

LESÕES DO COLO UTERINO E INFECCÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

Detecção e Tipificação do ADN/HPV por PCR (Reacção de Amplificação Enzimática)

H. SERRA, A. PISTA, P. FIGUEIREDO, A. URBANO, F. AVILEZ, C. FREIRE DE OLIVEIRA
Serviço de Ginecologia e Serviço de Histopatologia. Centro de Oncologia de Coimbra. Coimbra.
Laboratório de Virologia. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa.

RESUMO

Num estudo retrospectivo realizado em material histopatológico de arquivo, pretendeu-se avaliar a prevalência da infecção HPV em lesões intra-epiteliais e cancro do colo uterino. O grupo de mulheres estudadas (n=84) com idades compreendidas entre os 21-67 anos (média, 40 anos) foi selecionado a partir de uma população que, submetida ao Rastreio Citológico do Cancro do colo uterino realizado na Zona Centro entre 1990/94, havia sido sujeita posteriormente a biópsia dirigida por colposcopia, na Consulta de Ginecologia do Centro de Oncologia de Coimbra. A detecção e tipificação do ADN/HPV nas amostras estudadas foi realizada pela técnica de amplificação enzimática (PCR), no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa. A prevalência da infecção pelo HPV encontrada, para o global das lesões cervicais consideradas em baixo grau (LSIL), alto grau (HSIL) e cancro, foi de 97.8%. Verificou-se um predomínio dos tipos de HPV de baixo risco (HPV6/11) nas lesões LSIL (83.3%), e dos genótipos de alto risco (HPV16,18,31,33 e 51) nas lesões HSIL (58.4%) e nos casos de cancro do colo (100%), demonstrando-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa na infecção HPV por tipos de baixo e alto risco, entre as mulheres que apresentavam lesões cervicais de baixo e alto grau. Considerando os factores de risco para cancro do colo (idade de início de actividade sexual, número de parceiros sexuais, índice de paridade, uso de contraceptivos orais) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas, entre lesões de baixo e alto grau. Foi ainda realizada a análise do acompanhamento clínico e terapêutico a que foram submetidas posteriormente estas doentes (biópsia, conização frio/laser, curetagem, diatermocoagulação, vaporização laser, histerectomia total, wertheim meigs), durante um intervalo de tempo de cinco anos (1990-1994). Concluiu-se que, de uma forma geral, existiu uma coincidência dos critérios clínicos adoptados com a detecção e tipificação do HPV realizada à posteriori, em especial para as lesões de alto grau (HSIL) e cancro do colo, onde as terapêuticas utilizadas haviam sido frequentemente mais radicais e onde a infecção HPV persistiu frequentemente, estando associada a tipos de alto risco (HPV 16 em 50% dos casos). Por outro lado, nas lesões de baixo grau (LSIL), as quais foram clinicamente orientadas de modo mais conservador, constatou-se que a detecção da infecção HPV permite identificar mulheres que, por terem associados tipos de HPV de alto risco estarão em maior risco de desenvolver uma neoplasia do colo uterino.

SUMMARY

Detection of Human Papillomavirus Infection in Epithelial Cervical Lesions by Polymerase Chain Reaction (PCR)

The prevalence of human papillomavirus (HPV) genotypes was estimated by the polymerase chain reaction (PCR), in archival paraffin wax embedded tissues. The case group consisted of 84

