thiago de Melo.

RESUMO

Objetivo: avaliar os fatores de risco para recidiva de lesão intraepitelial cervical em mulheres infectadas e não-infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), submetidas à conização por cirurgia de alta frequência (CAF). **Métodos:** estudo caso-controle com 33 pacientes que apresentaram recidiva (casos) de lesão intraepitelial cervical (NIC) e 105 sem recidiva (controles), infectadas e não-infectadas pelo HIV, tratadas por CAF, no período de janeiro de 1999 a maio de 2004. O diagnóstico de recidiva foi estabelecido após biopsia. Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para detectar ácido desoxirribonucléico do papilomavírus humano (HPV DNA), usando *primers consensus* para os tipos de baixo risco 6 e 11 e para os tipos de alto risco 16, 18, 31, 33 e 35, em tecidos fixados em formol e parafinados de cone cervical. Análise estatística foi realizada usando-se teste X^2 com correção de Yates e teste exato de Fisher para comparação das variáveis categóricas. Análise multivariada foi feita por regressão logística, mantendo-se somente as variáveis significantes no modelo final ($p < 0,05$). **Resultados:** a recidiva de NIC foi mais frequente em mulheres infectadas pelo HIV ($p = 0,001$), com ocupação glandular ($p = 0,000$) e margens comprometidas ($p = 0,02$). O DNA do HPV foi positivo em 57,6% das pacientes com recidiva de NIC e em 36,4% foi negativo. Detectou-se HPV de alto risco na maioria dos casos. HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 não tiveram associação com recidiva ($p = 0,27$). A análise multivariada mostrou que infecção pelo HIV e ocupação glandular estiveram independentemente associadas à recidiva de lesão. Margens comprometidas apresentaram interação com ocupação glandular. **Conclusão:** a taxa de recidiva de NIC em mulheres infectadas pelo HIV é mais alta quando comparada com a de não-infectadas. Os fatores associados à recidiva foram a infecção pelo HIV e a ocupação glandular no cone.

Palavras-chave: Neoplasia intraepitelial cervical. Vírus da imunodeficiência humana. Cirurgia de alta frequência. Recidiva. Papilomavírus humano.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence, in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and noninfected women who underwent the loop electrosurgical excision procedure (LEEP). **Methods:** Case-control of 33 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) recurrence (cases) and 105 without recurrence (controls), HIV infected and noninfected, treated with LEEP, between January 1999 and May 2004. The diagnosis of recurrence was established after biopsy. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect human papillomavirus genome (HPV DNA), with consensus primers for low-risk types 6,11, and high-risk types 16,18,31,33,35, in formalin-fixed, paraffin-embedded cone specimens. Statistical analysis were performed using X^2 test with Yates correction and Fisher's exact test for comparison of categorical variables. Multivariate analysis was carried out using a logistic regression, keeping only significant variables ($p < 0,05$), in the final model. **Results:** Recurrence was more frequent in women HIV-infected ($p=0,001$) with glandular involvement ($p=0,000$) and compromised margins ($p=0,02$). HPV DNA was positive in 57,6% patients with CIN recurrence and 36,4% remained HPV DNA negative. High-risk HPVs were detected in most cases. HPVs 6,11,16,18,31,33,35 weren't associated with recurrence ($p=0,27$). A multivariate analysis showed that HIV-infection and glandular involvement were independently associated with recurrence of lesions. Compromised margins were interrelated with glandular involvement. **Conclusions:** Recurrence rate of CIN in HIV-infected women was higher than in HIV-negative women. The factors associated with recurrence were HIV infection and glandular involvement in cone biopsy.

Keywords: Cervical intraepithelial neoplasia. Human papillomavirus. Loop electrosurgical excision procedure. Recurrence. Human immunodeficiency virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Representação esquemática do genoma do HPV.....	21
FIGURA 2 Microtubo com corte do material parafinado.....	44
FIGURA 3 Microtubo com as três fases de separação da mistura para extração do DNA.....	45
FIGURA 4 Lavagem do DNA precipitado com solução de citrato de sódio e etanol.....	46
FIGURA 5 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	48

Gráfico

GRÁFICO 1 Comparação entre o resultado histopatológico da biopsia e da CAF nas pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV.....	56
---	----

Quadros

QUADRO 1 Classificação filogenética e epidemiológica dos HPV's anogenitais.....	22
QUADRO 2 Sequência dos <i>Primers</i>	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Análise de média de idade, paridade e início da atividade sexual e número de parceiros entre as pacientes infectadas e não-infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.....	53
TABELA 2 Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a variável vírus da imunodeficiência humana.....	54
TABELA 3 Comparação entre citologia, colposcopia, resultado da biopsia e histopatológico da CAF, segundo o vírus da imunodeficiência humana.....	55
TABELA 4 Comparação entre as características histopatológicas do cone, segundo o vírus da imunodeficiência humana.....	56
TABELA 5 Comparação entre o resultado da PCR para HPV, segundo o vírus da imunodeficiência humana.....	57
TABELA 6 Comparação entre as pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV em relação à recidiva ou não de NIC.....	58
TABELA 7 Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a recidiva ou não de NIC.....	59
TABELA 8 Comparação da citologia, colposcopia, resultado da biopsia e histopatológico da CAF, segundo a recidiva ou não de NIC.....	60
TABELA 9 Comparação entre as características histopatológicas do cone cervical, segundo a recidiva ou não de NIC.....	61
TABELA 10 Comparação entre o resultado da PCR para HPV, segundo a recidiva ou não de NIC.....	62
TABELA 11 Modelo inicial da análise multivariada, segundo a recidiva ou não de NIC.....	63
TABELA 12 Modelo final da análise multivariada para recidiva ou não de NIC.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
CAF	Cirurgia de alta frequência
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CEP-SMSA/PBH	Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Belo Horizonte
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infeciosas e Parasitárias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dp	Desvio-padrão
DST	Doença sexualmente transmissível
HAART	Terapia antirretroviral potente
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IC	Intervalo de confiança
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
JEC	Junção escamo-colunar
LEEP	<i>Loop electrosurgical excision procedure</i>
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MgCl	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC 1	Neoplasia intraepitelial cervical grau leve
NIC 2	Neoplasia intraepitelial cervical grau moderado
NIC 3	Neoplasia intraepitelial cervical grau acentuado
°C	Grau Celsius
OR	<i>Odds ratio</i>

p53	Proteína 53
PAM	Posto de Atendimento Médico
PBH	Prefeitura de Belo Horizonte
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRb	Proteína do retinoblastoma
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RFLP	Análise do polimorfismo nos fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Risco relativo
SMSA	Secretaria Municipal de Saúde
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSCP	Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples
TA	Temperatura de anelamento
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UI	Unidade internacional
WHO	<i>World Health Organization</i>
xg	Unidade de medida da força centrífuga

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Papilomavírus humano (HPV).....	21
2.1.1 Métodos de detecção do HPV.....	24
2.1.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	24
2.2 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC).....	26
2.2.1 Tratamento da neoplasia intraepitelial cervical.....	28
2.3 HPV e NIC.....	28
2.4 Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	30
2.5 Coinfecção HIV/HPV.....	31
2.6 NIC na paciente infectada pelo HIV.....	33
2.7 Recidiva da neoplasia intraepitelial cervical (NIC).....	34
3 OBJETIVOS.....	38
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	39
4.1 Desenho do estudo.....	39
4.2 Pacientes.....	40
4.2.1 Critérios de inclusão.....	41
4.2.2 Critérios de exclusão.....	41
4.3 Métodos.....	42
4.3.1 Teste de triagem sorológica para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	42
4.3.2 Conização por cirurgia de alta frequência (CAF).....	42
4.3.3 Análise microscópica.....	43
4.3.4 Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	43
4.3.4.1 Desparafinação.....	43
4.3.4.2 Extração do DNA.....	44
4.3.4.3 Método de detecção viral.....	46

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

4.4 Análise estatística.....	49
4.4.1 Cálculo amostral.....	49
4.4.2 Análise univariada.....	51
4.4.3 Análise multivariada.....	51
4.5 Considerações éticas.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Primeira etapa de análise dos resultados	53
5.1.1 Análise descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não- infectadas pelo HIV.....	53
5.2 Segunda etapa de análise dos resultados.....	58
5.2.1 Análise univariada dos grupos de pacientes infectadas e não- infectadas pelo HIV em relação à recidiva ou não de neoplasia intraepitelial cervical.....	58
5.2.2 Análise multivariada.....	62
6 DISCUSSÃO.....	65
6.1 Análise dos grupos de pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV..	65
6.2 Análise dos grupos em relação à ocorrência ou não de recidiva de NIC.	68
6.3 Comentários e sugestões finais.....	72
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS E APÊNDICES.....	93

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas do colo uterino é a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo e a primeira em países em desenvolvimento (FERLAY;BRAY;PISANI;PARKIN, 2001; FERLAY, AUTIER, BONIOL, 2007; QUEIROZ, 2007; WALBOOMERS *et al.* 1999; ZUR HAUSEN, 2009). Estatísticas atuais mostram que 80% dos casos novos ocorrem nesses países (FERLAY;BRAY;PISANI;PARKIN, 2001). A elevada prevalência em países em desenvolvimento pode ser atribuída ao acesso limitado das mulheres aos programas de *screening* e também a fatores epidemiológicos como estado nutricional e alta paridade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No Brasil, essa doença está em segundo lugar, só perdendo para o câncer de mama. Apresenta, na maioria dos casos, evolução lenta e sua prevenção consiste em identificar o mais precocemente possível as lesões atípicas no epitélio do colo uterino por meio de exames como Papanicolaou, histopatologia, além de métodos de biologia molecular que identificam a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) viral nos tecidos (BEZERRA *et al.*, 2005).

O carcinoma de células escamosas do colo uterino desenvolve-se a partir de lesões pré-cancerosas bem definidas, com potencial para progredir para doença invasiva se não forem detectadas e tratadas precocemente. Existem evidências epidemiológicas de que a infecção persistente, com alta carga viral por tipos oncogênicos do papilomavírus humano (HPV) desempenha papel preponderante no desenvolvimento do câncer do colo uterino, sendo esse vírus detectado em quase todas as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas cervicais (QUEIROZ, 2007).

Já são conhecidos outros fatores de risco para lesões cervicais, tais como doenças sexualmente transmissíveis (DST), condições infecciosas e reativas locais, hábitos sexuais (início precoce e multiplicidade de parceiros), tabagismo e uso de anticoncepcionais orais. Carências nutricionais, receio da paciente em

realizar exame e dificuldade de acesso aos serviços de saúde podem ser considerados dificultadores do diagnóstico precoce (LOPES; SOUZA, 1995).

Desde 1989 tem-se observado que mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam significativo aumento do risco de desenvolver neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Também as taxas de recidiva de NIC após tratamento nessas mulheres são elevadas, quando comparadas às de não-infectadas; e a recidiva está relacionada ao estado imunológico desse grupo de alto risco, como carga viral para HIV e uso de esquemas terapêuticos tríplices de antirretrovirais (HAART) (DAVIS *et al.*, 2001; HEARD *et al.*, 2002; MINKOFF *et al.*, 2001; PALEFSKY *et al.*, 1999; ROBINSON *et al.*, 2001). Existe, ainda, maior prevalência do HPV em mulheres infectadas pelo HIV quando comparadas às não-infectadas (ELLERBROCK *et al.*, 2000; MANDELBLATT *et al.*, 1992; PALEFSKY *et al.*, 1999). Além disso, o controle clínico e laboratorial da paciente infectada pelo HIV, a partir das dosagens de CD4+, CD8 e carga viral, parece estar intimamente relacionado à persistência e à recidiva de lesão (TATE; ANDERSON, 2002).

Sabe-se que a imunodepressão consequente à infecção pelo HIV é um dos fatores de risco para a alta prevalência da infecção pelo HPV e favorecimento de tipos oncogênicos (SUN *et al.*, 1997).

Estudo nacional avaliou a incidência de recidiva de NIC pós-conização realizada pela cirurgia de alta frequência (CAF), num trabalho prospectivo em dois grupos distintos: pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV. Concluiu-se que a ocupação glandular na peça cirúrgica, margens comprometidas e infecção pelo HIV foram os fatores associados a maior taxa de recidiva de lesões (LIMA *et al.* 2006; 2009).

Baseado nessas observações, este trabalho avalia o HPV como mais um fator de risco para recidiva de NIC nesses dois grupos (análise que não foi realizada previamente). Para tal, utilizou-se o material coletado para este estudo (tese de doutorado da Dr^a. Maria Inês Miranda Lima), numa pesquisa retrospectiva das

peças cirúrgicas de CAF, detectando o HPV pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus humano (HPV)

Os papilomavírus humanos (HPV) são transmitidos sexualmente, mais comuns em indivíduos jovens e sexualmente ativos de ambos os sexos (SAN JOSÉ *et al.*, 2007). É um agente infeccioso epiteliotrópico pertencente à família *Papillomaviridae* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 1999). Possuem no genoma cerca de 8.000 pares de bases de DNA circular de dupla-fita. Sua organização genômica pode ser dividida em três regiões distintas: L (*late*: região tardia), com duas estruturas: L1, utilizada para a tipagem do HPV, e L2; E (*early*: região precoce), com seis estruturas - E1, E2, E4, E5, E6 e E7, sendo que E5, E6 e E7 desempenham importante papel na carcinogênese, pela sua interação com as proteínas supressoras de tumor - proteína 53 (p53) e proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em atividade transcricional descontrolada e replicação alterada de DNA e divisão celular; e R (região regulatória) (FIG. 1) (CAMPOS *et al.*, 2005; FAUSCH *et al.*, 2002; ZUR HAUSEN, 2000).

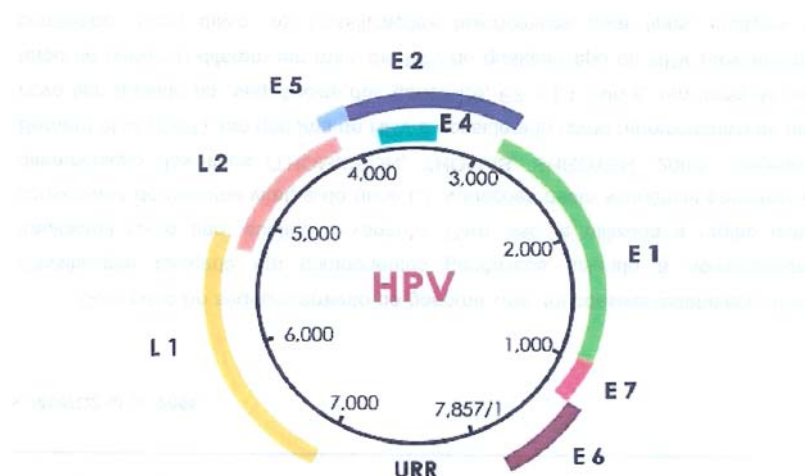


FIGURA 1 - Representação esquemática do genoma do HPV.

Fonte: Munoz *et al.* (2006).

No momento, são conhecidos mais de 230 tipos de HPV com base na sequência do DNA viral (HAWS *et al.*, 2004); 118 genótipos estão bem caracterizados, de acordo com o nicho biológico, potencial oncogênico e posição filogenética (CHAN *et al.*, 1995; de VILLIERS *et al.*, 2004). O QUADRO 1 resume a classificação epidemiológica e filogenética dos HPVs anogenitais proposta por Munoz *et al.* (2006).

QUADRO 1
Classificação filogenética e epidemiológica dos HPVs
anogenitais

HPV Espécies (alpha)	HPV Genótipo	RISCO	HPV Espécies (alpha)	HPV Genótipo	RISCO	HPV Espécies (alpha)	HPV Genótipo	RISCO
1	{ HPV 32 HPV 42	indeterminado	6	{ HPV 30 HPV 53 HPV 56 HPV 66	indeterminado	10	{ HPV 6 HPV 11 HPV 13 HPV 74 HPV 44 HPV 55	baixo
		baixo			provável alto			baixo
2	{ HPV 28 HPV 3 HPV 10 HPV 29 HPV 77	indeterminado	7	{ HPV 59 HPV 18 HPV 45 HPV 70 HPV 39 HPV 68 HPV 85	alto	11	{ HPV 34 HPV 73	indeterminado
		indeterminado			alto			provável alto
		indeterminado			baixo			alto
		indeterminado			alto			provável alto
3	{ HPV 61 HPV 72 HPV 62 HPV 81 HPV 83 HPV 89 HPV 84 HPV 86 HPV 87	baixo	8	{ HPV 91 HPV 7 HPV 40 HPV 43	indeterminado	13	{ HPV 54	baixo
		baixo			indeterminado			baixo
		indeterminado			indeterminado			baixo
		baixo			baixo			baixo
		indeterminado			baixo			baixo
		indeterminado			baixo			baixo
4	{ HPV 57 HPV 2a HPV 27	indeterminado	9	{ HPV 52 HPV 67 HPV 33 HPV 58 HPV 16 HPV 31 HPV 35	alto	15	{ HPV 71 HPV 90	indeterminado
		indeterminado			indeterminado			indeterminado
		indeterminado			alto			indeterminado
5	{ HPV 26 HPV 69 HPV 51 HPV 82	provável alto			alto			alto
		indeterminado			alto			alto
		alto			alto			alto
		provável alto			alto			alto

Fonte: Munoz *et al.* (2006).

Aproximadamente 40 tipos são comumente encontrados no trato genital (de VILLIERS, 2001; LEVI *et al.*, 2002; LORINCZ *et al.*, 1992). Os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 são considerados oncogênicos ou de

alto risco, por estarem associados a lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (HSIL) ou câncer. Os tipos 26, 53 e 66 são provavelmente carcinogênicos, enquanto os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e *cond*HPV89/Cp6108 são tidos como de baixo risco, presentes nas verrugas genitais e nas lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau (LSIL) (BOSCH *et al.*, 2002; CLIFFORD; GONÇALVES; FRANCESCHI, 2006; HARRIS *et al.*, 2005; LEVI *et al.*, 2002; MCMURRAY *et al.*, 2001; MUNOZ *et al.*, 2003; 2006; NOMELINI *et al.*, 2007; QUEIROZ, 2007).

Os HPV 16 e 18 são os mais prevalentes e relacionados à persistência e progressão da lesão cervical, quando comparados com outros tipos de alto risco (THOMISSON; THOMAS; SHROYER, 2008), sendo o HPV 16 mais oncogênico (GÖK *et al.*, 2007). Os tipos 31, 33 e 45 aparecem em seguida, embora a ordem varie entre diferentes regiões (MEIJER; SNIJDERS; CASTLE, 2006). Nas Américas do Sul e Central, os tipos mais prevalentes são 16, 18, 31, 33 e 45 (BOSCH *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2006). No Brasil, estudos de prevalência mostram que o HPV 16 é o mais encontrado, embora com variações regionais em relação aos outros tipos (RABELO-SANTOS *et al.*, 2003). Estudo realizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais constatou que os genótipos mais frequentes foram os tipos 6, 11, 16 e 33 (ZIMMERMANN; MELO, 2002). Nos casos de adenocarcinomas ou carcinomas adenoescamosos, a prevalência do HPV é em torno de 90%, sendo o tipo 18 o mais frequente (HUANG *et al.*, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2001; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Hoje está bem estabelecida a relação causal de alguns tipos de HPV com o câncer cervical (HERRERO; MUNOZ, 2000; KOUTSKY, 1997; MOHAR; FRIAS-MENDIVIL, 2000; MUNOZ *et al.*, 1992; 2000; 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 1993; WALBOOMERS *et al.*, 1999; ZUR HAUSEN, 2009). Acredita-se que na carcinogênese dos epitélios do trato genital feminino inferior esses vírus sejam indispensáveis, mas não suficientes (CAMPOS *et al.*, 2005; FERENCZY *et al.*, 2003; FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001; NOEL *et al.*, 2006; PALEFSKY *et al.*, 2001). Esse conhecimento gerou impacto tanto na prevenção primária, com o desenvolvimento de vacinas, como na secundária, usando testes

tipo-específicos do HPV como biomarcadores, identificando mulheres de risco para desenvolver NIC e câncer (MARKOWITZ *et al.*, 2007).

2.1.1 Métodos de detecção do HPV

A metodologia empregada para detectar e tipificar a infecção pelo HPV baseia-se na detecção e caracterização de seu ácido nucleico. Incluem-se também as técnicas que não envolvem amplificação prévia do material genético, como a hibridização (*dot-blot*), hibridização *in situ* e captura híbrida, menos sensíveis, e aquelas que envolvem processos de amplificação prévia do material genético, por isso mais sensíveis, como PCR-hibridização com sondas específicas de tipo, PCR com marcadores específicos de tipo, PCR e análise do polimorfismo nos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e PCR e análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples (PCR-SSCP) (CAVUSLU *et al.*, 1996; MELBYE *et al.*, 1996; SCHIFFMAN; BRINTON, 1995; SUN *et al.*, 1995). Entre as metodologias que empregam a PCR, têm sido utilizados principalmente marcadores de consenso My09/My11 e marcadores específicos Gp5/Gp6. A sensibilidade de detecção tem sido estimada em 10 cópias por célula, do genoma viral (COUTLÉE; PROVENCHER; GAUTHIER, 1997). Por isso, o emprego simultâneo de ambos os marcadores em forma de uma reação de amplificação aninhada permite mais sensibilidade na detecção e maior espectro para a genotipagem do HPV (EVANDER; EDLUND; BODUN, 1992; SZOSTEK *et al.*, 2006).

2.1.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com fins epidemiológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada na detecção e tipagem do DNA-HPV em biopsias cervicais frescas ou congeladas (LI *et al.*, 1988; MANOS *et al.*, 1989), esfregaços cervicais frescos ou arquivados (RAKOCZY *et al.*, 1990; VAN DEN BRULE *et al.*, 1990) e espécimes de tecidos parafinados (CHOI; SEUNG-KWON; CHANHEE, 2004; CLAAS *et al.*,

1989; CORNELISSEN *et al.*, 1989; HUANG *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2004; SHIBATA; ARNHEIM; MARTIN, 1988).

O DNA pode ser detectado utilizando-se *primers* tipo-específicos (detecta um tipo específico de HPV) ou *consensus primers* (detecta múltiplos tipos de HPV, como MY09-MY11-HMB01L1 *primer*) (AGNANTIS; SOTIRIADIS; PARASKEVAIDIS, 2003). Para amplificar a fita de DNA viral, a sequência de nucleotídeos deve ser conhecida. Com *primers* apropriados e condições de temperatura, a síntese de uma fita complementar procede automaticamente por ligação de nucleotídeos livres usando a enzima DNA-polimerase. Após suficiente tempo de alongação para gerar a fita complementar, a mistura pode ser quebrada a altas temperaturas (>93°C) para separar a fita sintetizada do molde, completando-se, então, o primeiro ciclo. Cada ciclo sucessivo dobrará a quantidade de DNA produzindo 2³⁰ vezes DNA após 30 ciclos. Em poucas horas, pequenas quantidades de DNA (nanogramas) podem ser transformadas em grandes quantidades (miligramas), que podem ser facilmente manipuladas (HUBBARD, 2003).