women aged 21-67 years (mean, 40 years) who were referred to the Department of Gynaecology (Oncology Centre, Coimbra) with citopatologically abnormal smears. This group was selected from a population of women who had undergone a screening programme (1990/94) in Central Region of Portugal. All these patients (n=84) had a colposcopic directed cervical biopsy. HPV detection and typing was performed by the PCR method in the Department of Virology (National Health Care Institute, Lisbon). The prevalence of DNA/HPV found, concerning all epithelial cervical lesions studied and classified as squamous intra-epithelial lesions (SIL) and cervical cancer was 97.8%. On the basis of the data presented in this study, it was estimated that there was a statistically significant prevalence of low risk HPV types (HPV6/11) in low grade SIL, 83.3%, and a statistically significant prevalence of high risk HPV types (HPV16,18,31,33,51) in high grade SIL, 58.4%, as well as cervical cancer lesions in 100%. We conclude that there was a statistically significant difference between women with low and high grade SIL for HPV infection, with low and high risk HPV types, respectively. The risk factors for cervical cancer investigated (age at first sexual intercourse, multiple sexual partners, parity, use of oral contraceptives) were not associated to statistically significant differences concerning low grade SIL and high grade SIL. The clinical and therapeutic procedures were evaluated for the same five years (1990/94). It may be concluded that there would be no significant difference in clinical procedure for high grade lesions and cervical cancer, in which the treatment had been frequently radical (cone biopsies, simple or radical hysterectomy) and in which the HPV infection persisted frequently and was associated to high risk types (HPV 16 in 50% of these cases). On the other hand, it may be concluded that HPV detection in cervical biopsies, especially for low grade SIL lesions, which were evaluated in this study with a more conservative procedure (clinical evaluation only, punch biopsies, loop diathermy, CO₂ laser vaporisation, cone biopsies), could identify women with high risk HPV types who might be at risk of developing dysplasia and cervical cancer.

INTRODUÇÃO

No último decénio, o interesse pela patologia viral associada à carcinogénese cervical redobrou com o acumular de argumentos que evidenciam o papel potencialmente oncogénico de determinados tipos de Vírus do Papiloma Humano (HPV).

Através de estudos realizados com técnicas de Biologia Molecular, em meados dos anos 70¹, zur Hausen e Gissman² fizeram uma importante descoberta isolando e caracterizando pela primeira vez, o ADN/HPV 6, a partir de condilomas genitais e papilomas laríngicos.

Os avanços na metodologia recombinante do ADN permitiram identificar até ao momento, cerca de 70 tipos diferentes de HPV, dos quais 25 infectam as mucosas genitais, estando associados a lesões benignas e malignas do colo uterino, vagina e vulva. De acordo com o potencial oncogénico que apresentam, os diferentes tipos de HPV têm sido agrupados em *baixo risco* (HPV 6, 11), *risco intermédio* (HPV 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58) e *alto risco* (HPV 16, 18, 45).

Utilizando diversos métodos de hibridação molecular para detecção do ADN/HPV, múltiplos estudos epidemiológicos têm vindo a correlacionar a presença da

infecção HPV e a sua relação com o *comportamento* das lesões cervicais³⁻⁹. Embora exista actualmente uma forte correlação entre tipos de HPV de alto risco com lesões de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo, nem todas as mulheres portadoras destes genótipos desenvolvem no entanto, cancro do colo. Tem igualmente sido demonstrado que os tipos de *alto risco* podem aparecer em percentagens muito variáveis, tanto em lesões de baixo grau (LSIL) como em citologias morfológicas consideradas normais¹⁰. Estes dados de observação estão de acordo com a possível taxa de progressão das lesões LSIL para carcinoma invasivo, bem como com o envolvimento de certos tipos de HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 45) no aumento de risco para desenvolver cancro do colo.

Apesar de, durante a última década, terem sido desenvolvidos numerosos estudos sobre a patogénese da infecção associada ao HPV, pouco se conhece ainda sobre a história natural desta infecção. Não se sabe se a exposição ao HPV dá origem a uma primeira infecção sub-clínica, se passa de imediato para uma fase de latência ou se induz directamente o aparecimento de manifestações clínicas da infecção^{8,11}.

Embora a infecção HPV possa explicar muito do que durante décadas foi investigado na área da epidemiologia

acerca dos factores de risco nas neoplasias cervicais, particularmente a possibilidade da sua transmissão sexual, mantem-se ainda alguma controvérsia relativamente aos potenciais co-factores associados a esta infecção¹²⁻¹⁷. Correlações entre factores de risco para cancro do colo (promiscuidade sexual, início de actividade sexual, tabagismo, uso prolongado de contraceptivos orais, meio sócio-económico) e infecção HPV têm vindo a ser observadas, embora nem sempre com significado estatístico²⁻¹⁷.

Tem sido demonstrado que o risco de desenvolver cancro do colo é superior nas mulheres que referem uma idade mais precoce de início de actividade sexual e um maior número de parceiros sexuais¹³⁻¹⁶. Contudo, considerando os mesmos co-factores relativamente à infecção HPV, estudos comparando mulheres HPV positivas e negativas não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos considerados¹²⁻¹⁵.

Vários estudos têm demonstrado que a prevalência da infecção HPV tem vindo a aumentar nos últimos anos, sendo observado um aumento da incidência nas faixas etárias mais jovens. A existência de uma elevada percentagem de mulheres jovens, com testes HPV positivos em esfregaços citológicos, com persistência da infecção pelo HPV, demonstra, tal como refere Melkert et al⁴, a importância de no rastreio do cancro do colo uterino correlacionar a tipificação do HPV com o resultado citológico.

A amplificação enzimática do ADN viral (PCR) é considerada actualmente como o método de detecção e tipificação do HPV mais sensível, específico e de rápida execução.

Detectando infecções latentes, sub-clínicas e clínicas, associadas ao HPV, apresenta a vantagem de requerer pequenas quantidades de material (ex.: esfregaços citológicos), poder ser aplicado tanto em material fresco (células em suspensão), como em blocos de tecido embebidos em parafina, não necessitar de ADN purificado, de poder ser aplicado a ADN parcialmente degradado e de o processo estar actualmente automatizado¹⁸⁻²³.

Com este estudo pretendeu-se avaliar a prevalência da infecção HPV em material histopatológico de arquivo (lesões intra-epiteliais e carcinoma do colo uterino). Pretendeu-se ainda avaliar a associação dos tipos de HPV (baixo e alto risco) com o aparecimento das lesões cervicais (baixo e alto grau), comparando-a com outros factores de risco tradicionalmente aceites para cancro do colo; correlacionar os resultados dos exames citológicos, histopatológicos e da tipificação viral; estudar ainda, a eficácia da orientação clínica e terapêutica adoptadas no

acompanhamento destas lesões, associando a detecção e tipificação HPV realizada à posteriori.

MATERIAL E MÉTODOS

1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

A partir do quadro do Programa de Rastreio do Cancro do Colo Uterino da Zona Centro (entre 1990 e 1994), seleccionaram-se 100 mulheres que recorreram à Consulta de Ginecologia do Centro de Oncologia de Coimbra por apresentarem diagnóstico citopatológico do colo uterino classificado como anormal. Todas estas mulheres foram sujeitas a biópsias do colo uterino orientadas por colposcopia, dado apresentarem diagnóstico colposcópico compatível com lesão cervical.

Foram excluídas 16 mulheres por razões diversas: dados incompletos na história clínica (n=5), resultado histopatológico sem evidência de lesão cervical (n=4), material insuficiente para diagnóstico (n=3), dificuldades com o arquivo de material (n=4). Considerou-se um total de 84 mulheres: 48 com lesões CIN1 e HPV, 29 com lesões CIN2 e CIN3/Cis, 6 carcinoma invasivo e 1 adenocarcinoma do colo uterino, avaliando-se posteriormente, os vários tipos de acompanhamento clínico e/ou intervenção cirúrgica a que haviam sido submetidas, por um período de cinco anos (1990/94)-biópsia, curetagem, conização frio/laser, histerectomia total/histerectomia total tipo wertheim meigs.

A caracterização do grupo baseou-se em dados colhidos a partir da história clínica individual: a) caracterização demográfica básica – idade, estado civil, profissão, concelho de origem; b) dados epidemiológicos – faixa etária, menarca, idade das primeiras relações sexuais, número de parceiros sexuais, índice de paridade, tipo de contracepção (oral e outros). Da observação ginecológica recolheram-se informações quanto à primeira observação colposcópica (mosaico, base, vasos atípicos, pontuado, leucoplasia), ao diagnóstico final atribuído à citologia, inicialmente classificada como anormal, (atipia, HPV, CIN1, 2 ou 3 e carcinoma) e aos resultados histopatológicos das biópsias.

Agrupou-se segundo os critérios de classificação SIL (lesão intra-epitelial escamosa) para as lesões pré-malignas do colo uterino : CIN1 e HPV em lesões de baixo grau (LSIL) e CIN2 e CIN3/Cis em lesões de alto grau (HSIL).

2- PROCESSAMENTO DE MATERIAL

O material a analisar foi obtido a partir de blocos de parafina arquivados, tendo sido realizadas secções de (5µ) de tecido, correspondendo ao material histopa-

tológico colhido por biópsia em cada uma das 84 mulheres. Procedeu-se de igual forma em relação ao material parafinado das que haviam sido submetidas a vários tipos de intervenção posterior.