Apesar de seu valor inquestionável e de sua alta sensibilidade, essa técnica pode ter resultados falso-negativos, devido à quantidade insuficiente de vírus na amostra (MUNOZ *et al.*, 2003; QUEIROZ, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2000; SILVA, 2004; WALBOOMERS *et al.*, 1999; YOKOYAMA *et al.* 2003), à qualidade da amostra do DNA, que sofre influência dos efeitos de agentes desnaturantes, do tempo e condições de estocagem, assim como a qualidade dos *primers* e o tipo de enzima polimerase usado (DO CARMO; FIORINI, 2007; IFTNER; VILLA, 2003; MELO *et al.*, 2005; MESQUITA *et al.*, 2001; NONOGAKI *et al.*, 2004).

Alguns estudos mostram que a fixação em formol reduz o sucesso da PCR, porque impede e interrompe a ligação entre proteína e DNA (CHALKLEY; HUNTER, 1975; CHOI; SEUNG-KWON; CHANHEE, 2004). A solubilização do DNA em material fixado em formol está negativamente correlacionada com a duração do tratamento com o formol; e a quantidade de DNA extraído reduz-se seriamente quando comparado com material não fixado (GREER *et al.*, 1991; JACKSON *et al.*, 1990; KARLSEN *et al.*, 1994). No entanto, Claas *et al.* (1989), pesquisando a presença de DNA-HPV em peças parafinadas de mulheres com

câncer cervical, demonstraram que a PCR é um método adequado para estudo desse tipo de material e que as substâncias utilizadas na fixação de material de biopsias, previamente à parafina, como paraformaldeído, formol, glutaraldeído, etanol/ácido acético e acetona, não inibem a reação de PCR. De acordo com Bertelsen *et al.* (2006), a pureza do DNA-HPV depende principalmente do protocolo usado na extração, enquanto a idade da amostra parafinada não tem muita significância. O DNA-HPV se integra ao genoma da célula na maioria dos cânceres cervicais. Isto leva à ruptura de E1 e E2 e parte de L1 é perdida, podendo então subestimar-se a incidência de HPV caso se usem *primers* específicos para essa região do vírus (CHOO; PAN; HAN, 1987; CULLEN *et al.*, 1991; PARK *et al.*, 1997; SCHWARZ *et al.*, 1985). Assim, para melhorar a eficiência da amplificação em material arquivado, deve-se usar *primers* tipo-específicos (genes E6/E7) designados a amplificar pequenas sequências de DNA (aproximadamente 100 pb) de HPV de alto risco (WALBOOMERS *et al.*, 1999). *Primers* GP5+ /GP6+ podem ser influenciados na amplificação de um ou dois tipos de HPV nas infecções por múltiplos tipos, levando a resultados subestimados nessas amostras (QU *et al.*, 1997). Além disso, a amplificação seletiva de um tipo de DNA-HPV sobre outros pode ocorrer com diferentes cargas virais nas infecções mistas (HUANG *et al.*, 2004; TUCKER *et al.*, 1993).

Permanece em debate qual o método mais adequado na detecção do HPV em material parafinado, especialmente considerando PCR, na qual várias combinações de *primers* gerais e específicos têm sido introduzidas e consideradas melhores, mostrando ser esse um método mais sensível, padrão ouro (BAAY *et al.*, 1996).

2.2 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)

A neoplasia intraepitelial cervical (NIC), lesão precursora do câncer cervical, é diagnosticada, principalmente, após os 20 anos de idade e sua incidência aumenta, rapidamente, até atingir seu pico, na faixa etária entre 45 e 49 anos (MCMURRAY *et al.*, 2001). O aparecimento dessas lesões está ocorrendo cada vez mais precocemente, devido à iniciação cada vez mais antecipada das

atividades sexuais associada aos demais fatores de risco para NIC (BEZERRA *et al.*, 2005).

Reagan e Hamonic (1956) chamaram de displasia as lesões precursoras do câncer cervical e as distinguiram em leves, moderadas e acentuadas, conforme o comprometimento do epitélio, que era dividido em terços inferior, mediano e superficial.

Richart (1973) propôs nova classificação, denominando-as de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e dividindo-as em três grupos:

- NIC 1: lesões correspondentes à displasia leve;
- NIC 2: lesões correspondentes à displasia moderada;
- NIC 3: lesões correspondentes à displasia acentuada ou carcinoma *in situ*.

A terminologia citológica mais aceita atualmente é a incorporada pelo Sistema Bethesda 2001, classificando essas lesões em lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), que incluem HPV e NIC 1, e lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), que incluem NIC 2 e NIC 3 (KANODIA *et al.*, 2007).

A maioria dos cânceres cervicais se inicia na zona de transformação, uma região delimitada pela mucosa glandular e pela mucosa escamosa original da cérvix, onde células metaplásicas imaturas se alteram devido à associação de fatores, como agentes oncogênicos, distúrbios imunológicos e outros, encontrados principalmente em certos grupos epidemiológicos (FREGA *et al.*, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2000; WRIGHT; SCHIFFMAN, 2003). O primeiro estágio do desenvolvimento é a NIC ou lesão intraepitelial cervical (SIL/LIS), cujas células neoplásicas ainda não ultrapassaram a membrana basal e são pré-malignas. Pode regredir, persistir ou progredir para câncer invasivo, o que acontece em aproximadamente 1 a 3% dos casos (MICHELIN; OLIVEIRA; MURTA, 2008). As lesões de alto grau (NIC 2/3) são de alto risco de evoluir para câncer invasor se não forem tratadas (ZUR HAUSEN, 2000).

2.2.1 Tratamento da neoplasia intraepitelial cervical

Várias técnicas têm sido utilizadas no tratamento de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), como conização com bisturi, crioterapia, eletrocauterização, vaporização a *laser* e cirurgia de alta frequência (CAF) ou *loop electrosurgical excision procedure* (LEEP). Crioterapia, eletrocauterização e vaporização a *laser* são técnicas ablativas; já a conização com bisturi e CAF são procedimentos cirúrgicos, ou seja, técnicas excisionais (BISHOP *et al.*, 1996; MITCHELL *et al.*, 1998).

Se o seguimento das pacientes for realizado de forma adequada, as lesões de baixo grau (NIC 1) podem não ser tratadas, já que a maioria tende à regressão espontânea. No entanto, quando o seguimento não for possível, elas devem ser tratadas usando-se técnicas ablativas. As técnicas cirúrgicas são indicadas nos casos de lesões de alto grau (NIC 2/3), com posterior acompanhamento às pacientes, devido ao risco de recorrência da doença (AERSSSENS *et al.*, 2009). A NIC pode-se curar mesmo após incompleta excisão cirúrgica da lesão e pacientes com comprovação histológica de remoção completa da lesão podem recidivar, mostrando que o *follow-up* após a conização é muito importante para a detecção precoce de persistência ou recidiva de lesão (MILOJKOVIC, 2002; PARASKEVAIDIS *et al.*, 2003).

Desde a introdução da conização por cirurgia de alta frequência tem-se estabelecido que é um método eficaz, ambulatorial e que preserva a anatomia e função da cérvix (BAE *et al.*, 2007; LUESLEY *et al.*, 1990).

2.3 HPV e NIC

Estudos mostram associação do HPV com o câncer cervical (BOSCH *et al.*, 1995; 2002; MUNOZ *et al.*, 2000; 2006; ZUR HAUSEN, 2000; 2009). Persistente infecção da cérvix com HPV acredita-se hoje ser fator causador de desenvolvimento do câncer cervical e de suas lesões precursoras (CUSCHIERI *et al.*, 2005). O HPV tem sido detectado em 95 a 99% dos casos de câncer cervical

(BERTELSEN *et al.*, 2006; BOSCH *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006; WALBOOMERS *et al.*, 1999) e em aproximadamente 5 a 20% na população sem câncer (BOSCH *et al.*, 2002; MUNOZ *et al.*, 2006; NAMKOONG, 1995; SAN JOSÉ *et al.*, 2007; THOMISSON; THOMAS; SHROYER, 2008).

O ciclo de vida do HPV depende da diferenciação das células epiteliais. Acredita-se que a infecção pelo vírus inicia-se nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico. À medida que se dividem, as células basais e parabasais migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas. Ao se dividirem, as células infectadas pelo HPV distribuem equitativamente o DNA viral entre as duas células filhas. Uma delas inicia o processo de diferenciação e maturação, enquanto a outra permanece indiferenciada na camada basal, servindo como reservatório do DNA viral. Para que os vírus infectem as células da camada basal, é necessário que ocorra perda da integridade do epitélio, como é o caso de microerosões ou traumatismos na pele ou mucosas (DOORBAR, 2005; WRIGHT, 2006). Nessa fase ocorrem apenas proliferação celular e mitoses basais e a infecção é referida como latente ou clinicamente inaparente (WRIGHT, 2006). Se a infecção persiste, distúrbios no controle da replicação dos HPVs de alto risco podem levar a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, causando transformação celular (KANODIA *et al.*, 2007; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005; STOLER, 2003). Já são observadas nessa etapa alterações nucleares com atipia em todas as camadas do epitélio, principalmente com núcleos grandes e atípicos nas camadas profundas. Surgem figuras de mitose não só na camada basal, mas também nas camadas mais superficiais do epitélio. Esses aspectos morfológicos indicam alterações genéticas mediadas pelos oncogenes virais, principalmente E6 e E7. Nessa fase estaria ocorrendo a integração do DNA viral ao genoma da célula (CRUM; ROSE, 2006).

O número de mulheres com câncer cervical é baixo quando comparado com o número de mulheres infectadas pelo HPV. Estudos sugerem que a maioria das mulheres infectadas pelo HPV apresenta infecção transitória e somente baixa porcentagem delas teria infecção que poderia evoluir para uma doença pré-maligna (NIC 2/3) ou maligna. O problema, no entanto, é identificar quais mulheres são de risco para doença progressiva (ALONSO *et al.*, 2007;

MCMURRAY *et al.*, 2001; MONSONEGO *et al.*, 2004). Infecção transitória pelo HPV é comum nas mulheres jovens (EVANDER *et al.*, 1995), enquanto nas mulheres acima de 30 anos a infecção por tipos de alto risco tende a persistir por mais tempo (HILDESHEIM *et al.*, 1994; PINTO; CRUM, 2000; SCHIFFMAN *et al.*, 2000). Na maioria das vezes em que a resposta imune for adequada, haverá *clearance* da infecção, ou seja, desaparecimento do vírus (FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001; GALLOWAY, 2003).

Embora a infecção pelo HPV seja necessária para o desenvolvimento do câncer cervical, isoladamente ele não é capaz de induzir a progressão de uma célula normal para uma célula neoplásica. Outros fatores são necessários para essa progressão. O desfecho da infecção depende do tipo viral, da localização anatômica, da influência de fatores teciduais e da ação de cofatores que podem ser classificados em ambientais e não-ambientais. São aceitos como ambientais: elevada paridade, alto número de parceiros sexuais, início de atividade sexual precoce, uso de contraceptivos orais hormonais, tabagismo e doenças sexualmente transmissíveis como *Chlamydia trachomatis*, herpes vírus e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que estariam associados à persistência viral. Não-ambientais são aqueles relacionados com a genética e a resposta imunológica do hospedeiro. Alguns cofatores inerentes ao HPV interferem no risco de progressão das NICs e no desenvolvimento do câncer cervical. Esse risco está relacionado com o genótipo do HPV, variantes, carga viral, persistência e integração do DNA viral no genoma do hospedeiro (FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001; GALLOWAY, 2003; MUNOZ, 2000; QUEIROZ, 2007; THOMISSON; THOMAS; SHROYER, 2008).

2.4 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O HIV é um retrovírus com genoma ácido ribonucleico (RNA). O HIV infecta e induz à morte celular, principalmente em uma variedade de linhagem celular humana. O linfócito T CD4+ é o maior alvo da infecção viral e as células CD4+ circulantes tornam-se constantemente diminuídas no sangue periférico, na

maioria das pessoas infectadas e não tratadas. Dessa forma, a quantificação de células CD4+ no sangue é uma maneira de determinar o dano imunológico cumulativo devido ao HIV (GREENBLATT; HESSOL, 2001).

De acordo com o *National Center for Infectious Diseases Division of HIV/AIDS* (1993), a contagem de células CD4+ no sangue periférico pode ser dividida em quatro faixas:

- CD4+ > 500 células/mm³: estágio da infecção pelo HIV com baixo risco de doença;
- CD4+ entre 200 e 500 células/mm³: estágio caracterizado por surgimento de sinais e sintomas menores ou alterações constitucionais. Risco moderado de desenvolvimento de doenças oportunistas;
- CD4+ entre 50 e 200 células/mm³: estágio com alta probabilidade de surgimento de doenças oportunistas;
- CD4+ < 50 células/mm³: estágio com grave comprometimento da resposta imunitária. Alto risco de doenças oportunistas e de morte.

A carga viral, ou seja, a quantificação das partículas virais no plasma é considerada um dos principais indicadores de progressão da imunodepressão induzida pelo HIV (CAMPO *et al.*, 2002; RACHID; SCHECHTER, 2001). Geralmente, a carga viral diminui em resposta à medicação antirretroviral (HAART) e eleva-se quando a paciente desenvolve resistência. O objetivo do tratamento é reduzir a carga viral o máximo possível, idealmente para níveis abaixo do limiar de detecção dos testes disponíveis ou, no mínimo, a níveis inferiores a 5.000-10.000 cópias/mL (RACHID; SCHECHTER, 2001).

2.5 Coinfecção HIV/HPV

A primeira associação entre as duas infecções virais foi feita por Brabdiar em 1987, relacionando o aumento de uma das expressões da infecção pelo HPV e a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) entre as mulheres infectadas pelo HIV. Ambas são DSTs e suas populações de risco apresentam várias características

demográficas em comum (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002; RUSSOMANO *et al.*, 2001).

O HPV exerce papel fundamental na carcinogênese do colo uterino, sendo o principal fator causal do carcinoma escamoso cervical. Mulheres imunodeprimidas apresentam risco elevado para o desenvolvimento de NIC. Apesar dessas associações – infecção por HPV e infecção pelo HIV – serem fatores de risco independentes para o desenvolvimento de NIC, a infecção pelo HIV é um fator de risco independente para infecções por HPV, nas formas latentes e clínica (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002). A infecção pelo HPV ocorre em taxas elevadas nas mulheres infectadas pelo HIV e é comumente detectada na mucosa genital dessas mulheres. A prevalência da infecção pelo HPV é geralmente muito maior que quando comparada com grupos de mulheres não-infectadas pelo HIV, com características sociodemográficas similares; e a maioria dessas pacientes apresenta múltiplos genótipos (CAMPOS *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2003; LEVI *et al.*, 2002; 2005; MASSAD *et al.*, 1999; PALEFSKY *et al.*, 1999; SONCINI *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 1997; VOLKOW *et al.*, 2001; ZIMMERMMAMM; MELO, 2002).

Na paciente infectada pelo HIV, a infecção pelo HPV é também uma condição necessária para o desenvolvimento do câncer cervical, especialmente dos genótipos considerados oncogênicos, 16 e 18, chamados de alto risco (ZIMMERMMANN *et al.*, 2006). Também a persistência da infecção pelo HPV é maior nessas mulheres (CLIFFORD; GONÇALVES, FRANCESCHI, 2006; FERENCZY *et al.*, 2003).

O aumento da incidência e progressão da infecção pelo HPV em indivíduos imunossuprimidos mostra o papel crítico da resposta imunitária na resolução e controle da infecção (STANLEY, 2001). É fato bem documentado que mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm alta prevalência de infecção pelo HPV e lesões intraepiteliais escamosas (NIC). Nesse grupo de pacientes imunossuprimidas, as lesões são mais agressivas e sua progressão é mais rápida do que nas imunocompetentes; além disso, as lesões são de difícil tratamento e têm alta taxa de recorrência (BOSCH *et al.*, 1995; CLIFFORD;

GONÇALVES, FRANCESCHI, 2006; ELLERBROCK *et al.*, 2000; LEVI *et al.*, 2004).

2.6 NIC na paciente infectada pelo HIV

Desde 1989 tem sido evidenciado que mulheres infectadas pelo HIV apresentam significativo alto risco de desenvolver lesão intraepitelial cervical (NIC). A prevalência de NIC nessas mulheres tem sido estimada em 20 a 40% (ELLERBROCK *et al.*, 2000; MAIMAN *et al.*, 1991; WRIGHT *et al.*, 1994a). Campos *et al.* 2005 enfatizam que as mulheres infectadas pelo HIV têm 10 vezes mais chance de desenvolver NIC quando comparadas às não-infectadas.

A alta prevalência da infecção pelo HPV nessas pacientes e a imunossupressão são importantes fatores de risco. Em 1993, o *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) incluiu o câncer invasor do colo uterino como doença indicadora de imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), passando a NIC ser considerada uma manifestação precoce da doença (CDC 1993; LEVI *et al.*, 2004; MASSAD *et al.*, 1999; SONCINI *et al.*, 2007).

Soncini e Condemi (2003) verificaram que as lesões intraepiteliais cervicais são significativamente mais frequentes e agressivas nas mulheres infectadas (38%) que nas não-infectadas (12%), de acordo com outros autores (BERRÉBI; BADIOU; DUCLUSAUD, 2008; BRANCA *et al.*, 2003; MASSAD *et al.*, 2001; PALEFSKY, 2003). Harris *et al.* (2005) observaram que as mulheres não-infectadas e as infectadas com contagem de linfócitos TCD4+ > 500 células/mm³, resultado citológico normal e teste para HPV-DNA negativo tinham o mesmo risco de incidência de NIC em três anos ou mais de acompanhamento.

Mulheres com carga viral elevada para o HIV parecem ter maior prevalência de NIC (ARAUJO *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2001; PALEFSKY *et al.*, 1999), enquanto que o tratamento com HAART tem sido associado a taxas mais baixas de recorrência e regressão de lesão cervical (HEARD *et al.*, 2002; MINKOFF *et al.*,

2001; MONINI *et al.*, 2004; ROBINSON *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2001). Já em estudos realizados por Ellerbrock *et al.* (2000) e Soncini *et al.* (2007), não foi encontrada diferença significativa na incidência de neoplasia cervical entre pacientes em uso de HAART e pacientes não tratadas.

Outras pesquisas evidenciaram associação entre o grau da lesão intraepitelial cervical e a imunossupressão induzida pelo HIV, sugerindo que quanto menor for a contagem de linfócitos TCD4+, mais alto o risco de ocorrer NIC 2 e 3 (DUERR; PARAMSOTHY; JAMIESON, 2006; PALEFSKY, 2006; SONCINI; CODEMI, 2003).

Em relação ao tratamento dessas lesões, de acordo com a literatura, mulheres não-infectadas pelo HIV, imunocompetentes devem ser submetidas a condutas expectantes nas lesões de baixo grau e à excisão cirúrgica ou ablação nas lesões de alto grau, com altas taxas de sucesso (MARTIN-HIRSCH *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 2003). No caso das mulheres infectadas pelo HIV, imunodeprimidas o insucesso no tratamento tem sido reportado com altas taxas de recidiva de NIC (HOLCOMB *et al.*, 1999; WRIGHT *et al.*, 1994a). O tratamento de NIC nessas pacientes deve ser mais agressivo e o seguimento mais rigoroso (NAPPI *et al.*, 2005).

2.7 Recidiva da neoplasia intraepitelial cervical (NIC)

Estudos consideram doença residual aquela identificada durante o primeiro ano após a conização; e recidiva quando acontece após esse período (GONZALEZ *et al.*, 2001; MILOJKOVIC, 2002). Mulheres tratadas para lesão intraepitelial de alto grau (NIC 2 e 3) são tradicionalmente acompanhadas por pelo menos dois anos para detectar recidiva ou doença residual (MITCHELL *et al.*, 1998).

Taxas de recidiva de NIC após conização por cirurgia de alta frequência (CAF) variam entre 5 e 30%, necessitando as pacientes de acompanhamento e retratamento quando se identificam lesões (ALONSO *et al.*, 2006; BAE *et al.*,

2007; COSTA *et al.*, 2003; GARDEIL *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 1998; NAGAI *et al.*, 2000; NUOVO *et al.*, 2000). Aerssens *et al.* (2009) e Sarian *et al.* (2004a) encontraram taxa de recidiva de NIC de 9% em mulheres com NIC 2 e 3, não-infectadas pelo HIV, tratadas por CAF. Lima *et al.* (2009) encontraram taxa semelhante de 8,4%. Prendiville *et al.* (1989) e Livasy, Moore e Van Le (2004) informaram taxa de 15% de recidiva pós-CAF. O tempo médio de recidiva encontrado por alguns autores foi de nove a 10 meses, variando de três a 23 meses (ALONSO *et al.*, 2006; CARTER *et al.*, 2006).

Vários fatores têm sido associados ao risco de recidiva de NIC, como margens cirúrgicas comprometidas (ALONSO *et al.*, 2006; BROCKMEYER *et al.*, 2005; DIETRICH *et al.*, 2002; FELIX *et al.*, 1994; FOGLE *et al.*, 2004; HEARD *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2009; MURTA *et al.*, 1999; PRATO *et al.*, 2008), ocupação glandular (DIETRICH *et al.*, 2002; FOGLE *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2009; ZAITOUN *et al.*, 2000), imunossupressão (LIMA *et al.*, 2009; SKINNER; GEHRIG; VAN LE, 2004), doença multifocal (GARDEIL *et al.*, 1997) e idade da paciente (FLANNELLY *et al.*, 2001; VERGUTS *et al.*, 2006). O grau de lesão de NIC foi relatado como fator de risco em alguns estudos (ZAITOUN *et al.*, 2000), não sendo mencionado em outros (DIETRICH *et al.*, 2002; JOHNSON *et al.*, 2003). Também o HPV detectado no pós-tratamento foi considerado por alguns autores um fator de risco para recidiva de lesão (GARDEIL *et al.*, 1997; HERNÁDI *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2001; PRATO *et al.*, 2008; SARIAN *et al.*, 2004a; 2005; VERGUTS *et al.*, 2006). Mulheres com HPV 16 apresentaram mais risco de recidiva quando comparadas com mulheres com outros tipos de HPV (KREIMER *et al.*, 2006). Também aquelas com persistência da infecção pelo HPV, após tratamento, tiveram 29% de risco de recorrência de NIC, necessitando de acompanhamento mais intenso (DERCHAIN; LONGATTO FILHO; SYRJANEN, 2005; SARIAN *et al.*, 2004b; 2005; VERGUTS *et al.*, 2006). O HPV de alto risco no seguimento dessas pacientes é um preditor importante para recidiva de lesão após conização (AERSSENS *et al.*, 2009; CHAO *et al.*, 2004; DISTEFANO *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 2001; NAGAI *et al.*, 2000). De acordo com alguns autores, no caso de haver resultados negativos de testes para o HPV após o tratamento, a frequência de acompanhamento poderia ser reduzida, particularmente nas pacientes com

margens livres (COSTA *et al.*, 2003; DALSTEIN *et al.*, 2003; HOUFFLIN *et al.*, 2003).