Os fragmentos de tecido obtidos foram colocados em tubos estéreis (Eppendorf) de 1.5ml e enviados para o Laboratório de Virologia (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa) a fim de se proceder à detecção e tipificação do HPV pelo método de amplificação enzimática do ADN (PCR).

Após desparafinização com xilol, procedeu-se à extração do ADN com tampão de lise, proteinase K a 55° C durante 3h.

Em 72 amostras, o PCR foi realizado seguindo as condições enunciadas por Dallas, preparando-se uma mistura constituída por 1g/ml de ADN em 35 de H₂O, de tampão (0.5g de cada *primer*, 1ml de cada d NTP, 10% DMSO, 10 mM sulfato amónia, 50nM Tris ph 8.8, 10 mM MgCl₂), 44 Taq polimerase (Perkin Elmer). Aplicaram-se 35 ciclos de desnaturação, hibridação e extensão respectivamente, 30 seg a 93° C, 30 seg a 50° C e 90 seg a 72° C. Colocaram-se 15 num gel de agarose a 2% com brometo de etídio e visualizou-se aos u.v..

Em 191 amostras foi utilizado o Kitt VPH fast (Pharmagen), segundo o protocolo do fabricante. Após 35 ciclos (1min a 94°C, 1.5 min a 52° C, 2 min a 72° C) de amplificação enzimática procedeu-se à digestão enzimática do fragmento amplificado com posterior análise em gel de 2.5% agarose (Metaphor), do padrão de digestão característico de cada tipo de HPV.

RESULTADOS

Do total das 84 mulheres avaliadas, 77 apresentavam diagnóstico histopatológico compatível com lesão SIL (LSIL = 48 (51.7%) / HSIL = 29 (34,5%)), tendo ainda sido considerados 7 casos (8,3%) com diagnóstico de carcinoma do colo (6 carcinoma invasivo e 1 adenocarcinoma).

A idade média para o total dos casos foi de 40 anos (21-67 anos); idade média da menarca de 12 anos (min.9 e máx.18 anos); idade média das 1ª relações sexuais de 18 anos (min.14 e máx.26 anos); a média do número de gestações foi de 3 (min.0 e máx.13); média do número de partos de 2 (min.0 e máx.11)(CL 95%). O número de parceiros sexuais foi referido na maioria dos casos como um, considerando-se para efeitos do estudo como 1 ou >1. Dos métodos contraceptivos utilizados ou em utilização, a contracepção oral foi o método mais frequente. Este parâmetro foi considerado para efeitos de avaliação como -contracepção oral e outros.

Após detecção e tipificação do ADN/HPV por PCR,

verificou-se para o total das lesões cervicais estudadas (n=84) uma prevalência de infecção HPV de 97.8%.

Considerando cada grau de lesão individualmente, observou-se um predomínio (83,3%) dos tipos de HPV de baixo risco nas lesões de baixo grau (LSIL) e dos tipos de HPV de alto risco (58,6%) nas lesões de alto grau (HSIL) e cancro do colo (100%), havendo uma diferença estatisticamente significativa para infecção por tipos de HPV de baixo e alto risco entre os sub-grupos SIL (LSIL/HSIL) avaliados ($p < 0.05$) (Figura 1).

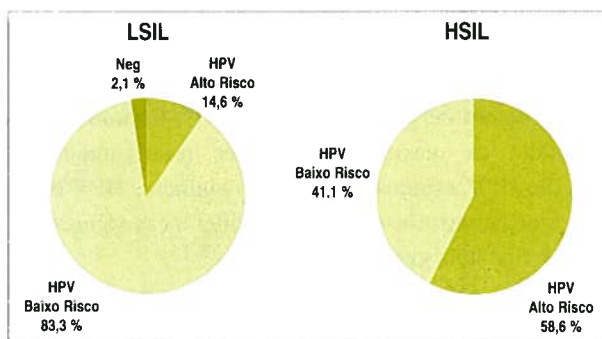


Fig.1 - Percentagem dos tipos de HPV (Baixo e Alto risco) por Grau de Lesão SIL (LSIL / HSIL)

De acordo com a faixa etária avaliada foram considerados três grupos: 20-35 anos, 36-45 anos e >45 anos. Verificou-se não existirem diferenças significativas quer na distribuição dos graus de lesão (LSIL, HSIL e Cancro), quer na distribuição dos tipos de HPV detectados (baixo ou alto risco), entre os três grupos etários estudados.

Analisando (Quadro 1) alguns dos factores de risco reprodutores e sexuais para lesão SIL (grupo etário, idade da menarca, idade do início de actividade sexual, número de parceiros sexuais referidos; número de gestações; número de partos; método contraceptivo utilizado, infecção HPV por tipos de baixo e alto risco e infecção múltipla HPV) não se observaram diferenças significativas para a maioria deles, excepto no que se refere à infecção HPV em que se demonstrou existir uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os dois graus de lesão SIL (LSIL/HSIL), quer considerando a infecção HPV por tipos de baixo e alto risco, quer pelos diferentes sub-tipos de HPV pesquisados. Pode ainda verificar-se, considerando os vários subtipos de HPV que o HPV16, sendo frequentemente encontrado nas lesões de alto grau e cancro do colo, apresenta uma percentagem superior em relação aos outros tipos de HPV de alto risco nas lesões HSIL 31.3%, tendo sido detectado em muito menor percentagem nas LSIL 4.2%. O HPV 18 considerado o mais oncogénico dos HPV genitais, não esteve presente em nenhuma das LSIL mas

Quadro I - Factores de Risco para SIL (LSIL/HSIL)

Factores de Risco	LSIL (48)	HSIL (29)	P
Idade			
20-35	18 (37,5%)	8 (27,5%)	
36-45	20 (41,6%)	10 (34,4%)	ns
>45	10 (22,9%)	11 (37,9%)	
Menarca			
<12	17 (35,4%)	13 (44,8%)	
>12	31 (64,5%)	16 (55,1%)	ns
Idade 1as R. Sexuais			
<18	17 (35,4%)	13 (44,8%)	
>18	31 (64,5%)	17 (58,6%)	ns
Parceiros Sexuais			
1	44 (91,7%)	24 (82,8%)	
>1	4 (8,3%)	5 (17,2%)	ns
Nº Paras1			
<3	43 (89,5%)	24 (82,7%)	
>3	5 (10,4%)	5 (17,2%)	ns
Nº Gestações2			
<2	37 (77,1%)	21 (72,4%)	
>2	11 (22,9%)	8 (27,5%)	ns
Contraceção2			
CO	27 (56,2%)	17 (58,6%)	
Outros	21 (43,7%)	12 (41,3%)	ns
HPV			
BR3	40 (83,3%)	12 (41,4%)	
AR4	7 (14,5%)	17 (58,6%)	p<0,05
Tipos HPV			
16 e 16/33	2 (4,2%)	9 (31,3%)	
31, 33, 51	5 (10,4%)	3 (10,3%)	
18	-	5 (17,2%)	p<0,05
6/11	40 (83,3%)	12 (41,3%)	
neg	1 (2,1%)	-	
Infecções Múltiplas HPV			
1 tipo HPV	42 (87,5%)	26 (89,7%)	
Mais do que um tipo de HPV	5 (10,5%)	3 (10,3%)	ns

1 N° Paras - N° Partos; 2CO - Contraceção Oral; 3BR - baixo risco; 4AR - alto risco; 5ns - não significativo

foi detectado em 17,1% dos casos de HSIL. Os tipos de HPV considerados de risco intermédio, HPV 31,33,51, apresentaram-se distribuídos equitativamente: LSIL 10,4% e HSIL 10,3%. Os tipos de baixo risco, HPV 6/11, foram detectados numa percentagem superior nas lesões LSIL 83,3% relativamente às lesões de HSIL 41,3%. No que se refere a infecção múltipla HPV, o valor médio encontrado foi de 10,4%, não existindo diferença estatística

significativa relativamente aos dois graus de lesão (LSIL e HSIL).

ACOMPANHAMENTO/CONTROLO CLÍNICO /TERAPÊUTICA

Numa perspectiva de análise da evolução das lesões, bem como da infecção HPV a elas associada, subdividiram-se igualmente as lesões SIL em: LSIL e HSIL, com infecção por tipos de HPV de baixo e alto risco. Consideraram-se separadamente as lesões de carcinoma do colo.