Também para Mitchell *et al.* (1998), Murdoch *et al.* (1992) e Paraskevaïdis *et al.* (2003), a lesão de alto grau, o maior tamanho da lesão, lesões satélites causadas pelo HPV, comprometimento de margens do cone, persistência da infecção pelo HPV e imunodepressão estão relacionados às altas taxas de insucesso no tratamento de NIC.

O *status* das margens cirúrgicas do cone tem sido usado como fator preditor de doença residual, embora seja considerado um sinal de baixa acurácia, porque um número significativo de pacientes com margens cirúrgicas livres apresentam recidiva, enquanto pacientes com margens positivas curam-se espontaneamente (MURTA *et al.*, 1999; PARASKEVAIDIS *et al.*, 2001; SKJELDESTAD *et al.*, 1997; ZIELINSKI *et al.*, 2004).

Paraskevaïdis *et al.* (2000), ao analisarem pacientes submetidas à CAF, demonstraram risco relativo para doença residual de 4,9 em pacientes com envolvimento glandular, apesar das margens estarem livres de lesão. Dietrich *et al.* (2002) caracterizaram o envolvimento glandular presente no cone como fator de risco, independentemente de doença residual. Para Nagi e Schlosshauer (2006), a ocupação glandular na peça de cone está associada à maior frequência de lesão intraepitelial cervical de alto grau (NIC 2 e 3).

As pacientes infectadas pelo HIV, conforme Lima *et al.* (2009), Massad *et al.* (2007) e Tate e Anderson (2002), têm mais chance de recidiva de NIC quando comparadas com as não-infectadas. Esse fato está relacionado ao *status* imunológico dessas pacientes (ROBINSON *et al.*, 2001). Taxas de recidiva de NIC são mais altas nas mulheres infectadas pelo HIV com diminuição da contagem de linfócitos T CD4+ (DARREN *et al.*, 2002; HEARD *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2009), atingindo 87% em três anos nas mulheres com grave imunodepressão (FRUCHTER *et al.*, 1996). Por causa desse alto percentual de recidiva, alguns autores preconizam o uso de técnicas excisionais em mulheres infectadas pelo HIV com NIC 1 (FRUCHTER *et al.*, 1996; NAPPI *et al.*, 2005).

Mulheres infectadas pelo HIV têm duas vezes mais chance de apresentar margens comprometidas no cone pós-CAF quando comparadas com as não-infectadas (BOARDMAN *et al.*, 1999; GILLES *et al.*, 2005). O aumento na expectativa de vida dessas mulheres em uso de HAART tem possibilitado mais recidiva de NIC e progressão para o carcinoma cervical invasor. Em contrapartida, a melhora no estado imunológico com o uso de HAART resulta em melhor resposta imune e melhor controle da neoplasia cervical (HEARD *et al.*, 2004; ROBINSON *et al.*, 2002).

Lima *et al.*, (2009) descreveram taxa de recidiva de NIC de 33% em mulheres infectadas pelo HIV e 8,4% nas não-infectadas. Também estiveram relacionadas ao alto percentual de recidiva, para esses autores, as margens comprometidas (risco relativo – RR 2,04 – intervalo de confiança – IC 95%: 1,05-3,98) e ocupação glandular (RR 3,46 – IC 95%: 1,71-7,01). As mulheres infectadas pelo HIV apresentaram recidiva de NIC mais precocemente quando comparadas às não-infectadas (50% de recidiva no primeiro ano de seguimento).

3 OBJETIVOS

- Determinar os fatores de risco para recidiva de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV, submetidas à cirurgia de alta frequência (CAF) por lesão intraepitelial cervical;
- Determinar a prevalência dos tipos 6, 11 (grupo de baixo risco) 16, 18, 31, 33, 35 (grupo de alto risco) do papilomavírus humano (HPV) em pacientes infectadas e não-infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que apresentaram recidiva ou não de lesões intraepiteliais cervicais (NIC) após cirurgia de alta frequência;
- Determinar se os HPVs 16, 18, 31, 33 e 35 (grupo de alto risco) foram fator de risco para recidiva dessas lesões intraepiteliais cervicais.

4 PACIENTES E MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo caso-controle a partir de peças de conização do colo uterino apresentando lesão intraepitelial cervical (NIC), por cirurgia de alta frequência (CAF), de pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV, que apresentaram recidiva da lesão (casos) ou não (controles). O interesse foi avaliar os fatores de risco para recidiva de NIC, entre eles os HPV's 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35.

As pacientes infectadas pelo HIV faziam parte do Programa Multicêntrico para Controle e Prevenção das Lesões Cervicais de Alto Grau e do Câncer Cérvico-Uterino em Mulheres Portadoras do HIV, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG) em 2002 e 2007, oriundas do Setor de Ginecologia do Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas (CTR-DIP Orestes Diniz)(ANEXO A).

As pacientes não-infectadas pelo HIV foram oriundas do Posto de Atendimento da Sagrada Família – Serviço de Patologia do Colo, Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (CEP/PBH) em 2008 (ANEXO B).

Todas as pacientes foram submetidas à CAF, no período entre janeiro de 1999 e maio de 2004, por apresentarem algum grau de lesão intraepitelial cervical. O período médio de acompanhamento foi de dois anos. Definiu-se, na ocasião, como recidiva de lesão o aparecimento ou a persistência de lesão intraepitelial cervical (NIC), identificada por alteração citológica (ANEXO C) e/ou colposcópica (ANEXO D), sempre confirmada por biopsia, considerada padrão ouro na análise, e independente do tempo decorrente da primeira conização.

As peças parafinadas que foram encontradas em estoque nos laboratórios de anatomia patológica foram recrutadas para serem estudadas por técnica de PCR, para detecção dos tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35.

4.2 Pacientes

Foram analisados blocos parafinados, pós-conização, de 70 pacientes infectadas pelo HIV oriundas do CTR-DIP Orestes Diniz e de 68 pacientes não-infectadas pelo HIV oriundas do Posto de Atendimento da Sagrada Família – Serviço de Patologia do Colo. Elas apresentavam biopsia compatível com lesão intraepitelial cervical (NIC 1, 2 e 3), submetidas à conização por CAF, no período entre janeiro de 1999 e maio de 2004, que apresentaram ou não recidiva de lesão.

Todos os blocos de parafina das 138 pacientes foram obtidos a partir do levantamento de seus números de registro no Posto de Atendimento da Sagrada Família – Serviço de Patologia do Colo, onde elas foram submetidas à CAF. Encontravam-se estocados nos laboratórios Tafuri de Patologia e Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatologia da Regional Noroeste – SMSA/PBH, que eram os laboratórios de referência do serviço na época.

Terminado o levantamento, foram então encaminhados ao Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), para serem estudados por técnica de PCR, em cortes de material de parafina, para detecção dos tipos de HPV.

Foram definidas como casos as amostras de pacientes que apresentaram recidiva de lesão intraepitelial cervical, independentemente da sorologia para o HIV, constituídas por 33 blocos de parafina. E os controles eram as amostras de pacientes que não apresentaram recidiva de lesão intraepitelial cervical, independentemente da sorologia para o HIV, constituídos por 105 blocos de parafina.

Os resultados obtidos foram inseridos no *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 12.0, no qual foram analisados.

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas as peças parafinadas de pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e que apresentavam algum grau de lesão no bloco parafinado, confirmado por novo exame histológico.

Foram incluídas 70 peças parafinadas de pacientes infectadas pelo HIV (25 com recidiva de NIC e 45 sem recidiva de NIC) e 68 peças parafinadas de não-infectadas pelo HIV (oito com recidiva de NIC e 60 sem recidiva de NIC).

Finalizando, somaram-se 33 casos (pacientes com recidiva de NIC) e 105 controles (pacientes sem recidiva de NIC).

4.2.2 Critérios de exclusão

Excluíram-se os blocos parafinados de pacientes que não concordaram em assinar o TCLE e que não apresentavam mais lesão intraepitelial cervical, confirmado por novo exame histológico.

Do total de 94 pacientes infectadas pelo HIV, oriundas da tese de doutorado da Dr^a. Maria Inês Miranda Lima, foi possível estudar os blocos de parafina de 70 pacientes (16 foram perdas por não terem sido encontradas nos arquivos desses laboratórios e oito excluídas por não apresentarem mais lesão intraepitelial cervical no bloco). Do total de 107 pacientes não-infectadas pelo HIV, também oriundas da tese de Dr^a. Maria Inês Miranda Lima, foi possível estudar os blocos de parafina de 68 pacientes (26 foram perdas por não terem sido localizadas nos arquivos desses laboratórios e 13 excluídas por não terem mais lesão intraepitelial cervical no bloco).

4.3 Método

4.3.1 Teste de triagem sorológica para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Todas as pacientes incluídas no estudo, infectadas ou não pelo HIV, possuíam teste sorológico positivo ou negativo, respectivamente, segundo a Portaria nº 488, de 17 de junho de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, na época em que foram submetidas à CAF (ANEXO E).

4.3.2 Conização por cirurgia de alta frequência (CAF)

Todas as pacientes foram submetidas à CAF no bloco cirúrgico do Posto de Atendimento Médico (PAM) Sagrada Família, nos moldes de uma pequena cirurgia, no período de 1999 a 2004, por apresentarem biopsia compatível com NIC 1, 2 ou 3. A maioria das biopsias com resultado NIC 1 fazia parte do grupo de mulheres infectadas pelo HIV. A histopatologia da biopsia na época da CAF foi baseada na classificação proposta por Richart (1973) (ANEXO F) e a terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical seguiu a orientação de Wright *et al.* (1994a), baseada na classificação de Richart (1973) (ANEXO G). O aparelho utilizado foi o *Wavetronic* 2000 acoplado ao aspirador de fumaça. Em todo o procedimento foi retirada a junção escamo-colunar (JEC) e quando ela não foi visualizada, ou quando se tratava de NIC 3, o procedimento foi completado com o uso da alça de canal para estudo adequado da JEC, com a preocupação de obter-se margem endocervical negativa para a neoplasia.

O material obtido foi introduzido em frasco contendo solução de formaldeído a 10%, com volume correspondendo a pelo menos 10 vezes o volume do espécime cirúrgico. A seguir, foi enviado para o laboratório onde foi incluído em um ou mais blocos de parafina. Permaneceram estocados por um período variável de cinco a 10 anos.

4.3.3 Análise microscópica

Com os casos e controles já recrutados dos laboratórios de anatomia patológica, viu-se que em alguns havia apenas um bloco de parafina, mas vários tinham dois ou mais blocos. Desta forma, foi necessário selecionar um bloco apenas de cada paciente, para ser enviado ao laboratório, para realização da PCR. Para tal, em um primeiro momento, foram selecionadas as pacientes com mais de um bloco de parafina, que foram reavaliadas por um único patologista, com o objetivo de selecionar o bloco que apresentava NIC com maior grau de lesão.

Em um segundo momento, já cada caso e controle com apenas um bloco de parafina selecionado, foram realizados novos cortes em micrótomo para obter material para a realização da PCR. Os cortes foram feitos antes e depois do material retirado para a realização da PCR, visando certificar-se da presença ainda de lesão intraepitelial cervical (NIC), de qualquer grau, no material encaminhado para PCR. Nessa fase os critérios microscópicos foram reavaliados novamente por um só patologista. Toda a análise foi cega para o conhecimento da infecção ou não pelo HIV e também para o conhecimento de recidiva ou não da lesão.

4.3.4 Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.4.1 Desparafinação

Foi realizada a PCR em todas as amostras, para os tipos de HPV 6, 11 (grupo de baixo risco) e 16, 18, 31, 33 e 35 (grupo de alto risco), por serem os mais prevalentes, usando-se um *primer consensus* para cada grupo.

De cada bloco parafinado selecionado foram feitos, em micrótomo, dois a quatro cortes de 10 µm e transportados para microtubos de 1,5 mL.

Para remoção da parafina, acrescentou-se 1 mL de xylol a 97% em cada microtubo, homogenizando-se no vórtex e levando-se à estufa previamente

aquecida a 60°C por 10 minutos e posterior centrifugação a 800 xg por mais 10 minutos. O excesso de xylol foi retirado, mantendo-se o sedimento, e novamente todo o processo de lavagem foi feito, por até três vezes. Em seguida, lavou-se com 1 mL de etanol puro a 99,5% para retirar-se o xylol e centrifugou-se por 10 minutos. Repetido o processo com etanol, foi colocado na geladeira para secar por aproximadamente 24 horas. Desta forma, o material estava pronto para iniciar a extração do DNA.



FIGURA 2 - Microtubo com corte do material parafinado.

4.3.4.2 Extração do DNA

Em cada microtubo que continha o material desparafinado adicionou-se 1 mL de trizol® e homogenizou-se. Foram colocados 200 µL de clorofórmio, com posterior agitação em vórtex por 15 segundos, incubação à temperatura ambiente por três minutos e centrifugação a 810 xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, a mistura se separou em três fases (FIG 3):

- 1ª fase - superior, incolor aquosa, onde se encontra o RNA.
- 2ª fase - intermediária, de aspecto leitoso, onde se encontram as proteínas.
- 3ª fase - inferior, vermelho-fenol-clorofórmio, onde se encontra o DNA.



FIGURA 3 - Microtubo com as três fases de separação da mistura para extração do DNA.

A fase fenólica (terceira) foi colocada em outro microtubo, adicionando-se 300 μ L de etanol 100%, com posterior agitação por 15 segundos, incubação à temperatura ambiente por aproximadamente dois a três minutos e centrifugação a 1.500 xg por 10 minutos a 4° C. Em seguida, houve a separação da amostra em duas fases: o DNA encontrado na fase sólida do tubo, ou seja, precipitado, e o sobrenadante que foi removido.

O DNA precipitado foi lavado duas vezes com 1,0 mL de citrato de sódio 0,1 M a 10% de etanol, com posterior homogeneização manual por 15 segundos, incubação à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugação a 1.500 xg por 15 minutos a 4° C (FIG. 4). Após as duas lavagens, foi adicionado a cada amostra 1 mL de etanol a 75% e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Depois disso, foram centrifugadas a 1.500 xg por cinco minutos a 4°C e levadas à geladeira para secagem por 12 horas.



FIGURA 4 - Lavagem do DNA precipitado com solução de citrato de sódio e etanol.

Após a secagem do DNA, este foi diluído em 100 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) a 8 mM, para posterior realização da PCR.

4.3.4.3 Método de detecção viral

Para realização da PCR, adicionou-se ao DNA diluído uma solução *mix* para PCR. Os *primers* e as reações de PCR foram feitos seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante da enzima (invitrogen[®]), contudo, as temperaturas de anelamento, assim como os *mixes* para cada sequência iniciadora, as etapas e número de ciclos para a realização das PCRs foram otimizados por prévias padronizações realizadas no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

De modo geral, o DNA foi adicionado a uma solução contendo os seguintes componentes para amplificação: tampão 10x, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Taq DNA polimerase, *Primer F* 10 μ M, *Primer R* 10 μ M e água ultrapura.

QUADRO 2
Sequência dos *Primers*

Primer	Sequência
HPV BAIXO RISCO F	TACACTGCTGGACAACATGC
HPV BAIXO RISCO R	GTGCGCAGATGGGACACAC
HPV ALTO RISCO F	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
HPV ALTO RISCO R	GAAAATAAACTGTAAATCATATTC

Todavia, as concentrações dos reagentes e as temperaturas utilizadas para as reações de amplificação se encontram descritas a seguir.

- Tampão 10X2,50 μ L
- MgCl₂ 50 mM.....1,10 μ L
- dNTP 10mM.....1,00 μ L
- *Primer F* 10 μ M.....1,00 μ L
- *Primer R* 10 μ M.....1,00 μ L
- cDNA 200 η g.....10,00 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,15 μ L
- Água ultrapura q.s.p.....25,00 μ L

Condições de amplificação:

- | | | |
|------------------------|---|-----------|
| 1 - 94° C10 min | } | 40 ciclos |
| 2 - 94° C.....60 seg | | |
| 3 - TA..... 45 seg | | |
| 4 - 72° C.....60 seg | | |
| 5 - 72° C.....10 min | | |
| 6 -16° C..... ∞ | | |

A temperatura de anelamento (TA) para os iniciadores foi de 40,2° C para o HPV de alto risco e de 59° C para o HPV de baixo risco.

Após a reação de PCR, os produtos da amplificação do DNA foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e corados com nitrato de prata a 2%

(ANEXO H). Utilizou-se em cada gel um padrão de peso molecular de 50 pb, como controle positivo, o *trackit*TM 1kb DNA ladder da invitrogen®.

Cada amostra a ser aplicada no gel foi homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta; 10,0 µL da amostra de DNA amplificado foram misturados a 5,0 µL de tampão da amostra. Essa mistura foi feita com cada uma das amostras submetidas à PCR e foram aplicadas uma em cada orifício do gel de poliacrilamida 10%. O gel foi submetido a uma corrente de 90 volts por duas horas.



FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Posteriormente à corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora (ANEXO H) por 20 minutos. Essa solução foi então desprezada e ao gel adicionou-se uma solução de nitrato de prata, sob agitação mecânica, por 20 minutos. Em seguida, fez-se rápida lavagem em água ultrapura e incubação em solução reveladora (ANEXO H) por mais 20 minutos, retornando o gel para a solução fixadora.

Após a revelação dos géis, foi realizada a análise da presença das bandas de amplificação nos mesmos.

As formulas das soluções e géis usados no processo de PCR encontram-se no ANEXO H.

4.4 Análise estatística

4.4.1 Cálculo amostral

A variável resposta principal é a ocorrência de recidiva de lesão em pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV e as covariáveis: resultado do HPV, tipo de HPV (alto e/ou baixo risco), margem e ocupação glandular na CAF, idade da paciente, paridade, tabagismo, idade de início de atividade sexual, número de parceiros, citologia, colposcopia, biopsia e anatomopatológico da CAF.

A casuística foi composta de material parafinado de 70 pacientes infectadas pelo HIV e 68 não-infectadas pelo HIV, já obtido de conização por CAF.

Baseando-se em dados da literatura, estimou-se a proporção de pacientes com recidiva em cada estrato, que consiste da combinação do resultado de HIV, da recidiva e da classificação do resultado do HPV.

A partir do *software* StatXact, foi calculado o poder do teste de *Wilcoxon* (método de *mid rank*) para comparar duas distribuições multinomiais com variáveis categóricas com ordenação.

Entre as várias situações simuladas, foi escolhido o tamanho de amostra que corresponde ao poder de 90%. O nível de confiança estatística de 0,05 foi utilizado para todas as análises.

Foi programado, como se pode constatar a seguir, incluir no estudo no mínimo 43 pacientes infectadas pelo HIV (14 com recidiva e 29 sem recidiva) e 59 pacientes não-infectadas pelo HIV (cinco com recidiva e 54 sem recidiva). Resolveu-se incluir todas as peças parafinadas que foram encontradas estocadas nos laboratórios e que preenchiam os critérios de inclusão.

Pacientes HIV + (N=94)

RECIDIVA	HPV -	HPV + (Baixo risco)	HPV + (Alto risco)
Não (N=63)	0,20	0,70	0,10
Sim (N=31)	0,10	0,35	0,55

n(recidiva)	n(não recidiva)	n(total)	Poder (%)
15	35	50	93%
16	34	50	93%
17	33	50	94%
18	32	50	94%
19	31	50	94%
20	30	50	94%
16	31	47	92%
15	30	45	91%
14	29	43	90%
13	28	41	88%
12	27	39	86%
11	26	37	84%
10	25	35	81%
10	24	34	80%
09	24	33	77%

Pacientes HIV - (N=107)

RECIDIVA	HPV-	HPV + (Baixo risco)	HPV + (Alto risco)
Não (N=98)	0,60	0,30	0,10
Sim (N=09)	0,10	0,35	0,55

n(recidiva)	n(não recidiva)	n(total)	Poder (%)
09	31	40	97%
08	32	40	96%
07	33	40	94%
06	34	40	91%
05	35	40	86%
09	15	24	93%
09	14	23	92%
09	13	22	91%
09	12	21	90%
09	11	20	89%
08	15	23	91%
08	14	22	90%
08	13	21	89%
08	12	20	88%
08	11	19	87%
05	54	59	90%
05	40	45	89%
05	30	35	87%
05	25	30	86%
05	20	25	85%

Os dados foram armazenados e analisados no SPSS 12.0.

4.4.2 Análise univariada

- **Primeira fase**

Comparação entre os grupos de pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV, a partir de análise de média usando-se teste *U-Mann-Whitney* para variáveis contínuas. Estas foram transformadas em categóricas e, assim, fez-se análise univariada empregando-se o teste do Qui-quadrado de *Pearson* e teste exato de *Fisher*: idade, paridade, idade de início de vida sexual, número de parceiros, tabagismo, resultado da citologia oncótica, avaliação colposcópica, resultado de biopsia, anatomopatológico da CAF, sinais de HPV no bloco, avaliação de margens cirúrgicas, avaliação de ocupação glandular, recidiva de lesão e resultado da PCR, para verificar se os grupos eram ou não homogêneos. Considerou-se o nível de significância de 0,05.

- **Segunda fase**

Análise univariada dos casos (peças que recidivaram) e controles (peças que não recidivaram) usando-se o teste do Qui-quadrado de *Pearson* e teste exato de *Fisher* para todas as variáveis categóricas já citadas. Considerou-se o nível de significância de 0,05. As variáveis que apresentaram $p < 0,25$ nesta fase foram levadas para um modelo multivariado por regressão logística.

4.4.3 Análise multivariada

Foi realizada a análise multivariada por regressão logística, para estudo final de associação entre as variáveis significantes e recidiva de NIC.

Todas as variáveis com valor $p < 0,25$ na análise univariada foram incluídas no modelo. Em seguida, aquelas com baixo nível de significância (valor p mais alto) foram retiradas até que restassem apenas as com significância estatística ($p < 0,05$).

4.5 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), parecer nº 239/07 (ANEXO A), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (CEP-SMSA/PBH), protocolo nº 060/2007 (ANEXO B). Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (APÊNDICE A).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 70 peças parafinadas de pacientes infectadas pelo HIV e 68 de não-infectadas, num total de 138 peças.

A análise dos resultados foi dividida em duas etapas, sendo a primeira descritiva, incluindo os grupos das mulheres infectadas pelo HIV (n=70) e não-infectadas (n=68); e a segunda uni e multivariada em relação à recidiva (n=33) ou não de NIC (n=105).

5.1 Primeira etapa de análise dos resultados

5.1.1 Análise descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não-infectadas pelo HIV

Iniciou-se a avaliação dos resultados verificando-se a homogeneidade dos grupos estudados e não foi verificada diferença significativa entre eles quanto a: idade, paridade e idade de início de vida sexual. Quanto ao número de parceiros, salientou-se média de 2,9 nas infectadas pelo HIV e 2,4 nas não-infectadas, variando de um a cinco, excluindo-se 37 pacientes que não informaram (26,8%), sendo significativa a diferença de média entre os grupos (TAB. 1).