A análise do acompanhamento clínico efectuada corresponde a um período de cinco anos (1990/94, inclusivé). As intervenções clínicas e terapêuticas subsequentes foram diversas, em função do tipo de lesão e de factores individuais ou clínicos associados (biópsia, curetagem, diatermocoagulação, vaporização laser, conização frio/laser, histerectomia total/histerectomia total tipo wertheim meigs). De uma forma geral estas terapêuticas mediam 6 meses a 1 ano após o primeiro diagnóstico histopatológico, salvo nas que apresentando diagnóstico de carcinoma, o tempo entre diagnóstico e tratamento foi mais curto. O período entre as consultas foi de 3 a 6 meses, variando de acordo com cada situação clínica. Na vigilância clínica efectuada foram utilizados frequentemente o exame colposcópico e o exame citológico do colo uterino. Para as doentes consideradas "perdidas" os motivos foram: as faltas sistemáticas ou abandono da consulta e a alta para o médico de família.

No acompanhamento clínico a que foram submetidas as doentes com LSIL (n=48) verificou-se que estas haviam sido sujeitas a uma segunda avaliação, após o diagnóstico histopatológico inicial, tendo sido considerados perdidos 14 casos, três deles com infecção por tipos de HPV de alto risco.

Em relação à orientação clínica ou terapêutica inicial a que foram submetidas registaram-se: nova biópsia (19), diatermocoagulação (2), curetagem do endocolo (1), conização a frio/laser (1), vaporização laser (2), histerectomia total (0) (Quadro II).

Quadro II - LSIL / Controlo Clínico e Terapêutica Inicial

	Nº Doentes	BI ¹	DC ²	CEC ³	Coniz F/L ⁴	V.Laser ⁵	HT ⁶
LSIL (HPV-BR)	40	12	2	1	1	2	0
LSIL (HPV-AR)	7	7	2	0	0	0	0
Total	47	19	4	1	1	2	0

1BI - Biópsia; 2DC - Diatermocoagulação; 3CEC - Curetagem do Endocolo; 4Coniz F/L - Conização Frio/Laser; 5V. Laser - Vaporização Laser; 6HT - Histerectomia Total; 7BR - Baixo risco; 8AR - alto risco

Nas doentes (n=19) que realizaram novas biópsias por LSIL verificou-se que (Quadro III): a maioria (n=11) manteve o mesmo grau de lesão LSIL e o mesmo tipo de HPV de baixo risco (6/11). No entanto, observaram-se sete doentes com LSIL apresentando infecção por tipos de HPV de alto risco que mantiveram no estudo histológico seguinte o mesmo grau de lesão LSIL (excepto uma com diagnóstico de HSIL), mantendo-se em todos os casos infecção por tipos de HPV de alto risco. Observou-se ainda um caso do total destas lesões (n = 19) com ausência de lesão no fragmento da biópsia e com teste HPV negativo.

Quadro III - LSIL / Biópsias / 1º Controlo

	Nº Doentes	S/Lesão	LSIL	HSIL	Cancro
LSIL (HPV-BR)	12	1 (Neg.)	11 (BR)	0	0
LSIL (HPV-AR)	7	0	6 (AR)	1 (AR)	0
Total	19	1	17	1	0

¹BR - baixo risco; ²AR - alto risco; ³Neg - negativo

Considerando como doentes de risco os sete casos que apresentavam LSIL com HPV de alto risco, verificou-se em biópsias subsequentes, que:

- três doentes apresentavam lesão LSIL, com HPV 31/51 e 33, idênticos aos detectados inicialmente. Uma destas doentes realizou entretanto histerectomia total, tendo a peça operatória revelado uma lesão HSIL com HPV33. Todas estas mulheres foram mantidas em vigi-lância

- três doentes apresentando LSIL com HPV de alto risco (duas com HPV16/33 e uma HPV31/51), foram consideradas perdidas por abandono da consulta.

- a doente com lesão de alto grau HSIL e HPV de alto risco 16/33, manteve-se em vigilância, apresentando nas biópsias posteriores um diagnóstico de LSIL, mas sempre com HPV33.

Havia sido proposto no último *follow-up* realizar uma diatermocoagulação.

Das mulheres com HSIL (n=29) verificou-se que todas haviam sido sujeitas a uma segunda avaliação após o diagnóstico histopatológico inicial, mantendo-se a maioria delas em vigilância até à data do final do estudo, excepto quatro casos (com infecção HPV de baixo risco) que foram considerados perdidos.