TABELA 1

Análise de média de idade, paridade e início da atividade sexual e número de parceiros entre as pacientes infectadas e não-infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana

	HIV-infectadas (n=70)		HIV-não-infectadas (n=68)		Valor P*
	Média ± dp	Mediana (A)	Média ± dp	Mediana (A)	
Idade (anos)	32,5 ± 7,18	31 (20-55)	35,2 ± 10,53	33 (18-71)	0,23
Paridade	2,3 ± 1,88	2 (0-11)	2,8 ± 2,17	2 (0-10)	0,20
Início vida sexual	17,9 ± 3,48	17 (13-29)	17,5 ± 2,00	18 (13-22)	0,58
Nº. parceiros**	2,9 ± 1,30	3 (1-5)	2,4 ± 1,23	2 (1-5)	0,01

* teste U-Mann-Whitney - valor p para média; dp-desvio-padrão ; A – amplitude.

** excluídos 23 casos infectadas HIV e 14 não-infectadas, sem informação.

Na TAB. 2 dicotomizam-se as variáveis sociodemográficas considerando como ponto de corte a média de cada uma (TAB. 1), não se encontrando diferença significativa entre os grupos, exceto em relação ao número de parceiros ($p=0,03$). Quanto ao tabagismo, foi levado em consideração apenas se a paciente era ou não fumante no momento da consulta.

TABELA 2
 Comparação entre as variáveis sociodemográficas,
 segundo a variável vírus da imunodeficiência humana

	HIV- infectadas (n=70)		HIV-não- infectadas (n=68)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Idade							
< 33 anos	41	58,6	34	50,0		1,0	
≥ 33 anos	29	41,4	34	50,0	0,31	0,71	0,36-1,40
Tabagismo							
Não-fumante	45	64,3	44	64,7		1,0	
Fumante	25	35,7	24	35,3	0,96	1,02	0,51-2,05
Nº parceiros							
< 3	16	22,9	30	44,1		1,0	
≥ 3	31	44,3	24	35,3	0,03	2,42	1,08-5,43
Perdas**	23	32,9	14	20,6		---	
Paridade							
< 3	44	62,9	35	51,5		1,0	
≥ 3	26	37,1	33	48,5	0,18	0,63	0,32-1,24
Idade início vida sexual							
≤ 18 anos	50	71,4	48	70,6		1,0	
>18 anos	20	28,6	20	29,4	0,91	0,96	0,49-2,00

*Teste Qui-quadrado *Pearson*.

** Excluídas 37 pacientes que não informaram o número de parceiros.

OR = *odds ratio*.

Analisando os grupos quanto à citologia realizada na época do encaminhamento para a consulta no Serviço de Patologia do Colo, não se destacou diferença significativa ($p=0,15$).

A colposcopia realizada previamente à cirurgia de alta frequência foi mais grave nas pacientes não-infectadas pelo HIV, com diferença significativa entre os grupos ($p=0,000$). Na biopsia, houve predomínio de NIC 2 e 3 nas não-infectadas pelo HIV (85,3%) e de NIC 1 nas infectadas (72,9%), estando compatível com a colposcopia, com diferença também significativa entre os grupos ($p = 0,000$).

No entanto, quando submetidas à CAF, houve aumento do número de casos (18 pacientes) com NIC 2 e 3 nas pacientes infectadas pelo HIV, quando comparado com o resultado da biopsia, enquanto o percentual permaneceu compatível nas não-infectadas pelo HIV (TAB. 3, GRAF. 1).

TABELA 3

Comparação entre citologia, colposcopia, resultado da biopsia e histopatológico da CAF, segundo o vírus da imunodeficiência humana

	HIV-infectadas (n=70)		HIV-não-infectadas (n=68)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Citologia							
Alterada	45	64,3	49	72,0	0,57	0,27-1,23	
Normal	24	34,3	15	22,1	0,15**	1,0	
Ascus	1	1,4	4	5,9	---		
Colposcopia							
Grau II	27	38,6	57	83,8	0,000	0,12	0,05-0,27
Grau I	43	61,4	11	16,2		1,0	
Biopsia							
NIC 2 e 3	19	27,1	58	85,3	0,000	0,06	0,03-0,15
NIC 1	51	72,9	10	14,7		1,0	
CAF							
NIC 2 e 3	37	52,9	59	86,8	0,000	0,17	0,07-0,40
NIC 1	33	47,1	9	13,2		1,0	

* Teste Qui-quadrado *Pearson*.

**valor p excluindo os cinco casos de ASCUS.

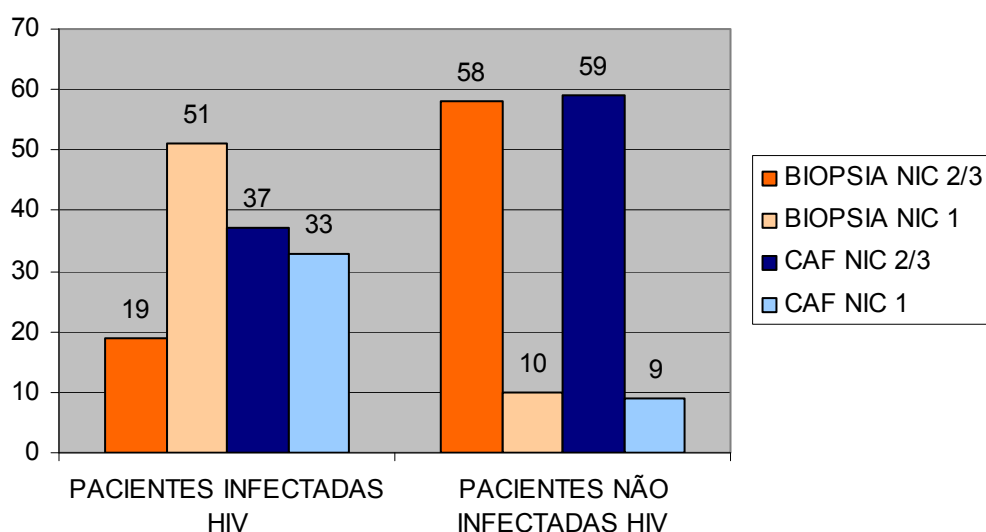


GRÁFICO 1 - Comparação entre o resultado histopatológico da biopsia e da CAF nas pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV.

Na TAB. 4 encontram-se as características histopatológicas do cone cervical. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à ocupação glandular, que estava ausente na maioria dos dois grupos, e as margens cirúrgicas, que se encontravam livres principalmente. Em 12 casos não foi possível avaliar as margens cirúrgicas por apresentarem os bordos queimados.

TABELA 4

Comparação entre as características histopatológicas do cone, segundo o vírus da imunodeficiência humana

	HIV-infectadas (n=70)		HIV-não-infectadas (n=68)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Margens cirúrgicas							
Comprometidas	18	25,7	14	20,6	0,61	1,2	0,55-2,76
Livres	48	68,5	46	67,6		1,0	
Perdas**	4	5,7	8	11,8		---	
Ocupação glandular							
Presente	11	15,7	6	8,8	0,22	1,92	0,67-5,54
Ausente	59	84,3	62	91,2		1,0	

* Teste Qui-quadrado de *Pearson*.

**excluídos 12 casos cujas margens cirúrgicas não foram avaliadas por terem bordos queimados.

Quando se avaliaram sinais sugestivos de infecção pelo HPV no exame histopatológico, não se realçou diferença significativa entre os grupos, embora o HPV estivesse presente em mais de 95% dos casos.

Quanto ao resultado da PCR na pesquisa dos tipos de HPV, lembrando que neste estudo foram pesquisados os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35, também não se evidenciou diferença significativa, embora o HPV de alto risco estivesse presente em mais de 70% dos casos em que a PCR foi positiva para o vírus (TAB. 5).

TABELA 5
Comparação entre o resultado da PCR para HPV,
segundo o vírus da imunodeficiência humana

	HIV- infectadas (n=70)		HIV-não- infectadas (n=68)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Sinais HPV na histopatologia							
Presente	69	98,6	65	95,6	0,36**	3,19	0,32-31,40
Ausente	1	1,4	3	4,4		1,0	
Resultado PCR							
HPV detectado	40	57,1	31	45,6	0,10*	1,77	0,89-3,50
HPV não detectado	27	38,6	37	54,4		1,0	
Perda***	3	4,3					
Tipo HPV****							
Alto e baixo risco	29	72,5	25	80,6	0,43*	0,63	0,21-1,96
Baixo risco	11	27,5	6	19,4		1,0	
Tipo HPV****							
Alto e baixo risco	11	27,5	8	25,8			
Alto risco	18	45,0	17	54,8	0,32*		
Baixo risco	11	27,5	6	19,4			

* Teste Qui-quadrado de *Pearson* ; ** Teste exato de *Fisher*

***excluídos três casos que não tiveram resultado do exame.

**** excluídos os 64 casos negativos pela PCR (Foram pesquisados os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35).

Essas pacientes tiveram seguimento clínico por um período mínimo de um ano, com novas avaliações citológicas e colposcópicas a cada seis meses. Na ocorrência de alteração de algum desses exames, nova biópsia foi realizada. Quando o resultado da biópsia revelou qualquer grau de NIC, foi constatada a recidiva de lesão.

5.2 Segunda etapa de análise dos resultados

5.2.1 Análise univariada dos grupos de pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV em relação à recidiva ou não de neoplasia intraepitelial cervical

No grupo de pacientes infectadas pelo HIV, 25 apresentaram recidiva de NIC e 45 não recidivaram. No grupo de não-infectadas, oito apresentaram recidiva de NIC e 60 não recidivaram. A chance das pacientes infectadas pelo HIV apresentarem recidiva de NIC foi 4,17 vezes a chance das pacientes não-infectadas pelo HIV apresentarem recidiva (IC a 95% = 1,72 – 10,1) (TAB. 6).

TABELA 6

Comparação entre as pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV em relação à recidiva ou não de NIC

	Com recidiva (n=33)		Sem recidiva (n=105)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Infectadas HIV	25	75,6	45	42,9	0,001	4,17	1,72-10,10
Não-infectadas	8	24,2	60	57,1		1,0	

*Qui-quadrado de *Pearson*.

Como pode ser visto na TAB. 7, não houve diferença significativa quanto às variáveis sociodemográficas em relação à recidiva ou não de NIC.

TABELA 7
 Comparação entre as variáveis sociodemográficas,
 segundo a recidiva ou não de NIC

	Com recidiva (n=33)		Sem recidiva (n=105)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Idade							
<33 anos	20	60,6	55	52,4		1,0	
≥ 33 anos	13	39,4	50	47,6	0,41	0,72	0,32–1,59
Tabagismo							
Não-fumante	19	57,6	70	66,7		1,0	
Fumante	14	42,4	35	33,3	0,34	1,47	0,66–3,28
Nº parceiros							
< 3	10	30,3	36	34,3		1,0	
≥ 3	10	30,3	45	42,8	0,66	0,80	0,30–2,13
Perdas**	13	39,4	24	22,9		-----	
Paridade							
< 3	21	63,6	58	55,2		1,0	
≥ 3	12	36,4	47	44,8	0,40	0,71	0,32–1,58
Idade início vida sexual							
≤ 18 anos	22	66,7	76	72,4		1,0	
>18 anos	11	33,3	29	27,6	0,53	1,31	0,57–3,04

*Teste Qui-quadrado *Pearson*.

**Excluídos 37 casos que não informaram o número de parceiros.

De acordo com a TAB. 8, não houve significância entre citologia oncótica, colposcopia, anatomopatológico da biopsia ou da CAF com a recidiva ou não de NIC.

TABELA 8
 Comparação da citologia, colposcopia, resultado da biopsia e
 histopatológico da CAF, segundo a recidiva ou não de NIC

	Com recidiva (n=33)		Sem recidiva (n=105)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Citologia							
Alterada	20	60,6	74	70,5	0,14**	0,54	0,24–1,24
Normal	13	39,4	26	24,8		1,0	
Ascus	0	0	5	4,7		---	
Colposcopia							
Grau II	23	69,7	61	58,1	0,23	1,66	0,72–3,83
Grau I	10	30,3	44	41,9		1,0	
Biopsia							
NIC 2 e 3	16	48,5	61	58,1	0,33	0,68	0,31–1,49
NIC 1	17	51,5	44	41,9		1,0	
CAF							
NIC 2 e 3	23	69,7	73	69,5	0,99	1,01	0,43–2,36
NIC 1	10	30,3	32	30,5		1,0	

* Teste Qui-quadrado *Pearson*.

**exclusão de cinco casos de ASCUS.

Houve diferença significativa quanto às margens cirúrgicas, mostrando que 39,4% das pacientes que recidivaram apresentavam margens comprometidas *versus* 18,1% no grupo que não recidivou ($p=0,02$); ocupação glandular estava presente em 36,4% das pacientes que recidivaram e em 4,8% das que não recidivaram ($p=0,000$) (TAB. 9).

TABELA 9
 Comparação entre as características histopatológicas do cone cervical,
 segundo a recidiva ou não de NIC

	Com recidiva (n=33)		Sem recidiva (n=105)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Margens cirúrgicas							
Comprometidas	13	39,4	19	18,1	0,02**	2,89	1,21-6,91
Livres	18	54,5	76	72,4			
Não avaliadas***	2	6,1	10	9,5			
Ocupação glandular							
Presente	12	36,4	5	4,8	0,000*	11,43	3,64–35,89
Ausente	21	63,6	100	95,2			

* Teste exato de *Fisher*; ** Teste qui-quadrado de *Pearson*;

*** 12 margens não avaliadas por apresentarem bordos queimados.

A descrição histopatológica quanto aos aspectos sugestivos de infecção pelo HPV não foi significativa ($p= 0,57$), embora 100% das peças que apresentavam sinais da infecção tiveram recidiva de NIC.

Quando avaliado o resultado da PCR para HPV em relação à recidiva ou não de NIC, este também não foi significativo ($p=0,27$), embora 61,3% dos casos que recidivaram apresentavam HPV e, destes, 89,5% tinham HPV de alto risco (TAB. 10).

TABELA 10
 Comparação entre o resultado da PCR para HPV,
 segundo a recidiva ou não de NIC

	Com recidiva (n=33)		Sem recidiva (n=105)		Valor p*	OR	IC 95%
	N	%	N	%			
Sinais HPV na histopatologia							
Presente	33	100,0	101	96,2	0,57*		
Ausente	0	0	4	3,8			
Resultado PCR							
HPV detectado	19	57,6	52	49,5	0,27*	1,58	0,70–3,60
HPV não detectado	12	36,4	52	49,5			
Perda***	2	6,0	1	1,0			
Tipo HPV****							
Alto e baixo risco	17	89,5	37	71,2	0,13**	3,45	0,71–16,78
Baixo risco	2	10,5	15	28,8			
Tipo HPV****							
Alto e baixo risco	5	26,3	14	26,9	0,23**		
Alto risco	12	63,2	23	44,2			
Baixo risco	2	10,5	15	28,8			

* Teste Qui-quadrado de *Pearson* ; ** Teste exato de *Fisher*.

***excluídos três casos que não tiveram resultado do exame.

**** excluídos os 67 casos negativos da PCR (foram pesquisados os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35).

5.2.2 Análise multivariada

Foi realizada análise multivariada por regressão logística, incluindo todas as variáveis que tiveram valor $p < 0,25$. Foi incluída a variável tabagismo e também o resultado da PCR nos blocos parafinados, por serem importantes, de acordo com a literatura, apesar de apresentarem valor $p > 0,25$ na análise univariada (TAB. 11). A variável colposcopia foi retirada do modelo de regressão pela sua interação com a citologia ($p = 0,03$) (APÊNDICE B-1).

TABELA 11

Modelo inicial da análise multivariada, segundo a recidiva ou não de NIC

Variável	OR	IC 95%	Valor p
Tabagismo			
sim x não	1,27	0,44-3,62	0,66
Infecção HIV			
sim x não	2,74	0,95-7,87	0,06
Ocupação glandular			
sim x não	10,95	3,02-39,66	0,000
Presença HPV na PCR			
sim x não	1,59	0,57-4,46	0,38
Margens cirúrgicas			
comprometida x livres	2,70	0,91-8,08	0,08
Citologia oncótica			
normal x alterada	0,30	0,10-0,86	0,03

As variáveis sem significância estatística ($p > 0,05$) foram retiradas do modelo inicial e do subsequente na seguinte ordem: tabagismo, resultado da PCR no bloco de parafina, margens cirúrgicas e citologia. O modelo final contou com duas variáveis com significância independentes (testadas quanto à interação e não apresentando significância, com valor $p = 0,24$) para recidiva de NIC (APÊNDICE B-2).

As pacientes infectadas pelo HIV e com ocupação glandular no cone têm mais chance de recidiva de NIC (TAB. 12).

TABELA 12

Modelo final da análise multivariada para recidiva ou não de NIC

Variável	OR	IC 95%	Valor p
HIV (sim)	4,29	1,62-11,34	0,003
Ocupação glandular (sim)	11,78	3,48-39,90	0,000

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo é avaliar os fatores de risco para recidiva de neoplasia intraepitelial cervical em pacientes infectadas ou não pelo HIV, que foram submetidas à cirurgia de alta frequência. Para isso, foram estudadas peças de conização de 138 pacientes que haviam sido submetidas à CAF, por NIC, que estavam estocadas em laboratórios, em blocos de parafina. Esse material foi encaminhado a dois laboratórios de biologia molecular em Belo Horizonte, com a finalidade de detecção do HPV por reação em cadeia da polimerase (PCR), mas, devido a dificuldades técnicas em se realizar o procedimento em material parafinado, houve considerável atraso para o início do estudo. O material foi, então, enviado ao Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foi realizado todo o processo de extração do DNA e da PCR nas peças cirúrgicas.

Foram pesquisados os tipos mais prevalentes de HPV, 6 e 11 de baixo risco e 16, 18, 31, 33 e 35 de alto risco, de acordo com a literatura (CLIFFORD; GONÇALVES, FRANCESCHI, 2006; LEVI *et al.*, 2002; McMURRAY *et al.*, 2001; MUNOZ *et al.*, 2003; 2006; NOMELINI *et al.*, 2007; QUEIROZ, 2007; ZIMMERMANN; MELO, 2002), usando-se um *primer consensus* para cada grupo.

Os resultados serão comentados também em etapas.

6.1 Análise dos grupos de pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV

Encontrou-se idade média de 35 anos para o grupo de pacientes não-infectadas pelo HIV e de 32 anos no grupo de infectadas, estando de acordo com a literatura, que referencia média de idade de 30 a 35 anos (AERSSSENS *et al.*, 2008; BEZERRA *et al.*, 2005; GILLES *et al.*, 2005). Quanto à paridade, não houve

diferença significativa entre os grupos, com média de dois partos, em consonância com o trabalho de Gilles *et al.* (2005), embora Bezerra *et al.* (2005) tenha referido que quanto menor a paridade, mais alto o percentual de mulheres com lesões cervicais. Já o número de parceiros sexuais variou de dois a quatro para esses autores, coincidentemente com o presente resultado, no qual a média encontrada foi de três parceiros das infectadas pelo HIV e dois das não-infectadas, com significativa diferença entre os grupos.

Quanto ao início de atividade sexual, observou-se idade mediana de 18 anos, compatível com a literatura (BEZERRA *et al.*, 2005; MASSAD *et al.*, 1999). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao tabagismo, embora o fumo tenha sido relacionado com infecção pelo HPV e neoplasia cervical em alguns trabalhos (MURTA *et al.*, 2001; PINTO; TULIO; CRUZ, 2002).

Em 22% das pacientes não-infectadas pelo HIV e 34% das infectadas o resultado da citologia oncótica foi normal, sendo este um alto índice de falso-negativo, já que todas as pacientes deste estudo apresentavam algum grau de NIC na biopsia e na CAF. Para Fahey *et al.* (1995) e McGrory *et al.* (1999), a citologia oncótica possui baixa sensibilidade, variando de 30 a 87%, e especificidade variando de 86 a 100%. Fahey *et al.* (1995) acentuaram graves limitações do exame como ferramenta diagnóstica em populações com alta prevalência para NIC.

Os resultados da colposcopia e da biopsia mostraram-se compatíveis com o resultado da citologia oncótica, destacando alto percentual de lesão mais grave nas pacientes não-infectadas pelo HIV. Quando estas foram submetidas à CAF, houve agravamento das lesões no grupo das pacientes infectadas pelo HIV em relação ao resultado da biopsia, devido provavelmente à multicentricidade das lesões. Embora a acurácia diagnóstica da colposcopia esteja bem estabelecida (JORDAN, 1985) e há vários anos a biopsia dirigida pela colposcopia seja considerada a forma adequada de se obter confirmação histológica de lesão intraepitelial cervical (BELLER; KHATAMEE, 1966; KIRKUP; HILL, 1980), alguns estudos enfatizam lesões de mais alto grau quando realizadas técnicas excisionais em relação ao resultado da biopsia anterior, em mulheres infectadas pelo HIV (McINDOE *et al.*, 1989). Achados de 41% de resultados subestimados

pela biopsia em relação à CAF revelam que a biopsia dirigida pela colposcopia não melhora a acurácia diagnóstica na paciente infectada pelo HIV, quando comparada com paciente não-infectada (BUXTON *et al.*, 1991; DEL PRIORE *et al.*, 1996; NAPPI *et al.*, 2005).

Avaliando as características histopatológicas da peça cirúrgica, não foram registradas diferenças significativa entre os grupos, sendo que a maioria apresentava margens livres e ausência de ocupação glandular. Margens livres nem sempre demonstram completa excisão da lesão, devido à possibilidade de lesão multifocal e também por gerar um material inadequado para avaliação de margens que o procedimento pode acarretar (BAE *et al.*, 2007; NEGRI *et al.*, 2003). Foram excluídos da presente pesquisa 12 casos que apresentaram bordos queimados, impossibilitando sua avaliação. Murta *et al.* (1999), em estudo retrospectivo analisando o resultado de conização por NIC 3 em 201 mulheres, sem exame para o HIV, encontraram 26,4% de margens comprometidas. Boardman *et al.* (1999) verificaram alta incidência de margens comprometidas em cones de mulheres infectadas pelo HIV, quando comparadas com não-infectadas (OR: 2,25, IC a 95%: 1.06-4.79), maior tamanho da lesão e frequente envolvimento glandular endocervical, contribuindo para as altas taxas de excisão incompleta. Wright *et al.* (1994b) e Foulot *et al.* (2008) relataram taxas de 15 e 23%, respectivamente, de ocupação glandular em mulheres infectadas pelo HIV. Aqui se encontrou praticamente o dobro de ocupação glandular nas pacientes infectadas pelo HIV (15,7%) em relação às não-infectadas (8,8%), embora não tenha sido significativa a diferença entre os grupos ($p=0,22$).

Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes infectadas ou não pelo HIV quanto aos sinais sugestivos de infecção pelo HPV no exame histopatológico do cone, embora eles estivessem presentes em mais de 95% dos casos, em ambos os grupos. Quando foi realizada a PCR para confirmação e identificação do tipo de HPV, se de alto ou baixo risco, também não se constatou diferença significativa entre os grupos, mas o HPV foi mais frequente nas pacientes infectadas pelo HIV (57,1%) em relação às não-infectadas (45,6%), estando de acordo com a literatura (CAMPOS *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2003; LEVI *et al.*, 2002; MASSAD *et al.*, 1999; SONCINI *et al.*, 2007; VOLKOW *et*

al., 2001; ZIMMERMMAMM; MELO, 2002). Também houve maior prevalência dos tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33 e 35) nos dois grupos e mais de 25% das pacientes apresentavam resultado positivo para HPV de alto e baixo risco, ou seja, múltiplos tipos. Em revisão da literatura realizada por Ferenczy *et al.* (2003), a prevalência da infecção pelo HPV foi maior nas pacientes infectadas pelo HIV quando comparadas às não-infectadas e principalmente por tipos de alto risco oncogênico, como 16 e 18, além de múltiplos tipos.

Embora sinais sugestivos de infecção pelo HPV, no exame histopatológico do cone, tenham sido vistos em mais de 95% das peças estudadas, quando se realizou a PCR o HPV só foi detectado em aproximadamente 45% nos dois grupos. De acordo com Souza, Melo e Castro (2001), comparando os resultados da PCR para pesquisa de HPV com os resultados de sinais sugestivos para HPV na biopsia cervical, a histopatologia apresentou sensibilidade de 61,9% e especificidade de 100%, ou seja, quando a histopatologia fez o diagnóstico de HPV o seu acerto foi de 100%.

6.2 Análise dos grupos em relação à ocorrência ou não de recidiva de NIC

Considera-se doença residual aquela identificada durante o primeiro ano após a conização, ao passo que é considerada recidiva quando acontece após esse primeiro ano (GONZALEZ *et al.*, 2001; MILOJKOVIC, 2002). No trabalho de Lima *et al.* (2009), foi considerado recidiva de lesão o aparecimento ou a persistência de lesão intraepitelial cervical (NIC) identificada por alteração citológica (ANEXO C) e/ou colposcópica (ANEXO D) sempre confirmada por biopsia, considerada padrão ouro na análise, e independentemente do tempo decorrente da primeira conização.

Observou-se que a chance das pacientes infectadas pelo HIV apresentarem recidiva de NIC foi 4,17 vezes a chance das pacientes não-infectadas recidivarem (IC a 95% = 1,72 – 10,1). Fruchter *et al.* (1996) encontraram taxa de recidiva de 45% nas mulheres infectadas pelo HIV e 13% nas não-infectadas ($p < 0,001$).

Gilles *et al.* (2005) encontraram mais recidiva de NIC em mulheres infectadas pelo HIV (78%) em relação às não-infectadas (36%) ($p < 0,001$).

Heard *et al.* (2005), analisando mulheres infectadas pelo HIV, salientaram taxa de recidiva, independentemente do grau de lesão, de 22,3% (IC a 95%: 16,1-30,7); embora muitas das recidivas tenham ocorrido no primeiro ano após a cirurgia, as taxas alcançaram 53,9% em três anos, como os presentes resultados.

Também para Nappi *et al.* (2005) e Massad *et al.* (2007), as pacientes infectadas pelo HIV tiveram mais chances de recidivas de NIC. Assim, para esses autores, o tratamento específico da lesão intraepitelial cervical nesse grupo deve ser agressivo, independentemente da boa resposta à HAART.

Nas pacientes não-infectadas pelo HIV, encontrou-se taxa de recidiva de 24,2%, estando de acordo com Alonso *et al.* (2006), que referiram recidiva de NIC em 17,7% de pacientes não-infectadas pelo HIV, durante o seguimento de dois anos. No entanto, Nagai *et al.* (2000) reportaram taxa de recorrência em mulheres não-infectadas pelo HIV de 8,6% e Cecchini *et al.* (2002) encontraram taxa de 9,1%.

A idade ($p=0,41$), tabagismo ($p=0,34$), paridade ($p=0,40$), início de atividade sexual ($p=0,53$) e número de parceiros ($p=0,66$) não foram significantes em relação à recidiva de NIC, estando de acordo com o estudo de Sarian *et al.* (2005) e Alonso *et al.* (2006), que não informaram relação de idade com recidiva de NIC.

A citologia oncótica também não foi significativa ($p=0,14$), assim como a colposcopia ($p=0,23$), a biopsia ($p=0,33$) e o anatomopatológico da CAF ($p=0,99$), embora a maioria das pacientes que recidivaram tivesse citologias alteradas no encaminhamento, colposcopia grau II e lesão de alto grau (NIC 2/3) no anatomopatológico da CAF. Heard *et al.* (2005) não identificaram relação entre o grau de NIC e o risco de recidiva ou persistência de NIC em mulheres infectadas pelo HIV. Costa *et al.* (2003) afirmaram que idade, grau de lesão na biopsia, grau de lesão no cone, volume do cone, tempo de vida sexual ativa e comprometimento de margem no cone foram significativamente associados à persistência de infecção pelo HPV, e esta estaria associada à recidiva de NIC.

De acordo com as características histopatológicas do cone, a presente pesquisa evidenciou que quando havia comprometimento das margens cirúrgicas e ocupação glandular, as taxas de recidiva de NIC foram mais altas, estando de acordo com outros autores (ALONSO *et al.*, 2007; TYLER *et al.* 2007). Para Bae *et al.* (2007), Derchain, Longatto Filho e Syrjanen (2005) e Negri *et al.* (2003), a cirurgia de alta frequência (CAF) está associada a taxas de recidiva de 1,9 a 39%, sendo mais alto o risco quando estão as margens cirúrgicas comprometidas, embora 15% de pacientes com margens livres apresentassem recidiva de lesão, mostrando valor preditivo baixo do comprometimento de margens na peça cirúrgica. Segundo Maiman *et al.* (1993), envolvimento glandular endocervical, lesões multifocais e infecção persistente pelo HPV podem explicar recidivas em pacientes com margens livres.

Paraskevaidis *et al.* (2000) encontraram envolvimento glandular em 71% das pacientes que recidivaram, tendo margens livres de lesão, comparados com 13% em pacientes que não recidivaram. Os mesmos autores e também Livasy *et al.* (1999) e Lima *et al.* (2009) consideram que a ocorrência de ocupação glandular deve ser mais valorizada que o achado de margens comprometidas no cone, pois as células residuais de margens são facilmente detectadas em exames citológicos e colposcópicos subsequentes. O mesmo não ocorre em relação ao envolvimento glandular, de difícil avaliação colposcópica, podendo manifestar-se mais tardiamente até mesmo como doença avançada.

Na presente pesquisa, o HPV não foi significativo como fator de risco para recidiva de NIC. Na histopatologia do cone, sinais sugestivos de infecção pelo HPV foram descritos em 100% das mulheres que apresentaram recidiva de NIC. Já na PCR, 57,6% dos casos que recidivaram tiveram resultado positivo para os tipos pesquisados, 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35, considerados os mais prevalentes de acordo com a literatura (BOSCH *et al.*, 1995; GÖK *et al.*, 2007; MEIJER; SNIJDERS; CASTLE, 2006; RABELO-SANTOS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; THOMISSON; THOMAS; SHROYER, 2008; ZIMMERMANN; MELO, 2002); e em 36,4% dos casos que recidivaram, esses HPVs não foram detectados.

Como citado anteriormente, a PCR, apesar de seu valor inquestionável e de sua alta sensibilidade em material parafinado, pode ter resultados falso-negativos devido a vários fatores como: quantidade insuficiente de vírus na amostra (MUNOZ *et al.*, 2003; QUEIROZ, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2000; SILVA, 2004; YOKOYAMA *et al.* 2003; WALBOOMERS *et al.*, 1999), qualidade da amostra do DNA que sofre influência dos efeitos de agentes desnaturantes, do tempo e condições de estocagem, assim como a qualidade dos *primers* e o tipo de enzima polimerase usados (DO CARMO FIORINI, 2007; IFTNER; VILLA, 2003; MELO *et al.*, 2005; MESQUITA *et al.*, 2001; NONOGAKI *et al.*, 2004). De acordo com Bertelsen *et al.* (2006), a pureza do DNA-HPV depende principalmente do protocolo usado na extração.

Gómez, Abba e Golijow (2001), em estudo realizado para a detecção do HPV por meio de PCR, analisando 176 amostras de material fresco proveniente de citologia líquida cérvico-vaginal e 30 amostras de material fixado, biopsias embebidas em parafina, não ressaltaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,38$) quando compararam o número de amostras positivas com a frequência dos tipos virais de baixo e alto risco entre os materiais. Também Roda Husman *et al.* (1995), comparando resultados de tipagem de DNA-HPV em esfregaços cervicais arquivados e biopsias cervicais parafinadas das mesmas pacientes com NIC, não detectaram diferença de resultados.

Estudos têm sugerido diversos fatores de risco para prever a persistência do HPV em NIC após a conização, mas resultados controversos têm sido encontrados (COSTA *et al.*, 2003; DALSTEIN *et al.*, 2003). Idade, citologia oncótica, carga viral do HPV, grau da lesão biopsiada, grau da lesão no cone e *status* da ressecção das margens do cone têm sido descritos como fatores de risco para a persistência do HPV (COSTA *et al.*, 2003). No caso de haver resultados negativos de testes para o HPV após o tratamento, a frequência de acompanhamento poderia ser reduzida, particularmente nas pacientes com margens livres (HOUFFLIN *et al.*, 2003).

Em 89,5% dos casos com recidiva encontrou-se o HPV de alto risco e apenas 10,5% que recidivaram apresentaram o HPV de baixo risco. Para Nappi *et al.*

(2005) e Alonso *et al.* (2006; 2007), um importante fator de risco para progressão da lesão é a presença de DNA-HPV de alto risco. Em trabalho de Nagai *et al.* (2000), a maioria das recidivas ocorreu devido à persistência da infecção pelo HPV ou devido à infecção subclínica pelo HPV que não foi completamente erradicada. Esses autores acreditam que também a doença multifocal e o exame inadequado da peça cirúrgica podem explicar a recidiva.

Para Hernádi *et al.* (2005), após conização com excisão de NIC, o HPV-DNA persiste em relevante proporção de casos, com tendência a desaparecer durante um longo seguimento dessas pacientes. Persistência do mesmo tipo de HPV em exames posteriores ao tratamento pode ser considerada um forte preditor de doença residual ou de recorrência. Testes negativos para HPV após tratamento de NIC de alto grau reduzem a probabilidade de recorrência ou doença residual, podendo retornar a paciente a programas de controles habituais.

Kucera *et al.* (2001) e Distefano *et al.* (1998), em *follow-up* pós-tratamento de NIC, encontraram mulheres que persistiram infectadas pelo HPV, o que sugere que o tratamento ablativo é efetivo na erradicação da lesão, NIC, mas não do HPV.

Após análise multivariada por regressão logística, as variáveis importantes para recidiva, encontradas em nosso estudo, foram: a infecção pelo HIV, com OR de 4,29, e a ocupação glandular, que também aumentou a chance em 11,78, estando de acordo com outros trabalhos (GILLES *et al.*, 2005; HEARD *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2009; MASSAD *et al.* 2007; NAPPI *et al.*, 2005; PARAKEVAIDIS *et al.*, 2000).

6.3 Comentários e sugestões finais

Toda paciente, infectada ou não pelo HIV, que tenha sido submetida à cirurgia de alta frequência (CAF) para tratamento de NIC, deve ser acompanhada no pós-tratamento, devido à possibilidade de recidiva de lesão.

Pacientes que tenham sido submetidas à CAF por NIC, que apresentarem comprometimento de margens cirúrgicas no cone e/ou ocupação glandular devem ser seguidas com mais atenção devido a mais chance de recidiva de lesão.

Também precisam de seguimento mais rigoroso as pacientes infectadas pelo HIV, quando comparadas às não-infectadas, devido a mais chance de recidiva de NIC.

O fato de não ter sido encontrada neste trabalho associação significativa entre a infecção pelo HPV e a recidiva de NIC tem duas vertentes: a primeira refere-se à restrição de *primers* de DNA-HPV pesquisados (6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35), não sendo possível descartar totalmente a infecção pelo HPV nessas pacientes; a outra refere-se ao HIV. Os resultados confirmam os achados iniciais de Lima *et al.* (2009) de que a presença do HIV é fator de risco independente para a recidiva. Isto abre um novo caminho para pesquisas em direção à resposta imune local cervical, diante de coinfeção HIV/HPV.

A interação entre HIV e HPV é extremamente complexa e a baixa imunidade local pode ser uma explicação para o aparecimento de lesões sem associação com a imunidade geral (ZIMMERMMANN; MELO; ZIMMERMMANN, 2007). Estudos sobre a resposta imunológica ao HPV e a indução do câncer cervical uterino continuam e a imunoterapia poderá se mostrar eficaz. Acredita-se, também, que o desenvolvimento de uma resposta inflamatória induzida por outras coinfeções poderia levar à predisposição pela infecção pelo HPV (MICHELIN; OLIVEIRA; MURTA, 2008).

7 CONCLUSÕES

- Mulheres infectadas pelo HIV têm risco significativamente mais alto de recidiva de NIC quando comparadas com as não-infectadas pelo HIV; e mulheres submetidas à CAF por NIC, que apresentam ocupação glandular no cone, têm risco significativamente mais alto de recidiva de NIC.
- Os HPVs 16, 18, 31, 33 e 35 (alto risco) foram mais prevalentes nas mulheres que apresentaram recidiva de NIC, quando comparados com os HPVs 6 e 11 (baixo risco).
- Os HPVs 16, 18, 31, 33 e 35 (alto risco) não foram fator de risco para a recidiva de NIC.

REFERÊNCIAS

AERSSSENS, A. *et al.* Natural history and clearance of HPV after treatment of precancerous cervical lesions. **Histopathology**, v. 52, p. 381-386, 2008.

AERSSSENS, A. *et al.* Prediction of recurrent disease by cytology and HPV testing after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. **Cytopathology**, v. 20, p.27-35, 2009.

AGNANTIS, N.J.; SOTIRIADIS, A.; PARASKEVAIDIS, E. The current status of HPV DNA testing. **European Journal of Gynaecology & Oncology**, XXIV, n. 5, p. 351-356, 2003.

ALONSO I. *et al.* Pre and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. **Gynecologic Oncology**, v 103, p. 631-636, 2006.

ALONSO, I. *et al.* High-risk cervical epithelial neoplasia grade 1 treated by loop electrosurgical excision: follow-up and value of HPV testing. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 197, p. 359.e1-359.e6, 2007.

ARAÚJO, A.C.L. *et al.* Associação entre a carga viral e os linfócitos TCD4+ com as lesões intraepiteliais do colo uterino em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 3, p. 106-111, 2005.

BAAY, M.F.D. *et al.* Comprehensive study of several general and type specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinoma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 745-747,1996.

BAE, J.H. *et al.* Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. **International Journal Gynecology Cancer**, v. 17, p. 1271-1277, 2007.

BELLER, F.K.; KHATAMEE, M. Evaluation of punch biopsy of the cervix under direct colposcopic observation (target punch biopsy). **Obstetric Gynecology**, v. 28, p. 622-625, 1966.

BERRÉBI, A.; BADIOU, W.; DUCLUSAUD, A. Fréquence, persistance et récurrence des lésions à HPV du col utérin chez les patientes séropositives pour le VIH. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 36,p. 521-524, 2008.

BERTELSEN, B.I. *et al.* HPV subtypes in cervical cancer biopsies between 1930 and 2004: detection using general primers pair PCR and sequencing. **Virchows Archive**, 2006.

BEZERRA, S.J.S. *et al.* Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.

BISHOP, A. *et al.* Cervical dysplasia treatment: key issues for developing countries. **Bulletin Pan Americano Health Organism**, v. 30, p. 378-386, 1996.

BOARDMAN, L.A. *et al.* Positive cone biopsy specimen margins in women infected with the human immunodeficiency virus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 181, p. 1395-1399, 1999.

BOSCH, F.X. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.

BOSCH, F.X. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 244-265, 2002.

BRANCA, M. *et al.* Factors predicting the persistence of genital human papillomavirus infections and PAP smear abnormality in HIV-positive and HIV-negative women during prospective follow-up. **International Journal of STD & AIDS**, v. 14, p. 417-425, 2003.

BROCKMEYER, A.D. *et al.* Persistent and recurrent cervical dysplasia after loop electrosurgical excision procedure. **American Journal Obstetric Gynecology**, v. 192, p. 1379-1381, 2005.

BUXTON, E.J. *et al.* Colposcopically directed punch biopsy: a potentially misleading investigation. **British Journal of Obstetric & Gynaecology**, v. 98, p. 1273-1276, 1991.

CAMPO, J. *et al.* Oral candidiase as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. Madrid: **Journal Oral Pathology Medicine**, v. 31, n. 1: p. 5-10, 2002.

CAMPOS, R.R. *et al.* Prevalência do papilomavirus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não portadoras do vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 5, p. 248-256, 2005.

CARTER, J. *et al.* Recurrence after treatment for high-grade dysplasia: should we modify our post-treatment surveillance protocols. **Australian New Zealand Journal Obstetric Gynaecology**, v. 46, p. 360-362, 2006.

CAVUSLU, S. *et al.* Analytical sensitivities of hybrid-capture, consensus and type-specific polymerase chain reactions for the detection of human papillomavirus type 16 DNA. **Journal Medicine Virology**, v. 49, p. 319-324, 1996.

CECCHINI, S. *et al.* Recurrence after treatment by loop electrosurgical excision procedure (LEEP) of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Tumori**, v. 88, p. 478-480, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **The Journal of the American Medical Association**, v. 269, p. 729-30, 1993.

CHALKLEY, R.; HUNTER, C. Histone-histone propinquity by aldehyde fixation of chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, p.1304-1308, 1975.

CHAN, S.Y. *et al.* Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting, typing, phylogeny, and taxonomy. **Journal of Virology**, v. 69, p. 3074-3083, 1995.

CHAO, A. *et al.* Usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after conization. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 190, p. 1046-1051, 2004.

CHOI, C.; SEUNG-KWON, H.A.; CHANHEE, C. Development of nested RT-PCR for the detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and comparison with in situ hybridization. **Journal of Virological Methods**, v. 115, p. 67-71, 2004.

CHOO, K.B.; PAN, C.C.; HAN S.H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. **Virology**, v. 61, p. 259-261, 1987.

CLAAS, E.C.J. *et al.* Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. **American Journal of Pathology**, v. 135. n. 4, 1989.

CLIFFORD, G.M.; GONÇALVES, M.A.G.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types among infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, p. 2337-2344, 2006.

CORNELISSEN, M.T.E. *et al.* Localization of human papillomavirus type 16 DNA using the polymerase chain reaction in the cervix uteri of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 2555-2562, 1989.

COSTA, S. *et al.* Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. **Gynecologic Oncology**, v. 90, p. 358-365, 2003.

COUtlÉE, F.; PROVENCHER, D.; GAUTHIER, J. Is there a clinical utility for HPV detection test for screening preinvasive and invasive diseases fo the uterine cervix. **Germes and Ideas**. v. 2, p. 40-44, 1997.

CRUM, C.P.; ROSE P.G. Cervical squamous neoplasia. *In*: CRUM, C.P.; LEE,K.R. (eds). **Diagnostic gynecologic and obstetric pathology**. Philadelphia: Elsevier-Saunders, p. 267-354, 2006.

CULLEN, A.P. *et al.* Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **Journal of Virology**, v 65, p. 606-612, 1991.

CUSCHIERI, K.S. *et al.* Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. **Journal of Clinical Pathologic**, v. 58, p. 946-950, 2005.

DALSTEIN, V. *et al.* Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. **International Journal Cancer**, v. 106, p. 396-403, 2003.

DARREN, R. *et al.* Recrudescence of cervical dysplasia among women who are infected with the human immunodeficiency virus: a case-control analysis. Saint Louis: **American Journal of Obstetric & Gynecology**, v. 186, p. 880-882, 2002.

DAVIS, A.T. *et al.* Cervical dysplasia in women infected with the human immunodeficiency virus (HIV): a correlation with HIV viral load and CD4+ count. **Gynecologic Oncology**, v. 80, p. 350-354, 2001.

de VILLIERS, E.M. *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v 324, p. 17-27, 2004.

de VILLIERS, E.M. Taxonomic classification of papillomaviruses. **Papillomaviruses Reproductive**, v 12, p. 57-63, 2001.

DEL PRIORE, G. *et al.* Colposcopic biopsies versus loop electrosurgical excision procedure cone histology in human immunodeficienty virus-positive women. **Journal Reproductive Medicine**, v. 41, p. 653-657, 1996.

DE PAOLO, G. **Colposcopia e patologia do trato genital inferior**. Rio de Janeiro: Medsi, 1994, 491p.

DERCHAIN, S.F.M.; LONGATTO FILHO, A.; SYRJANEN, K.J. Neoplasia intraepitelial cervical: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, V. 27, p. 425-433, 2005.

DIETRICH, C.S. *et al.* Risk factors for early cytologic abnormalities after loop electrosurgical excision procedure. **Obstetric Gynecology**, v. 99, p.188-192, 2002.

DISTEFANO, A.L. *et al.* Persistence of human papillomavirus DNA in cervical lesions after treatment with diathermic large loop excision. **Infection Disease Obstetric & Gynecology**, v. 6,p. 214-219, 1998.

do CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus humano. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2007.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

DUERR, A.; PARAMSOTHY; JAMIESON, D.J. Effect of HIV infection on atypical squamous cells of undetermined significance. **Clinical Infection Disease**, v. 42, p. 855-861, 2006.

ELLERBROCK, T.V. *et al.* Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **The Journal of the American Medical Association**, v. 283, p. 1031- 1037, 2000.

EVANDER, M.; EDLUND, K.; BODUN, E. Comparison of a one-step and two-step polymerase chain reaction with the degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish Women. **Journal Clinical Microbiologic**, v. 30, p. 987-992, 1992.

EVANDER, M. *et al.* Human papillomavirus infection is transient in Young women: a population-based cohort study. **Journal Infection Disease**, v. 171, p. 1026-1030, 1995.

FAHEY, M.T. *et al.* Meta-analysis of pap test accuracy. **American Journal Epidemiology**, v. 141, n. 7, p. 680-689, 1995.

FAUSCH, S.C. *et al.* Human papillomavirus virus-like particles do not activate langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomavirus. **The Journal of immunology**, v. 169, p. 3242-9, 2002.

FELIX, J.C. *et al.* The significance of positive margins in loop electrosurgical cone biopsies. **Obstetric Gynecology**, v. 84, p. 996-1000, 1994.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI,P.; PARKIN, D.M. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. **IARC CancerBase** no. 5. Lyons, France: IARC Press, 2001.