Quanto à orientação clínica ou terapêutica inicial a que foram submetidas registaram-se: nova biópsia (2), diatermocoagulação (1), curetagem biópsia (1), conização a frio ou a laser (13) e histerectomia total (10) (Quadro IV).

Quadro IV - HSIL / Controlo Clínico e Terapêutica Inicial

	Nº Doentes	BI ¹	DC ²	CBTF ³	Coniz F/L ⁴	HT ⁵
HSIL (HPV-AR)	17	1	0	0	8	8
HSIL (HPV-BR)	12	2	2	1	5	2
Total	29	3	2	1	13	10

¹BI - Biópsia; ²DC - Diatermocoagulação; ³CBTF - Curetagem Biópsia; ⁴Coniz F/L - Conização Frio/Laser; ⁵HT - Histerectomia Total; ⁶BR - baixo risco; ⁷AR - alto risco

Nas doentes submetidas a conização a frio/laser e histerectomia total (n=23) verificou-se que na maioria dos casos se manteve o diagnóstico de lesão de alto grau (HSIL) com infecção por tipos de HPV de alto risco (HPV16 em 50% dos casos), tendo sido diagnosticados ainda, quatro casos de carcinoma micro-invasivo nas peças operatórias, todos com o mesmo tipo de infecção HPV de alto risco (HPV16) (Quadros V e VI).

Quadro V - Conização Frio / Laser (HSIL)

	Nº Doentes	S/ Lesão	LSIL	HSIL	Cancro
HSIL (HPV-AR)	8	0	0	6 (AR)	2 (AR)
HSIL (HPV-BR)	5	1 (BR)	0 (3BR) + (1BR + AR)	4	0
Total	13	1	0	10	2

¹BR - baixo risco; ²AR - alto risco

Quadro VI - Histerectomia Total (HSIL)

	Nº Doentes	S/ Lesão	LSIL	HSIL	Cancro
HSIL (HPV-AR)	8	1 (AR)	0 (3AR + 3BR)	6	1 (AR)
HSIL (HPV - BR)	2	1 (Neg)	0	0	1 (AR)
Total	10	2	0	6	2

¹BR - baixo risco; ²AR - alto risco; ³Neg - Negativo

Todas estas doentes foram mantidas em vigilância periódica até à data do final do estudo, excepto uma com HPV de baixo risco, considerada perdida por abandono da consulta.

Relativamente ao acompanhamento clínico a que foram sujeitas as doentes com diagnóstico de carcinoma do colo, verificou-se que nos casos estudados, todas haviam sido sujeitas a uma segunda avaliação, não se tendo verificado casos perdidos.

Na orientação clínica e terapêutica adoptada em cada

situação, verificou-se (Quadro VII):

- a doente com adenocarcinoma do colo foi submetida a histerectomia total tipo wertheim meigs. Manteve-se o diagnóstico histopatológico inicial e o mesmo tipo de vírus de alto risco (HPV16).

- das quatro doentes com diagnóstico suspeito de carcinoma invasivo, uma realizou nova biópsia, revelando uma HSIL, com o mesmo tipo de HPV de alto risco (HPV16); duas foram submetidas a conização revelando uma lesão LSIL, com o mesmo tipo de vírus (HPV 31) e uma lesão HSIL com o mesmo tipo de HPV (HPV16); a doente sujeita a histerectomia total não apresentava lesão de carcinoma na peça operatória, mas manteve o mesmo tipo de infecção viral por HPV 16.

- as duas doentes com diagnóstico de carcinoma invasivo foram submetidas a histerectomia total tipo wertheim meigs, uma não apresentava lesão para carcinoma e a outra revelou uma lesão HSIL. No entanto em ambas as peças operatórias foi observada infecção HPV pelo mesmo tipo de vírus que havia sido detectado antes (HPV31/51 e 16)

Quadro VII - Cancro / Controlo Clínico e Terapêutica Inicial

	Nº Doentes	BI1	Coniz F/L2	HT3	WM4
Adeno	1 (AR)	0	0	0	1 (AR)
C. Invasivo?	4 (AR)	1 (AR)	2 (AR)	1 (AR)	0
C. Invasivo	2 (AR)	0	0	0	2 (AR)
Total	7	1	2	1	3

¹BI - Biópsia; ²Coniz F/L - Conização Frio/Laser; ³HT - Histerectomia Total; ⁴WM - Whertheim Meigs; ⁵BR - baixo risco; ⁶AR - alto risco

EXAMES CITOLÓGICO/HISTOPATOLÓGICO

Estabeleceu-se uma correlação entre o exame citológico inicial e o resultado histopatológico ao nível da primeira biópsia, determinando-se os índices de comparação para os dois exames considerados. O valor encontrado foi de K=0,52 (Quadro VIII).