FERLAY J, AUTIER P, BONIOL M, HEANUE M, COLOMBET M, BOYLE P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Ann of Oncology** 2007; 18 : 581-592.

FERENCZY, A. *et al.* Human papillomavirus and HIV coinfection and risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. **Canadian Medical Association of its Licensors**, v. 169, n. 5, p. 431-434, 2003.

FLANNELLY, G. *et al.* Follow-up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 108, p.1025-1030, 2001.

FOGLE, R.H. *et al.* Predictors of cervical dysplasia after the loop electrosurgical excision procedure in an inner-city population. **Journal Reproductive Medicine**, v. 49, p. 481-486, 2004.

FOULOT, H. *et al.* Surgical management of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 141, p. 153-157, 2008.

FRANCO, E.L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical câncer:epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association Journal**, v. 164, n. 7, p.1017-25, 2001.

FREGA, A. *et al.* Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human Papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. **Cancer Letters**, v. 196, p. 127-3-134, 2003.

FRUCHTER, R.G. *et al.* Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. **Obstetric Gynecology**, v. 87, p. 338-344, 1996.

GALLOWAY, D.A. Papillomavirus vaccines in clinical trials. **Lancet Infection Disease**, v. 3, n. 8, p. 469-475, 2003.

GARDEIL, F. *et al.* Persistent intraepithelial neoplasia after excision for cervical intra-epithelial neoplasia grade III. **Obstetric Gynecology**, v. 89, p. 419-422, 1997.

GILLES, C. *et al.* Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. **Gynecologic Oncology**, v. 96, p. 112-118, 2005.

GÖK M. *et al.* HPV 16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. **Gynecologic Oncology**, v. 104, p. 273-275, 2007.

GOMEZ, M.A.; ABBA, M.C.; GOLIJOW, C.D. Detección y genotipificación del papillomavirus humano (HPV) por PCR-LIS-SSCP. **Revista Argentina de Microbiologia**, v 33, p. 22-27, 2001.

GONÇALVES, M.A.G. *et al.* Anogenital warts contributing to the risk of squamous intraepithelial lesions among HIV-positive women of São Paulo, Brazil. **International Journal of STD & AIDS**, v. 14, p. 309-313, 2003.

GONZALEZ, D.I. *et al.* Recurrence of dysplasia after loop electrosurgical excision procedures with lon-term follow-up. Saint Louis: **American Journal Obstetric Gynecology**, v. 184, p. 315-321, 2001.

GREENBLATT, R.M.; HESSOL, N.A. **Epidemiology and natural history of HIV infection in women**. A guide to the Clinical Care of Women with HIV.2. Hopkins University, p. 1-32, 2001.

GREER, C.E. *et al.* PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. **American Journal Clinical Pathology**, v. 95,p. 117-124, 1991.

HARRIS, T.G. *et al.* Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and Human papillomavirus Test Results. **The Journal of the American Medical Association**, v. 293, n.12, p. 1471-1476, 2005.

HAWS, A.L.F. *et al.* Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 87- 93, 2004.

HEARD, I. *et al.* Highly active antiretroviral therapy enhances regression of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive women. **AIDS**, v. 16, n. 13, p. 1799-1802, 2002.

HEARD, I. *et al.* The impact of HIV antiviral therapy on human papillomavirus (HPV) infections and HPV-related diseases. **Antiviral Therapy**, v. 9, p. 13-22, 2004.

HEARD, I. *et al.* High rate of recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after surgery in HIV-positive women. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 39, p. 412-418, 2005.

HERNÁDI, Z. *et al.* Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 118, p. 229-234, 2005.

HERRERO, R.; MUNOZ, N. Human papillomavirus and cancer. **Cancer Surveys**, v. 33, p. 75-98, 2000.

HILDESHEIM, A. *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **Journal Infection Disease**, v. 169, p.235-240, 1994.

HOLCOMB, K. *et al.* The efficacy of cervical conization in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-positive women. **Gynecology & Oncology**, v. 74, p. 428-431, 1999.

HOUFFLIN, D.V. *et al.* Value of human papillomavirus testing after conization by loop electrosurgical excision for high-grade squamous intraepithelial lesions. **Gynecologic Oncology**, v. 90, p. 587-592, 2003.

HUANG, L.W. *et al.* Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improve DNA detection and typing in archival tissues. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, p. 271-276, 2004.

HUBBARD, R.A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 940-945, 2003.

IFTNER, T.; VILLA, L.L. Human papillomavirus technologies. **Journal of National Cancer Institute Monographs**, USA, n. 31, 2003.

JACKSON, D.P. *et al.* Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **Journal Clinical Pathology**, v. 43, p. 499-504, 1990.

JAIN, S. *et al.* Negative predictive value of human papillomavirus test following conization of the cervix uteri. **Gynecology & Oncology**, v. 82, p. 177-180, 2001.

JOHNSON, N. *et al.* Predicting residual disease after excision of cervical dysplasia. **Annual International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 110, p. 952-955, 2003.

JORDAN, J.A. Management of CIN, VAIN and VIN. *In*: SHEPHERD, J.H.; MONAGHAN, J.M. editors. **Clinical Gynaecological Oncology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications; p. 38-53, 1985.

JUNG, K. *et al.* Development of Polymerase Chain Reaction and Comparison with *In situ* Hybridization for the Detection of *Haemophilus parasuis* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 841-845, 2004.

KANODIA, S. *et al.* Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KARLSEN, F. *et al.* Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. **Laboratory Investigation** v. 71, p. 604-611, 1994.

KIRKUP, W.; HILL, A.S. The accuracy of colposcopically directed biopsy in patients with suspected intraepithelial neoplasia of the cervix. **British Journal of Obstetric Gynaecology**, v. 87, p. 1-4, 1980.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **American Journal Medicine**, v. 102, p. 3-8, 1997.

KREIMER, A.R. *et al.* Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. **Cancer Epidemiologic Biomarkers Prevention**, v. 15, p. 908-914, 2006.

KUCERA, E. *et al.* Is high-risk human papillomavirus infection associated with cervical intraepithelial neoplasia eliminated after conization by large-loop excision of the transformation zone? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 100, n. 1, p. 72-76, 2001.

LEVI, G. *et al.* Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 31, p. 178-184, 2005.

LEVI, J.E. *et al.* High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3341-3345, 2002.

LEVI, J.E. *et al.* Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p. 225-231, 2004.

LI, C.C.H. *et al.* Identification of the human papillomavirus E2 protein in genital tract tissues. **Journal of Virology**, v 62, p. 606-609, 1988.

LIMA, M.I.M. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 104, p. 100-104, 2009.

LIMA, M.I.M. *et al.* Fatores de risco de recidiva de lesões intraepiteliais cervicais após conização por cirurgia de alta frequência em mulheres portadoras e não portadoras do vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 9: p. 536-44, 2006.

LIN, C. *et al.* Value of human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing after conization in the prediction of residual disease in the subsequent hysterectomy specimen. **American Journal Obstetric Gynecology**, v. 184, p. 940-945, 2001.

LIVASY, C.A. *et al.* Predictors of recurrent dysplasia after a cervical loop electrocautery excision procedure for CIN 3: a study of margin, endocervical gland and quadrant involvement. **Modern Pathology**, v. 12, p. 233-238, 1999.

LIVASY, C.A.; MOORE, D.T.; VAN LE L. The clinical significance of a negative loop electrosurgical cone biopsy for high-grade dysplasia. **Obstetric Gynecology**, v. 104, p. 250-254, 2004.

LOPES, R.L.M.; SOUZA I.B.O. Prevenção de cancer cérvico uterino: desafio para todos. **Femina**, v. 23, n. 5, p. 463, 1995.

LORINCZ, A.T. *et al.* Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstetric & Gynecology**, v, 79, p. 328-37, 1992.

LUESLEY, D.M. *et al.* Loop diathermy excision of the cervical transformation zone in patients with abnormal cervical smears. **British Medical Journal (BMJ)**, v. 300, p. 1690-1693, 1990.

MAIMAN, M. *et al.* Colposcopic evaluation of human immunodeficiency virus-seropositive women. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 78, n. 1, p. 84-88, 1991.

MAIMAN, M. *et al.* Recurrent cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstetric Gynecology**, v. 82, p. 170-174, 1993.

MANDELBLATT, J.S. *et al.* Association between HIV infection and cervical neoplasia: Implications for clinical care of women at risk for both conditions. **AIDS**, v. 6, p. 173-178, 1992.

MANOS, M.M. *et al.* Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p.209-214, 1989.

MARKOWITZ, L.E. *et al.* Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports**, v. 56, p. 1-24, 2007.

MARTIN-HIRSCH, P.L. *et al.* **Surgery for cervical intraepithelial neoplasia.** Cochrane Database System Revue, 2000: CD001318.

MASSAD, L.S. *et al.* Prevalence and Predictors of Squamous Cell Abnormalities in Papanicolaou Smears From Women Infected With HIV-1. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 21, p. 33-41, 1999.

MASSAD, L.S. *et al.* Evolution of cervical abnormalities among women with HIV-1: evidence from surveillance cytology in the women's interagency HIV study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 27, p. 432-442, 2001.

MASSAD, L.S. *et al.* Outcomes after treatment of cervical intraepithelial neoplasia among women with HIV. **Journal of Low Genital Tract Disease**, V. 11, n. 2, p. 90-97, 2007.

McINDOE G.A. *et al.* Laser excision rather than vaporization: the treatment of choice for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstetric Gynecology**, v. 74, p. 165-168, 1989.

MCGRORY, D.C. *et al.* **Evaluation of cervical cytology.** Evidence Report Technology Assessment, Rockville, p. 1-6, 1999.

MCMURRAY, H.R. *et al.* Biology of Human papillomaviruses. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, p. 15-33, 2001.

MEIJER, C.J.; SNIJDERS, P.J.; CASTLE, P.E. Clinical utility of HPV genotyping. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 12-17, 2006.

MELO, A. *et al.* Detection of human papillomavirus in cytologic samples or biopsies of the cervix. **Revista Medica de Chile**, v. 133, p. 639-644, 2005.

MELBYE, M. *et al.* Anal and cervical abnormality in women prediction by human papillomavirus tests. **International Journal of Cancer**, v. 68, p. 559-564, 1996.

MESQUITA, R.A. *et al.* Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA using PCR. **Pesqui Odontol Brás**, v. 15, p. 314-319, 2001.

MICHELIN, M.A.; OLIVEIRA, H.S.; MURTA, E.F.C. Resposta imune nas lesões intraepiteliais do colo uterino. **Femina**, v. 36, n. 1, p. 9-13, 2008.

MINKOFF, H. *et al.* The effect of highly active antiretroviral therapy on cervical cytologic changes associated with oncogenic HPV among HIV-infected women. **AIDS**, v. 15, n. 16, p. 2157-2164, 2001.

MITCHELL, M.F. *et al.* A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Obstetrics and Gynecology**, v. 92, p. 737-744, 1998.

MILOJKOVIC, M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III. New York: **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 76, p. 49-53, 2002.

MOHAR, A.; FRIAS-MENDIVIL, M. Epidemiology of cervical cancer. **Cancer Investigation**, v. 18, p. 584-590, 2000.

MONINI, P. *et al.* Antitumor effects of antiretroviral therapy. **Nature Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 861-875, 2004.

MONSONEGO, J. *et al.* Cervical cancer control, priorities and new directions. **International Journal of Cancer**, v. 108, p. 329-333, 2004.

MUNOZ, N. *et al.* Epidemiologic Classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MUNOZ, N. *et al.* HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, C. 1: p. 3- 10, 2006.

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

MUNOZ, N. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. En: MUNOZ, N.; BOSH, F.; SHAH, K. (ed). **HPV and cervical cancer**. International Agency for Research on Cancer Scientific Publications, Lyon, France, Publications, v. 110, p. 251-262, 1992.

MURDOCH, J.B. *et al.* Histological incomplete excision of CIN after large loop excision of the transformation zone (LLETZ) merits careful follow up , not retreatment. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 99, p. 990-993, 1992.

MURTA, E.F. *et al.* Importance of surgical margins in conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Archive Gynecology Obstetric**, v. 263, p. 42-44, 1999.

MURTA, E.F.C. *et al.* Infecção pelo papilomavirus humano em adolescents: Relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 4, p. 217-221, 2001.

NAGAI, Y. *et al.* Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: Is it an alarm for disease recurrence? **Gynecology Oncology**, v. 79, p. 294-299, 2000.

NAGI, C.S.; SCHLOSSHAUER, P.W. Endocervical glandular involvement is associated with high-grade SIL, **Gynecology Oncology**, v. 102, p. 240-243, 2006.

NAMKOONG, S.E. Clinical application of HPV typing in cervical cancer. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, suppl. 49, p. 59-67, 1995.

NAPPI, I. *et al.* Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence and progression , in treated and untreated women. **European Journal of Obstetric Gynecology & Reproductive Biology**, v. 121, p. 226-232, 2005.

NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES DIVISION OF HIV/AIDS. **Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults.** 1993.

NEGRI, G. *et al.* Human Papilloma Virus Typing at Large Loop Excision of the Transformation Zone of the Cervix Uteri. **Anticancer Research**, v. 23, p. 4289-4292, 2003.

NOEL, J.C. *et al.* Intérêt de la recherché des séquences virales HPV dans le dépistage du cancer du col. **Annales de Pathologie**, v. 26,p. 389-396, 2006.

NOMELINI, R.S. *et al.* Prevenção do câncer de colo uterino: testes biomoleculares para HPV. **Femina**, v. 35, p. 295-299, 2007.

NONOGAKI, S. *et al.* Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identifying HPV infections in samples collected in a new collection medium. **Acta Cytologica**, v. 48, p. 514-520, 2004.

NUOVO, J. *et al.* Treatment outcomes for squamous intraepithelial lesions. **International Journal Gynaecology Obstetric**, v. 68, p.25-33, 2000.

PALEFSKY, J.M. Biology of HPV in HIV infection. **Advances in Dental Research**, v .19, p. 99-105, 2006.

PALEFSKY, J.M. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. **Current Opinion in Oncology**, v. 15, p. 382-388, 2003.

PALEFSKY J.M. *et al.* Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV) positive and high-risk HIV positive. **Journal Infection Disease**, v. 183, n. 3, p. 383-391, 2001.

PALEFSKY, J.M. *et al.* Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV) positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, p. 226-236, 1999.

PARASKEVAIDIS, E. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after loop excision with clear margins. London: **Obstetric Gynecology**, v. 95, p. 828-831, 2000.

PARASKEVAIDIS, E. *et al.* Factors affecting outcome after incomplete excision fo cervical intraepithelial neoplasia. **European Journal of Gynaecology & Oncology**, v. 24, p. 541-543, 2003.

PARASKEVAIDIS E. *et al.* Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstetric Gynecology**, v. 98, p. 833-6, 2001.

PARK, J.S. *et al.* Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. **Gynecologic Oncology**, v. 65, p. 121-129, 1997.

PINTO, A.P.; CRUM C.P. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. **Clinical Obstetric Gynecology**, v. 43, p. 352-362, 2000.

PINTO, A.P.; TULIO, S.; CRUZ, O.R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.

PRATO, B. *et al.* Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. **International Journal Gynecologic Cancer**, v. 18, p. 90-94, 2008.

PRENDIVILLE, W. *et al.* Large loop excision of the transforming zone (LLETZ): a new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. **British Journal Obstetric Gynaecology**, v. 96, p.1054-1060, 1989.

QU, W. *et al.* PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1304-1310, 1997.

QUEIROZ, C.M.P. HPV: epidemiologia e oncogênese. Curso de atualização dos aspectos diagnósticos e prognósticos em lesões induzidas pelo HPV no colo uterino e na coinfeção HPV-AIDS, p.11-15, 2007.

QUEIROZ, J.C.M.P. **Expressão de proteínas do ciclo celular e de moléculas de adesão na carcinogênese cervical.** (Tese Doutorado), Universidade Federal da Bahia. 2003. 128 p.

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**, v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. Manual de HIV/AIDS. 6. ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, p. 1-189, 2001.

RAKOCZY, P. *et al.* Time trends in the prevalence of human papillomavirus infections in archival Papanicolaou smears: analysis by cytology, DNA hybridization, and polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 32, p. 10-17, 1990.

REAGAN, J.W.; HARMONIC, M.J. Dysplasia of the uterine cervix. New York: **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, p. 662-682, 1956.

RICHART, R.M. Cervical intraepithelial neoplasia: a review. *In*: SOMMERS, S.C. (ed). **Pathology Annual**. East Norwalk, CT: Appleton-century-crofts, p. 301-28, 1973.

ROBINSON, W.R. *et al.* Effect of excisional therapy and highly active antiretroviral therapy on cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 184, n. 4, p. 538-543, 2001.

ROBINSON, W.R. *et al.* Isotretinoin for low grade cervical dysplasia in human immunodeficiency virus-infected women. **Obstetric Gynecology**, v. 99, p. 777-784, 2002.

RODA HUSMAN, A.M. *et al.* Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. **British Journal of Cancer**, v. 72, p. 412-417, 1995.

RUSSOMANO, F. *et al.* HIV prevalence in women with cervical intraepithelial neoplasia. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexuais Transmissíveis**, v. 13, n. 2, p. 37-39, 2001.

SANJOSÉ, S. *et al.* Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 453-459, 2007.

SARIAN, L. O. *et al.* HPV DNA test and Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical excision procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 94, p. 181-186, 2004a.

SARIAN, L.O. *et al.* Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ) **Journal Clinical Virology**, v. 31, p. 270-274, 2004b.

SARIAN, L.O. *et al.* Human papillomavirus detection by hybrid capture II and residual or recurrent high-grade squamous cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of the transformation zone (LLETZ) **Tumori**, v. 91, p. 188-192, 2005.

SCHEURER, M.E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, p. 727-746, 2005.

SCHIFFMAN, M.H.; BRINTON, L.A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer**, v. 76 Suppl: 1888-1901, 1995.

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

SCHIFFMAN, M.H. *et al.* HPV DNA testing in cervical cancer screening results from women in a high-risk province of Costa Rica. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, p. 87-93, 2000.

SCHIFFMAN, M.;HILDESHEIM A. Human papillomavirus testing as a screening tool for cervical cancer. **Journal of the American Medical Association**, v. 283. p. 2525-2526, 2000.

SCHWARZ, E. *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, v. 314, p.111-114, 1985.

SCHWARTZ, S.M. *et al.* Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population based study. **Journal Clinical Oncology**, v. 19, p. 1906-1915, 2001.

SHIBATA, D.K.; ARNHEIM, N.; MARTIN, W.J. Detection of human papilloma vírus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 225-230, 1988.

SILVA, T.T. *et al.* Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, p. 285-291, 2006.

SILVA, T.T. **Fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical em pacientes submetidas à avaliação morfológica e pesquisa de DNA-HPV.** Tese Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SKINNER, E.N.; GEHRIG, P.A.; VAN LE, L. High-grade squamous intra-epithelial lesions: abbreviating posttreatment surveillance. **Obstetric Gynecology**, v. 103, p. 488-492, 2004.

SKJELDESTAD, F.E. *et al.* Residual and recurrent disease after laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstetric Gynecology**, v. 90, p. 428-433, 1997.

SONCINI, E.; CONDEMI V. Intraepithelial cervical carcinoma and HIV, Prevalence, risk factors and prevention strategies. **Minerva Gynecology**, v. 55, n. 1, p. 51-55, 2003.

SONCINI, E. *et al.* Reduction of the risk of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women treated with highly active antiretroviral therapy. **Acta Bio-medica**, v. 78, p. 36-40, 2007.

SOUZA, N.S.T.; MELO, V.H.; CASTRO, L.P.F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

STANLEY, M.A. Immunobiology of papillomavirus infections. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 45-59, 2001.

STOLER, M.H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 935-939, 2003.

SUN, X.W. *et al.* Evaluation of the hybrid capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. **American Journal of Obstetric Gynecology**, v. 173, p. 1432-1437, 1995.

SUN, X.W. *et al.* Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. **New England Journal Medicine**, v. 337, p. 1343-9, 1997.

SZOSTEK, S. *et al.* Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 603-607, 2006.

TATE, D.R.; ANDERSON, R.J. Recrudescence of cervical dysplasia among women who are infected with the human immunodeficiency virus: a case-control analysis. Fort Worth (Texas). **American Journal Obstetrics & Gynecology**, v. 186, n. 5, p. 880-882, 2002.

THOMISSON III, J.; THOMAS, L.K.; SHROYER, K.R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

TUCKER, R.A. *et al.* Using the polymerase chain reaction to genotype human papillomavirus DNAs in samples containing multiple HPVs may produce inaccurate results. **Journal of Virology Methods**, v. 43, p. 321-333, 1993.

TYLER, I.N. *et al.* Significance of margin and extend of dysplasia in loop electrosurgery excision procedure biopsies performed for high-grade squamous

intraepithelial lesion in predicting persistent disease. **Archive Pathologic Laboratory Medicine**, v. 131, p. 622-624, 2007.

VAN DEN BRULE, A.J.C. *et al.* Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2739-2743, 1990.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. *et al.* **Virus taxonomy**: seventh report of the international committee on Taxonomy of virus, Academic Press. California. 1999.

VERGUTS, J. *et al.* Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v, 113, p. 1303-1307, 2006.

VOLKOW, P. *et al.* High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus. **Gynecologic Oncology**, v. 82, p. 27-31, 2001.

WAGNER, T.M. *et al.* Different pattern of AIDS-defining diseases in persons responding to highly active antiretroviral therapy. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 26, p. 394-395, 2001.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cervical Cancer Screening in Developing Countries**. Report of a WHO Consultation; 2002. Accessed at: http://www.who.int/cancer/media/en/cancer_cervical_37321.pdf.

WRIGHT, J.T.C. Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: basis for a 2-tiered morphologic classification system. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v 94, n. 1, p. s22-31, 2006.

WRIGHT, T.C. *et al.* Cervical Intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 84, 4, p. 591-597, 1994a.

WRIGHT, T.C. *et al.* Cervical Intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus: outcome after loop electrosurgical excision. **Gynecology & Oncology**, v. 55 p. 253-258, 1994b.

WRIGHT, T.C.; KURMAN R.J.; FERENCY A. Precancerous lesions of the cervix. *In*: KURMAN, R.J. (ed). **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract**. 5th ed. Baltimore: Springer Verlag, p. 253-324, 2002.

WRIGHT, T.C.; SCHIFFMAN, M. Adding a test for human Papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 489-490, 2003.

WRIGHT, T.C. *et al.* 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. **American Journal of Obstetric Gynecology**, v. 189, p. 295-304, 2003.

YOKOYAMA, M. *et al.* Prognostic factors associated with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan. **Cancer Letters**, v. 192, p. 171-179, 2003.

ZAITOUN, A.M. *et al.* Completeness of excision and follow-up cytology in patients treated with loop excision biopsy. **Journal Clinical Pathology**, v. 53, p. 191-196, 2000.

ZIELINSKI, G.D. *et al.* HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 59, p. 543-553, 2004.

ZIMMERMMANN, J.B. *et al.* Associação entre a contagem de linfócitos TCD4+ e a gravidade da neoplasia intraepitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em pacientes soropositivas para o HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 6, p. 345-351, 2006.

ZIMMERMMANN, J.B.; MELO, V.H. Prevalência dos genótipos do papilomavirus humano na cérvix uterina de pacientes infectadas com o vírus da imunodeficiência humana e sua associação com o grau das lesões do colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 6, p. 419, 2002.

ZIMMERMMANN, J.B.; MELO, V.H., ZIMMERMMANN, S. Resposta imune local nas lesões do colo uterino induzidas pelo HPV em mulheres soropositivas para o HIV. **Femina**, v. 35, n. 12, p. 771-776, 2007.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 690-698, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, p. 260-265, 2009.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A – Parecer do COEP-UFMG

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
------	--


Parecer nº. ETIC 239/07

**Interessado(a): Prof. Vitor Hugo de Melo
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina-UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de agosto de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**O Papilomavírus Humano como fator de risco para recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV, submetidas a conização por cirurgia de alta frequência**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Parecer do CEP-SMSA/PBH



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE (CEP-SMSA/PBH)

Avaliação de adendo ao projeto de pesquisa – Protocolo 060/2007

Nome do Projeto: O Papilomavírus humano como fator de risco para recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV, submetidas à conização por cirurgia de alta frequência.

Pesquisador responsável: Victor Hugo de Melo - Mestranda Claudia Teixeira Lodi

Trata-se de um estudo de caso-controle com os seguintes objetivos:

- Avaliar a prevalência do Papiloma vírus humano (HPV) em pacientes soropositivo e soronegativo para o HIV, submetidas a cirurgia de alta frequência (CAF), que apresentaram recidiva das lesões intra-epiteliais cervicais.
- Avaliar se o HPV de alto risco foi fator de risco para recidiva dessas lesões intra-epiteliais cervicais.
- Avaliar a relação entre a gravidade das lesões que recidivaram com o tipo de HPV.

O estudo será realizado a partir de peças de conização do colo uterino de pacientes HIV+ atendidas no CTR (que fazem parte do Programa multicêntrico para Controle e Prevenção das lesões cervicais de alto grau e do câncer cervico-uterino em mulheres portadoras do HIV) e de pacientes HIV- oriundas do PAM Sagrada Família. As pacientes serão abordadas durante consulta de retornos já agendados. As que não têm retorno agendado serão solicitadas a comparecer ao PAM ou CTR. Serão contatadas para obtenção do TCLE. Havendo concordância da paciente, uma cópia do TCLE será enviada ao Laboratório Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatológicas, que fornecerá o bloco parafinado para análise no Laboratório das Interações celulares, departamento de Morfologia do ICR.

Os casos serão as amostras com recidiva e os controles as que não recidivaram. Estimativa de tamanho de amostra: 43 peças de pacientes HIV+ e 59 de pacientes HIV-, para alcançar poder estatístico de 90%. A casuística será composta de material parafinado de 94 pacientes HIV+ e 107 HIV-.

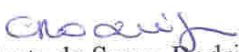
O material parafinado está estocado no Laboratório Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatológicas, que foram objeto de estudo da Tese de Doutorado de Maria Inês Miranda Lima (período de 1999 a 2003). Os testes moleculares de detecção e tipagem do HPV serão realizados no Laboratório de Biologia das Interações Celulares, do Departamento de Morfologia, ICB/UFMG.

Será realizada análise univariada e multivariada para estudo de associação entre variáveis categóricas. A variável resposta principal é a ocorrência de recidiva de lesão em pacientes HIV+ e HIV-; as covariáveis são o resultado do HPV e o tipo de HPV. A comparação entre os grupos será feita pelo teste Qui-quadrado de Pearson e análise de variância.

Parecer:

O projeto acima referido cumpriu os requisitos da resolução 196/96 da CONEP, tendo sido aprovado na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao CEP um ano após início do projeto ou ao final desde, se em prazo inferior a um ano.


Celeste de Souza Rodrigues
Coordenadora do CEP-SMSA/PBH

Celeste de Souza Rodrigues - BM. 37316-1
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - SMSA/BH

Belo Horizonte, 03 de março de 2008.

ANEXO C - CLASSIFICAÇÃO CITOLÓGICA DE BETHESDA

- Adequação das lâminas:
 - Satisfatória
 - Insatisfatória
- Dentro dos limites da normalidade
- Alterações celulares benignas (reativas)
- Anormalidades em células epiteliais
- Em células escamosas
 - 1- ASCUS – Atipias celulares de grau indeterminado
 - 2- LSIL – Lesão intraepitelial de baixo grau – condilomas e NIC 1
 - 3- HSIL – Lesão intraepitelial de alto grau – NIC 2 e 3
 - 4- Carcinoma de células escamosas
- Em células glandulares
 - 1- AGUS – Atipias em células glandulares de grau indeterminado
 - 2- Adenocarcinoma

ANEXO D - CLASSIFICAÇÃO COLPOSCÓPICA INTERNACIONAL

APROVADA PELA FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA. ROMA, 1990.

A) Achados colposcópicos normais

Epitélio escamoso original
Epitélio colunar
Zona de transformação normal

B) Achados colposcópicos anormais

1- dentro da zona de transformação (ZT)

epitélio acetobranco – plano
- micropapilar

pontilhado
mosaico
leucoplasia
zona iodo-negativa
vasos atípicos

2- fora da zona de transformação

(ectocérvice e vagina)
epitélio acetobranco
pontilhado
mosaico
leucoplasia
zona iodo-negativa
vasos atípicos

C) Achados colposcópicos sugestivos de câncer invasor

D) Achados colposcópicos insatisfatórios

Junção escamo-colunar (JEC) não visível
Inflamação ou atrofia intensas
Cérvice não visível

E) Miscelânea

Superfície micropapilar não acetobranca
Condiloma exofítico
Inflamação
Atrofia
Úlcera
Outros achados

Alterações menores (Grau I)

Epitélio acetobranco
Mosaico fino
Pontilhado fino
Leucoplasia tênue

Alterações maiores (Grau II)

Epitélio acetobranco acentuado
Mosaico áspero
Pontilhado áspero
Leucoplasia densa
Vasos atípicos
Erosão

(FONTE: De Paolo, 1994, p. 43.)

ANEXO E – Diagnóstico Sorológico da Infecção pelo HIV (comentários sobre a Portaria 488/98 do Ministério da Saúde)

A fim de maximizar o grau de confiabilidade na emissão dos laudos, bem como minimizar a ocorrência dos resultados falso-negativos ou falso-positivos, o Ministério da Saúde, através da Portaria número 488, de 17 de junho de 1998, estabelece a obrigatoriedade de um conjunto de procedimentos sequenciados para os testes que visam a detectar anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de dois anos.

Ao chegar a um laboratório, com uma solicitação de teste anti-HIV, o indivíduo tem sua amostra de sangue coletada. Após a coleta, esta amostra é centrifugada, para a obtenção do soro ou plasma que será utilizado nos testes.

A amostra de soro ou plasma deve ser inicialmente submetida à primeira etapa do conjunto de procedimentos sequenciados obrigatórios previstos na Portaria, denominada etapa de triagem sorológica.

Nessa etapa, a amostra deve ser submetida a dois testes distintos, e paralelo. Esses dois testes, denominados teste 1 e 2, devem possuir princípios metodológicos e/ou antígenos diferentes e, pelo menos um deles, deve ser capaz de detectar anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Além disso, todos os conjuntos de diagnóstico (*Kits*) utilizados para a realização dos testes devem estar registrados no Ministério da Saúde.

Após a realização da etapa de triagem sorológica, podemos encontrar 3 situações:

- 1- Caso a amostra apresente resultados não reagentes nos dois testes, terá seu resultado definido como "Amostra negativa para HIV". Neste caso, o resultado é liberado para o paciente.
- 2- Caso a amostra apresente resultados reagentes nos dois testes, deverá ser submetida à etapa de confirmação sorológica prevista na Portaria.
- 3- Caso a amostra apresente resultados discordantes ou indeterminados nos testes 1 e 2, deverá ser retestada e duplicata, com os mesmos conjuntos de diagnóstico (1 e 2).

Após a retestagem em duplicata, podemos encontrar:

- 1- Caso a amostra apresente resultados não reagentes nos dois testes, terá seu resultado definido como "Amostra negativa para HIV". Neste caso, o resultado é liberado para o paciente.
- 2- Caso a amostra possua resultados reagentes, discordantes ou indeterminados nos dois testes, deve ser submetida à etapa de confirmação sorológica.

A seguir vem a etapa de confirmação sorológica. Esta etapa deve ser realizada em amostras que apresentarem resultados que necessitem de confirmação. Neste caso, o Ministério da Saúde preconiza a realização dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e/ou *Western Blot* (WB).

Na maioria dos casos, amostras que necessitem ter seu resultado confirmado são elucidadas através do teste de IFI. Em alguns casos, além deste, é necessária a realização do teste WB.

Recapitulando, após a realização da etapa de triagem, podemos ter duas situações em que há necessidade de confirmação do resultado:

- 1- amostras que possuam resultados reagentes nos testes 1 e 2
- 2- amostras que possuam resultados discordantes ou indeterminados nos testes 1 e 2.

Uma vez realizado o teste de IFI, podemos encontrar duas situações distintas:

- 1- amostra com resultado reagente no teste de IFI terá seu resultado definido como "Amostra positiva para HIV-1". Neste caso, é obrigatória a coleta de uma nova amostra para confirmação da positividade da primeira amostra.
- 2- amostra com resultado indeterminado ou negativo no teste de IFI, devem ser submetidas ao teste de WB.

Após a realização do teste WB, podemos encontrar as seguintes situações:

- 1- amostra reagente no teste de WB, terá seu resultado definido como "Amostra positiva para HIV-1". Neste caso é obrigatória a coleta de uma nova amostra para confirmação da positividade da primeira amostra.

- 2- amostra indeterminada terá seu resultado definido como "Amostra indeterminada para HIV-1". Neste caso, deverá ser submetida à investigação de anticorpos anti-HIV-2. Recomenda-se, ainda, a coleta de nova amostra após 30 dias e a repetição de todo o conjunto de procedimentos sequenciados.
- 3- amostra negativa terá seu resultado definido como "Amostra negativa para HIV-1". Neste caso, deverá ser submetida à investigação de anticorpos anti-HIV-2. Recomenda-se, ainda, a coleta de nova amostra após 30 dias e a repetição de todo o conjunto de procedimentos sequenciados.

Convém observar que é obrigatória a coleta de uma segunda amostra e a repetição da etapa de triagem sorológica (etapa 1), sempre que uma amostra apresentar resultado definido como "Amostra positiva para HIV-1". Caso os resultados da testagem da segunda amostra sejam não reagentes ou indeterminados, deverão ser cumpridas todas as etapas do conjunto de procedimentos sequenciados.

Sempre que a primeira amostra for positiva ao teste de IFI ou ao teste WB e a segunda amostra for negativa aos testes de triagem, é preciso considerar a possibilidade de ter havido troca ou contaminação de amostras.

Deve-se ressaltar o fato de que todos os conjuntos de diagnósticos apresentam características intrínsecas que podem conduzir a resultados falsos.

Resultados falso-positivos podem ser decorrentes de problemas técnicos no procedimento do exame ou de alterações biológicas no indivíduo e que determinam reatividade, independentemente da condição investigada. Entre as causas de origem técnica, podemos citar: contaminação de ponteiras, contaminação da reação por soros vizinhos fortemente positivos, troca de amostras, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento das amostras, pipetagens de baixa acurácia, inativação da amostra a 56°C e transporte ou armazenamento inadequado das amostras ou dos *Kits*.

Como possíveis causas de resultados falso-positivos, podemos mencionar, entre outras, as semelhanças antigênicas entre microrganismos, doenças autoimunes, infecções por outros vírus, uso de drogas endovenosas, aquisição de anticorpos anti-HIV passivamente.

É importante salientar que nem todos os casos de reações falso-positivas têm a sua causa definida ou podem ser evitados. Além disso, tais causas podem variar ou não, de acordo com os métodos utilizados.

Em relação aos resultados falso-negativos, é importante mencionar a sensibilidade do teste como uma das principais causas, em função das diferentes capacidades de detecção dos *Kits*, da ocorrência do período de janela imunológica ou da variabilidade na constituição antigênica dos conjuntos de diagnóstico. Entre as causas de ordem técnica como fatores que contribuem para o aparecimento de resultados falso-negativos, podemos citar: a troca da amostra, o uso de reagentes fora do prazo de validade, a utilização de equipamentos desajustados, pipetagem incorreta e o transporte ou armazenamento inadequado das amostras ou dos *Kits*.

Finalmente, é importante enfatizar que mesmo com processamento adequado das amostras de sangue e a execução técnica correta de todas as etapas da reação sorológica no laboratório, é fundamental que o processo de aconselhamento, antes e depois do teste, seja feito de forma cuidadosa, para que o resultado do exame seja corretamente interpretado, tanto pelo profissional de saúde como pelo paciente, gerando atitudes que visem à promoção da saúde e/ou à prevenção da infecção pelo HIV nos indivíduos testados, conforme o diagnóstico obtido a partir da avaliação clínica e laboratorial do paciente.

ANEXO F - DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA BASEADA NA CLASSIFICAÇÃO DE RICHART (1973)

GRAU DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)	Características da histopatologia
NIC 1	Lesões que apresentam o terço basal do epitélio acometido por células com Distúrbio de polarização e maturação.
NIC 2	Lesões que apresentam dois terços basais do epitélio acometidos por células com pleomorfismo moderado, aumento da relação núcleo/citoplasma e cromatina granular.
NIC 3	Lesões que apresentam mais de dois terços do epitélio acometidos por celular com pleomorfismo acentuado, cromatina granulosa e nucleomegalia acentuada. Neste grupo são incluídas as lesões que acometem todo o epitélio, sem sinais de invasão.

FONTE: WRIGHT; KURMAN; FERENCY (2002).

ANEXO G - TERMINOLOGIA PARA A DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER CERVICAL, SEGUNDO A ORIENTAÇÃO DE WRIGHT *et al.* (1994), BASEADA NA CLASSIFICAÇÃO PROPOSTA POR RICHART (1973)

WHO/ISGYP* de Bethesda classificação	Terminologia do Sistema
Displasia leve (NIC 1) Cervicite com HPV	Lesão intraepitelial escamosa (SIL de baixo grau = LSIL)
Displasia moderada (NIC 2) Displasia acentuada (NIC 3)	Lesão intraepitelial escamosa (SIL de alto grau = HSIL)

* World Health Organization and Internacional Society of Gynecological Pathologists.

FONTE: Wright *et al.*, 2002, p 256

ANEXO H - FÓRMULAS UTILIZADAS DURANTE TÉCNICA PCR

GEL DE POLIACRILAMIDA 10%:

- água milli Q	3,0 mL
- Tampão TBE 10X	0,8 mL
- Sol. Poliacrilamida	2,0 mL
- Solução de Persulfato de amônio 10%	50 µL
- TEMED	25 µL

TBE 10 X:

- Tris base 0,9M	109 g
(hidroximetil amino metano PM 121.14)	
- Ácido bórico 0,9M	55,6 g
(PM 61.83)	
- EDTA (Sal nissódico).....	0,5 M
(PM 372.24)	

TBE 1X(SOLUÇÃO TAMPÃO):

- 100 mL da solução do TBE 10X dissolvida em água milli Q , q.s.p. 1 litro.

SOLUÇÃO POLIACRILAMIDA:

- Acrilamida	30,0 g
- Bis acrilamida	0,8 g
- Água deionizada q.s.p.....	100 mL

SOLUÇÃO FIXADORA:

- Álcool etílico (etanol 99,5%).....	80 mL
- Ácido acético-acético glacial.....	35 mL
- Água deionizada q.s.p.....	500 mL

SOLUÇÃO NITRATO DE PRATA:

- Nitrato de prata.....	1 g
- Água deionizada q.s.p.....	500 mL

SOLUÇÃO REVELADORA:

- Hidróxido de sódio (NaOH).....	15 g
- Formol.....	4 mL
- Água deionizada q.s.p.....	500 mL

PESO MOLECULAR – LADDER:

- Ladder.....	50 µL
- Loading	200 µL

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “O papilomavírus humano como fator de risco para recidiva de lesões intraepiteliais cervicais em pacientes infectadas e não-infectadas para o HIV, submetidas a conização por cirurgia de alta frequência.”

INTRODUÇÃO

Será realizado estudo com peças cirúrgicas de colo uterino de mulheres infectadas ou não pelo HIV e que apresentaram alterações do colo uterino nas quais foi necessário realizar cirurgia. Algumas destas lesões voltaram a aparecer algum tempo após o acompanhamento dessas mulheres e foi necessário realizar nova cirurgia. O nosso objetivo é verificar se o papilomavírus (HPV) (vírus que provoca verrugas genitais) foi responsável pela recidiva (retorno) dessas lesões. Você está sendo convidada a participar deste estudo. Antes de decidir pela sua participação, queremos informá-la sobre por meio deste Termo de Consentimento. Se você aceitar participar desse estudo, solicitamos que assine este documento.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença que destrói o sistema de defesa do organismo, deixando uma pessoa incapaz de lutar contra doenças que ameaçam a vida.

Pretendemos com este estudo verificar se o papilomavírus humano (HPV), que ocorre com mais frequência nas mulheres infectadas pelo HIV, atua como fator de risco na recidiva de lesão intraepitelial cervical (retorno da lesão pré-cancerosa e cancerosa do colo do útero). E também queremos saber qual o tipo de HPV mais frequente nas mulheres que apresentaram recidivas de lesões no colo do útero, no grupo de mulheres infectadas ou não pelo HIV.

Essas informações serão usadas para melhorar o acompanhamento e tratamento das pacientes com lesões do colo uterino, prevenindo o câncer, porque a maioria das mulheres portadoras do HIV (mais de 80%) é também portadora do HPV (vírus que pode causar o câncer do colo uterino).

O QUE EU PRECISO FAZER?

Se você decidir participar deste estudo, você deverá assinar este documento nos autorizando a analisar o material das biopsias e da cirurgia realizada no colo uterino. Lembre-se de que a cirurgia já foi realizada anteriormente e que você não será submetida a nenhum exame ou consulta ginecológica ou qualquer outro procedimento cirúrgico. Todo este material está guardado em blocos de parafina (para conservá-lo melhor) no laboratório de anatomia patológica, o que é um procedimento de rotina.

QUANTAS MULHERES PARTICIPARÃO DESTE ESTUDO?

Estima-se a participação de aproximadamente 140 mulheres.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?

Não há riscos. Você não será submetida a nenhum procedimento médico ou a qualquer consulta ginecológica. Serão utilizadas peças cirúrgicas obtidas de procedimentos já realizados anteriormente em você e que se encontram

armazenadas (guardadas) no laboratório. Poderá ser necessário fazer uma nova entrevista, quando você responderá algumas perguntas para a pesquisa.

HÁ BENEFÍCIOS AO PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Sim, as informações obtidas ajudarão os médicos a conhecerem mais sobre as lesões pré-cancerosas no colo uterino, em mulheres portadoras ou não do HIV. Pretende-se saber se há associação do vírus HPV e o risco de recidivas de lesões intraepiteliais do colo (retorno das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo do útero) nas pacientes infectadas e não-infectadas pelo HIV.

CONFIDENCIALIDADE

Serão feitos esforços no sentido de manter os prontuários médicos confidenciais, embora não se possa garantir absoluta confidencialidade. O seu prontuário médico poderá ser aberto, se exigido por lei. Os resultados dos seus exames serão mantidos em sigilo. Entretanto, esses prontuários poderão ser vistos por indivíduos que trabalham neste estudo e os resultados poderão ser publicados em revistas científicas. Você não será pessoalmente identificada em nenhuma publicação resultante da informação obtida neste estudo.

HÁ ALGUM CUSTO PARA MIM?

Não.

EU RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Não, assim como não existe nenhuma remuneração para os pesquisadores.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS POR PARTICIPAR DA PESQUISA?

Sua participação na pesquisa é completamente voluntária. Você tem o direito de se recusar a participar a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este termo de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em tomar parte neste estudo. Estou ciente de que eu posso sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos.

.....
Nome da paciente

Data ____/____/____

.....
Assinatura da Paciente

Pesquisadora
Claudia Teixeira da Costa Lodi
Telefone: (31) 32870941

Orientador da Pesquisa
Prof. Victor Hugo de Melo
Telefones: (31) 3248-9547 / 3277-4341

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG)
Av. Presidente Antônio Carlos, nº 6627– Belo Horizonte – MG
Unidade Administrativa II - 2º andar – sala 2005
Prédio da Reitoria / Campus Pampulha
Telefone: (31) 3499-4592

APÊNDICE B - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

1) Variável colposcopia foi retirada do modelo de regressão em relação à recidiva, por apresentar interação com citologia ($p=0,03$)

		Colposcopia		Total
		GRAU I	GRAU II	
CITORECOBIN	NORMAL	21	18	39
	ALTERADA	32	62	94
Total		53	80	133

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,510(b)	1	,034		
Continuity Correction(a)	3,722	1	,054		
Likelihood Ratio	4,456	1	,035		
Fisher's Exact Test				,051	,027
Linear-by-Linear Association	4,476	1	,034		
N of Valid Cases	133				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 15,54.

2) Avaliando interação entre as variáveis significativas, finais do modelo de regressão ($p=0,24$)

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1(a) hiv(1)	1,770	,592	8,951	1	,003	5,869	1,841	18,709
ocupgland(1)	3,367	1,009	11,146	1	,001	29,000	4,017	209,366
hiv(1) by ocupgland(1)	-1,482	1,248	1,410	1	,235	,227	,020	2,624
Constant	-2,674	,517	26,759	1	,000	,069		

a Variable(s) entered on step 1: hiv, ocupgland, hiv * ocupgland .

- 4- Carcinoma de células escamosas
- 5- Adenocarcinoma

Colposcopia

- 1- achados colposcópicos normais
- 2- achados colposcópicos anormais grau I
grau II
- 3- suspeita de carcinoma invasivo
- 4- colposcopia insatisfatória
- 5- Miscelânea

Biopsia

Data / /

- 1- cervicite com HPV
- 2- NIC 1
- 3- NIC 2
- 4- NIC 3

Anatomopatológico da CAF

- 1- cervicite com HPV
- 2- NIC 1
- 3- NIC 2
- 4- NIC 3
- 5- Câncer microinvasor
- 6- Câncer invasor

Sinais de HPV na histopatologia

- 1- sim
- 2- não

Avaliação de margem cirúrgica do cone

- 1- livre
- 2- comprometida
- 3- não avaliada

Avaliação de ocupação glandular no cone

- 1- presente
- 2- ausente

Resultado da PCR

- 1- HPV presente
- 2- HPV ausente

Tipo de HPV

- 1- alto risco
- 2- baixo risco
- 3- alto e baixo risco

Recidiva de NIC

- 1- sim
- 2- não

APÊNDICE D- VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO**CLINICAL ARTICLE****Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization
in HIV infected and no infected women**

Claudia Teixeira da Costa Lodi^a
Márcia Antoniazi Michelin^b
Maria Inês Miranda Lima^c
Nara Chartuni P Teixeira^d
Sheila Jorge Adad^b,
Eddie Fernando Candido Murta^b
Victor Hugo Melo^d

^a Medical Science School of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Research Institute of Oncology, Faculty of Medicine, Federal University of Triangulo Mineiro, Uberaba, Brazil

^c Serviço de Referência de Patologia do Colo Uterino do PAM Sagrada Família, Department of Health Services, Belo Horizonte, Brazil.

^d Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author:

Victor Hugo Melo

School of Medicine, Federal University of Minas Gerais,

Av Alfredo Balena 190- 4th floor,

Belo Horizonte, MG, Brazil.

Post code: 30130-100

E-mail address: victormelo@terra.com.br

Words count: 2186 words

Keywords: Cervical intraepithelial neoplasia, Human immunodeficiency virus, Loop electrosurgical excision procedure, recurrence, Human papillomavirus.

Synopsis: Rate of cervical intraepithelial neoplasia recurrence was high in HIV-infected women with glandular involvement in cone.

ABSTRACT

Objective. To evaluate risk factors for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) recurrence, in HIV-infected and no infected women who underwent the loop electrosurgical excision procedure (LEEP).

Methods. Case/control of 33 patients with CIN recurrence (cases) and 105 without recurrence (controls), among HIV infected and no infected women treated with LEEP, from January 1999 to May 2004. Recurrence diagnosis was established after biopsy. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect human papillomavirus genome (HPV DNA), types 6,11,16,18,31,33,35, in formalin-fixed, paraffin-embedded cone specimens. Statistical analysis was performed using X^2 test with Yates correction and Fisher's exact test for comparison of categorical variables. Multivariate analysis was carried out using a logistic regression model.

Results. Recurrence was more frequent in women with HIV-infection ($p=0.001$), with glandular involvement ($p=0.000$) and with compromised margins ($p=0.02$). HPV DNA was positive in 57.6% patients with CIN recurrence. High-risk HPVs were detected in most cases but were not associated with recurrence ($p=0.27$). A multivariate analysis showed that HIV-infection and glandular involvement were independently associated with lesions recurrence.

Conclusions. Recurrence rate of CIN in HIV-infected women was higher than in HIV-negative women. Factors associated with recurrence were HIV infection and glandular involvement.

Words count: 192 words.

Introduction

Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide, and it is the principal cause of death in women of several developing countries [1]. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is a precursor of invasive squamous cell carcinoma, and high-grade CIN carries significant risk of developing invasive cancer if it remains untreated [2]. CIN lesions are in general adequately eradicated using conization by loop electrosurgical excision procedure (LEEP), while anatomy and function of cervix are maintained [3]. Follow-up after treatment is essential as women treated for pre-invasive cancer are at risk for recurrence of disease [4]. Recurrent rates of disease after cervical conization range between 5% and 30% [3,5,6]. The reasons why some women develop CIN recurrence and others do not develop are unclear [7].

Risk factors of recurrence have been reported as margin involvement [6,7,8,9,10], histological severity of CIN lesion [11], glandular involvement [6,8,12] persistent HPV infection [5,10,13], age of patient [5,10,13] and immunosuppression [6,14]. Today it is very well established that infection with specific types of HPV can cause cervical cancer [15,16]. The most common types are 6, 11 (low-risk) and 16,18,31,33,35,45 (high-risk) [16]. HPV infection has been demonstrated to be a necessary step in the development of cervical cancer, but other factors must also be present [17]. The risk of recurrent disease is associated with the persistence of oncogenic HPV types and their high viral load in the genital mucosa. [2,18]. Women with human immunodeficiency virus (HIV) are at elevated risk of cervical cancer and have extremely high rates of HPV infection [8]. Recurrence rates of CIN after standard treatment in HIV infected women are high, and these rates are related to immune status in this high-risk group [6,8,9,19,20].

The aim of the present study was to investigate the risk factors for CIN recurrence among HIV infected and noninfected women who underwent LEEP, to assess HPV prevalence among women with and without CIN recurrence and to evaluate if high-risk HPVs were risk factors for CIN recurrence.

Patients and methods

One hundred and thirty eight women submitted to LEEP were enrolled to participate in this case control study that included HIV infected and no infected

women. Cases were considered patients who presented CIN recurrence and controls were patients that did not showed recurrence. These women were enrolled from January 1999 to May 2004, in Belo Horizonte, Brazil. A total of 70 HIV-infected women were recruited from Centro de Treinamento e Referência para Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz, and 68 HIV no infected women came from Serviço de Referência de Patologia do Colo Uterino do PAM Sagrada Família-Prefeitura Municipal de Belo Horizonte.

After cervical resection, the tissue was fixed with 10% buffered formalin and was embedded in paraffin, in blocks, stored for five to ten years in the pathology archives. Residual or recurrent lesions were considered to be recurrent lesions in this study and in both instances were diagnosed by histopathologic examination. Colposcopic evaluation followed the international Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) classification [21]. Bethesda System (2001) was used for the cytological classification [22]. Histopathologic evaluation was classified according to lesion grade (CIN1,2 and 3), and it was blinded regarding that the pathologist did not receive any information about the HIV seropositivity of each patient. Lesion margin and glandular involvement were classified as compromised or free (positive or negative). HPV infection was identified during the histopathologic exam by the identification of koilocytosis and other viral cytopathic effects at the time of LEEP procedure. Age, smoking, parity, number of sexual partners and age of first sexual contact were other variables of interest.

All patients provided informed consent to use the cone specimens for detection of HPV DNA. Inclusion criteria were CIN confirmed with new histopathologic evaluation in the conization specimen.

The most prevalent HPV types among women from Belo Horizonte (6,11,16,18,31,33 and 35) were tested. Blocks were included with histologic diagnosis of CIN of any grade, confirmed by a new histopathologic evaluation, blinded again, because the new examiner did not receive neither information about the HIV seropositivity of each patient or the recurrence event. Only one representative tissue block was selected from each patient and the highest grade lesions it was always considered. All samples were sent to the Research Institute of Oncology (IPON), UFTM, Uberaba, Brazil, where the DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) was realized. All HPV assays were done blindly on coded specimens with no identification liking specimens from the same woman.

DNA was extracted from formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue blocks. A series of 10 µm sections were cut from the paraffin block from each patient; the outer sections were used for histological analysis while the inner sections were used for PCR. After deparaffinization in xylene and rehydration in ethanol, DNA was extracted from the tissues using Trizol® reagent (Invitrogen®) following the manufacturer's protocol. A final volume was stored to the PCR reaction. Cervical specimens were tested for the presence of HPV DNA by a previously described PCR protocol (Invitrogen®). Consensus HPV primers for high-risk types 16,18,31,33,35 and low-risk types 6,11 were used for amplification. The amplification reaction was performed with initial denaturation at 94°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 40.2°C for high-risk types and 59°C for low-risk types, and extension at 72°C for 1 min, and with a final extension at 72°C for 10 min. The amplified products were analyzed by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.

The sequence of HPV primers were as follows: low-risk F(5'-TACTGCTGGACAACATGC-3'); low-risk R (5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'); high-risk F (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') and high-risk R (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3').

The study was approved by both Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais and Municipal Department of Health Services of Belo Horizonte.

Statistical analysis was performed using SPSS version 12.0, with a 5% significance level of confidence. A univariate analysis was conducted using the X² test with Yates correction and Fisher's exact test for comparison of categorical variables. According to the retrospective design of the study, odds ratio (OR) with 95% CI has been calculated by logistic regression analysis. Multivariate analysis was carried out using a logistic regression, keeping only significant variables ($p < 0.05$), in the final model.

3- Results

A total of 138 patients (33 with CIN recurrence and 105 without CIN recurrence) were enrolled in the study. The characteristics of the two groups are showed in Table 1. There were no significant differences between groups

regarding age ($p=0.41$), smoking ($p=0.34$), number of sexual partners ($p=0.66$), parity ($p=0.40$) and age of first sexual contact ($p=0.53$). Recurrence of surgical lesions was found in 75.6% of HIV infected women and in 24.2% of no infected women ($p=0.001$). HIV infected women presented 4.17 (95% CI: 1.72-10.10) more chance of CIN recurrence compared with HIV no infected women. Cytology, colposcopy and lesion grade in biopsy results were not significant for CIN recurrence (Table 2).

Histopathologic results, after LEEP, were more likely to be categorized as CIN 2/3 than originally diagnosed on biopsy. Cervical biopsy results showed that 48.5% women with CIN recurrence were identified with CIN 2/3 (Table 2). However, after LEEP 69.7% women with CIN recurrence were diagnosed with CIN 2/3 (Table 3). Lesion grade, diagnosed in cone, presented no significant for CIN recurrence ($p=0.99$). Surgical margins and glandular involvement presented significant difference for CIN recurrence, respectively $p=0.02$ and $p=0.000$. Recurrent CIN occurred in 39.4% women with compromised margins and in 36.4% with glandular involvement (Table 3).

HPV infection was recorded, using commonly accepted morphological criteria, and histopathologic results, after LEEP, showed that 100% of CIN recurrence had signs of HPV infection. PCR results were not associated with these histological findings. HPV DNA was positive in 57.6% women with CIN recurrence and in 49.5% women with no CIN recurrence ($p=0.27$). Almost 90% of women had infection with high-risk HPV although it was not significant for CIN recurrence ($p=0.23$) (Table 4).

Categorical variables that presented $p<0.25$ entered in the logistic regression model: smoking history, HIV infection, glandular involvement, surgical margins, HPV infection and cytology results. It was found Interaction between colposcopy and cytology results and they were excluded ($p=0.03$). In the final regression model only two variables confirmed independent association with recurrence: HIV infection (OR-4.29; 95% CI: 1.62-11.34) and glandular involvement (OR-11.78; 95%CI: 3.48-39.9).

4- Discussion

LEEP and conization are the standard treatments for CIN and the recurrence risk of lesion could occur with both methods. The detection of risk

factors involved is relevant and could assist in the choice between a more intensive follow-up or an interventionist approach [6]. Several factors may be associated with higher rates of surgical treatment failure, including high-grade CIN, large lesion size, satellite HPV-related lesions, involved margin, persistent HPV infection, and immunosuppression [23, 24].

In our study, HIV infected women had significantly higher rates of CIN recurrence (75.6%) than HIV no infected women (24.2%), after conization ($p=0.001$). Gilles et al. [19], reported comparable results, with recurrence rates of 78% in HIV infected women and 36% in no infected women ($p<0.001$). Heard et al. [9] detected 53.9% of CIN recurrence of any grade rates among HIV infected women, with a follow-up of 3 years. Alonso et al. [7] identified recurrent disease of any grade in 17.7% HIV no infected patients and Bae et al. [3] reported 19.3% recurrence rate in 114 no infected women. Nappi et al. [20] showed that a tendency of CIN1 recurrence in treated patients - or a progression in untreated patients - seems to be higher in immunosuppressed HIV infected women than in immunocompetent women and it was associated to the degree of immunosuppression (OR-4.88; 95% CI:1.28-18.58 for recurrence). They concluded that CIN management, including low-grade lesions, in the HIV infected women should be more aggressive.

Age, smoking history, parity, number of sexual partners and age of first sexual contact were not different between groups with or without CIN recurrence. These data are comparable to those reported by Alonso et al. [7]. Costa et al. [24] reported that age, lesion grade in the biopsy, lesion grade in the cone, cone volume, length of active sexual life, and endocervical margin involvement were most significant predictors of HPV clearance/persistence after treatment.

The presence of compromised margins ($p=0.02$) and glandular involvement ($p=0,000$) showed significant difference between groups in agreement with others authors [3,9,10]. Gilles et al. [19] reported involved margins in 43% of HIV infected women and in 20% of no infected women, who underwent conization ($p < 0.01$). The status of resection margins has been shown to be a predictor of residual disease, but women with positive cone margins did not recur frequently [5,7]. A free margin does not always mean complete excision because of the possibilities of multifocal lesions or inadequate specimen tissue due to the ablative conization procedure itself [5,23].

Dysplastic cells located deeper in glandular epithelium are protected from LEEP destruction and may recur, progress, or invade the surrounding stroma [24]. Authors showed that the most important factor related to recurrence was glandular involvement [6,23]. Paraskevaïdis et al. [23], conducted a case-control study to identify risk factors for recurrent CIN after LEEP and glandular involvement was found in 71% of patients who had recurrent lesions compared with 13% in the nonrecurrent patients (OR-4.9; 95% CI: 1.90-12.30). In the present study, glandular involvement was found in 36.4% of CIN recurrence and in 4.8% of CIN nonrecurrence (OR-11.43; 95% CI: 3.64–35.89).

In our study HPV infection was not significantly associated with CIN recurrence ($p=0.27$). However, high-risk HPV was detected in a relevant proportion of cases. Several studies concluded that women with persistent high-risk HPV infection after conization need intense follow up since they are at increased risk for CIN recurrence [5,10,12,13,24]. Nappi et al [20] and Alonso et al. [7] observed an increasing risk of lesion progression among women with high-risk HPV DNA positive. In the present study it was detected 89.5% of high-risk HPV in recurrent cases. Bae et al. [3] and Costa et al. [24] observed that persistent HPV infection after LEEP conization was present in about 35% of patients, and it was a more significant risk factor of treatment failure than age, margin involvement, and histologic severity of initial CIN lesion.

In the multivariate analysis HIV infected women was one of the independent risk factors associated with recurrence (OR-4.29; 95% CI: 1.62-11.34) and glandular involvement was another (OR-11.78; 95%CI: 3.48-39.9) in agreement with several authors [6,9,19,20,23]. The no association of HPV infection with CIN recurrence in our study could be explained by two factors: the small numbers of HPV types researched or CIN recurrence could be explained only by HIV infection. We corroborated with Lima's results [6] where HIV infection was an important risk factor for CIN recurrence. It is also important to continue investigations to define the role of cervical local immune response in women HIV-HPV co-infected.

We conclude that CIN recurrence rate in HIV infected women was significantly higher than in HIV no infected women. By other side, glandular involvement in cone after LEEP was another independent risk of recurrence. HPV types 16,18,31,33 and 35 were not risk factors for CIN recurrence.

References

- [1] Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Ann Oncol** 2007; 18 : 581-592.
- [2] Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92 : 690-698
- [3] Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. **Int J Gynecol Cancer** 2007; 17 : 1271-1277.
- [4] Aerssens a, Claeys P, Garcia A, Sturtewagen Y, Velasquez R, Vanden Broeck D et al. Natural history and clearance of HPV after treatment of precancerous cervical lesions. **Histopathology**, 2008; 52 : 381-386.
- [5] Sarian LO, Derchain SF, Pittal Dda R, Morais SS, Rabelo-Santos SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ) **J Clin Virol**, 2004; 31: 270-274.
- [6] Lima MIM, Tafuri A, Araújo AC, Lima LM, Melo VH. Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. **Int J Gynecol Obstet**, 2009; 104: 100-104.
- [7] Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E et al. Pre and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. **Gynecol Oncol**, 2006 ; 103: 631-636.
- [8] Fogle RH, Spann CO, Easley KA, Basil JB. Predictors of cervical dysplasia after the loop electrosurgical excision procedure in an inner-city population. **J Reprod Med**. 2004; 49 (6):481-486.

[9] Heard I, Potard V, Foulot H, Chapron C, Costagliola D, Kazatchkine MD. High Rate of Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia After Surgery in HIV-positive Women. **J Acquir Immune Defic Syndr** 2005; 39 : 412-418.

[10] Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, Marchetti I, Di Cristofano C, Di Coscio G et al. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. **Int J Gynecol Cancer**, 2008 ; 18: 90-94.

[11] Zaitoun AM, Mckee G, Coppin MJ, Thomas SM, Wilson POG. Completeness of excision and follow-up cytology in patients treated with loop excision biopsy. **J Clin Pathol**, 2000;53 :191-196.

[12] Johnson N, Khalili M, Hirschowitz L, Ralli F, Porter R. Predicting residual disease after excision of cervical dysplasia. **Br J Obstet Gynaecol** 2003; 110: 952-955.

[13] Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen M, Poppe W. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. **Int J Obstet Gynaecol**, 2006; 113 : 1303-1307.

[14] Skinner EN, Gehrig PA, Van Le L. High-grade squamous intra-epithelial lesions: abbreviating posttreatment surveillance. **Obstet Gynecol**. 2004;103 : 488-492.

[15] Pinto AP, Crum CP. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. **Clin Obstet Gynecol** 2000; 43 :352-362.

[16] Munoz N, Bosch X, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al. Epidemiologic Classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, 2003; 348 : 518-527.

[17] Ferenczy A, Coutlée F, Franco E, Hankins C. Human papillomavirus and HIV coinfection and risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. **CMAJ**, 2003; 169 (5): 431-434.

[18] Chao A, Lin CT, Hsueh S, Chou HH, Chang TC, Chen MY, et al. Usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after conization. **Am J Obstet Gynecol** 2004; 190:1046-1051.

[19] Gilles C, Manigart Y, Konopnicki D, Barlow P, Rozenberg S. Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. **Gynecol Oncol** 2005 : 96 : 112-118.

[20] Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence and progression , in treated and untreated women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2005; 121: 226-232.

[21] P. Walker, S. Dexeus, G. De Palo, R. Barrasso, M. Campion, F. Girardi et al. International terminology of colposcopy: an updated report from the international Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. Available at: <http://www.ifcpc.org/ifcpc/terminology.htm>. Accessed: 09/12/07.

[22] Smith JH. Bethesda 2001. **Cytopathology** 2002; 13(1): 4-10.

[23] Paraskevidis E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N et al. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. **Eur J Gynaecol Oncol**. 2003; 24 (6): 541-543.

[24] Costa S, De Simone P, Venturoli S, Cricca M, Zerbini ML, Musiani M et al. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. **Gynecol Oncol**, 2003; 90 :358-365.

Table 1 - Characteristics of women with and without CIN recurrence included in the study^a.

Characteristics	Recurrent CIN (n=33) (%)	No recurrent CIN (n=105) (%)	P value ^b	OR	95% CI
Years of age					
< 33	20 (60.6)	55 (52.4)	0.41	0.72	0.32–1.59
≥ 33	13 (39.4)	50 (47.6)			
Smoking					
No	19 (57.6)	70 (66.7)	0.34	1.47	0.66–3.28
Yes	14 (42.4)	35 (33.3)			
Number of sexual partners					
< 3	10 (30.3)	36 (34.3)	0.66	0.80	0.30–2.13
≥ 3	10 (30.3)	45 (42.8)			
Missing ^c	13 (39.4)	24 (22.9)			
Parity					
< 3	21 (63.6)	58 (55.2)	0.40	0.71	0.32–1.58
≥ 3	12 (36.4)	47 (44.8)			
Age of first sexual contact					
≤ 18	22 (66.7)	76 (72.4)	0.53	1.31	0.57–3.04
> 19	11 (33.3)	29 (27.6)			
HIV Infection					
No	8 (24.2)	60 (57.1)	0.001	4.17	1.72-10.10
Yes	25 (75.6)	45 (42.9)			

^a Values are given as number (percentage) unless otherwise indicated.

^b X² Test with Yates correction.

^c 37 cases missing without information.

CIN-Cervical intraepithelial neoplasia; OR- Odds Ratio; CI – confidence interval; HIV- Human immunodeficiency virus.

Table 2 – CIN Recurrence rates according to cytology, colposcopy and cervical biopsy results^a.

Variables	Recurrent CIN (n=33) (%)	No recurrent CIN (n=105) (%)	P value^b	OR	95% CI
Citology					
HSIL/LSIL	20 (60.6)	74 (70.5)	0.14	0.54	0.24–1.24
Normal	13 (39.4)	26 (24.8)			
ASC-US ^c		5 (4.7)			
Colposcopy					
Grade II	23 (69.7)	61 (58.1)	0.23	1.66	0.72–3.83
Grade I	10 (30.3)	44 (41.9)			
Cervical biopsy					
CIN 2 e 3	16 (48.5)	61 (58.1)	0.33	0.68	0.31–1.49
CIN 1	17 (51.5)	44 (41.9)			

^a Values are given as number (percentage) unless otherwise indicated.

^b X² Test with Yates correction.

^c 5 ASC-US excluded

HSIL – High grade squamous intraepithelial lesion; LSIL- Low grade squamous intraepithelial lesion; ASC-US – atypical squamous cells of undetermined significance; CIN- Cervical intraepithelial neoplasia; OR- Odds Ratio; CI – confidence interval.

Table 3 – CIN recurrence rates according to histopathologic results of cone specimen^a

Variables	Recurrent CIN (n=33) (%)	No recurrent CIN (n=105) (%)	P value^b	OR	95% CI
Lesion grade					
CIN 2/3	23 (69.7)	73 (69.5)	0.99	1.01	0.43–2.36
CIN 1	10 (30.3)	32 (30.5)			
Surgical Margin					
Compromised	13 (39.4)	19 (18.1)	0.02 ^b	2.89	1.21–6.91
Free	18 (54.5)	76 (72.4)			
Not available ^d	2 (6.1)	10 (9.5)			
Glandular involvement					
Positive	12 (36.4)	5 (4.8)	0.000 ^c	11.43	3.64–35.89
Negative	21 (63.6)	100 (95.2)			

^a Values are given as number (percentage) unless otherwise indicated.

^b X² Test with Yates correction.

^c Fisher's exact test

^d 12 margins with thermal artifact, not available

LEEP- loop electrosurgical excision procedure; CIN- cervical intraepithelial neoplasia; OR – odds ratio; CI- confidence interval.

Table 4 – CIN Recurrence rates according to Polymerase Chain Reaction results^a

Variables	Recurrent CIN (n=33) (%)	No recurrent CIN (n=105) (%)	P value ^b	OR	95% CI
Histopatology					
HPV signs					
Positive	33 (100.0)	101 (96.2)	0.57 ^b		
Negative	0	4 (3.8)			
PCR results					
HPV positive	19 (57.6)	52 (49.5)	0.27 ^b	1.58	0.70–3.60
HPV negative	12 (36.4)	52 (49.5)			
Missing ^d	2 (6.0)	1 (1.0)			
HPV infection^e					
High / low risk	17 (89.5)	37 (71.2)	0.13 ^c	3.45	0.71–16.78
Low risk	2 (10.5)	15 (28.8)			
HPV type^e					
High and low risks	5 (26.3)	14 (26.9)	0.23 ^c		
High risk	12 (63.2)	23 (44.2)			
Low risk	2 (10.5)	15 (28.8)			

^a Values are given as number (percentage) unless otherwise indicated.

^b X² Test with Yates correction.

^c Fisher's exact test

^d 3 cases without information

^e 67 cases HPV negatives (types 6,11,16,18,31,33,35)

HPV – Human papillomavirus; PCR – Polymerase chain reaction; CIN- cervical intraepithelial neoplasia; OR – odds ratio; CI- confidence interval.