Quadro VIII - Citologia / Histologia das Lesões Cervicais

Histologia	CITOLOGIA						Total	
	ATSI(1)	HPV	Cin 1	Cin 2	Cin 2/3	Cin 3		
LSIL (48)	2	6	29	7	2	2	0	48
HSIL (29)	2	-	3	6	2	11	5	29
Cancro (6)						2	4	6
Adenoc. (1)			1					1

1Atipia de Significado Indeterminado

CITOLOGIA/HISTOLOGIA/TIPIFICAÇÃO VIRAL

A partir da distribuição dos diversos tipos de HPV detectados nos dois graus de lesão SIL (LSIL/HSIL) e nos casos de carcinoma, pretendeu-se estabelecer uma correlação entre a distribuição da infecção HPV e o diagnóstico citológico inicial, por lesão histopatológica.

- No grupo das lesões LSIL verificou-se que existiam para os 11 falsos positivos do exame citológico, unicamente dois casos com tipos de HPV de alto risco.

- No grupo das lesões HSIL observaram-se para os cinco falsos negativos do exame citológico, três casos com tipos de HPV de alto risco e dois com tipos de vírus de baixo risco.

- No grupo dos carcinomas, verificou-se que existia um falso negativo do exame citológico para a situação de adenocarcinoma do colo, tendo a tipificação viral encontrado um tipo de HPV de alto risco (HPV16).

DISCUSSÃO

Diversos estudos têm vindo a ser realizados na área da patologia viral associada à transformação carcinomatosa do colo uterino. Apesar de existirem evidências quanto ao papel potencialmente oncogénico de determinados tipos de HPV, isto não quer dizer, que a infecção causada por estes vírus ubíquos seja por si só suficiente para induzir o aparecimento de tumores malignos. Outros factores de risco (comportamentais e outros) poderão provocar alterações adicionais (por ex.: ao nível dos genes celulares), promovendo o crescimento de clones de células malignas.

Não existe actualmente consenso quanto à prevalência da infecção genital HPV, tal como foi demonstrado num artigo de revisão de Meigers et al ⁵. Factores geográficos e demográficos, assim como diferenças nos métodos de colheita de amostras, e nas técnicas de diagnóstico e tipificação viral utilizadas, poderão explicar estas discrepâncias^{7,10,21,22-24}.

No estudo que realizámos em material histopatológico de arquivo, verificámos para o total das lesões cervicais estudadas (n=84) uma prevalência de infecção HPV de 97.8 %.

A prevalência da infecção pelo HPV encontrada no nosso estudo está de acordo com a de outros estudos realizados com o mesmo tipo de material (tecidos) e com a utilização da mesma técnica de hibridação molecular (PCR). Em amostras de tecidos, colhidos por biópsia dirigida por colposcopia, com diagnóstico histopatológico de lesão cervical (lesões intra-epiteliais e cancro do colo) são referidos valores de prevalência para o ADN/HPV (detectado pelo método PCR) entre 80% e

100%²⁵.

Verifica-se que a percentagem de incidência aumenta quando as amostras avaliadas se referem não a esfregaços de células, mas a fragmentos de biópsias, em que a quantidade de material é nitidamente superior. Nuria Margal et al²⁶ demonstraram que a detecção por PCR da infecção HPV nos esfregaços citológicos, era menos sensível que nos fragmentos de tecido recolhidos por biópsia (13.6% versus 53%).

Relativamente aos métodos de detecção referem-se na literatura percentagens diferentes na prevalência do HPV, quando se compararam técnicas diversas utilizadas em citologias normais, com uma maior sensibilidade da PCR (12% dot blot e 27% para PCR)²⁷. A eficácia da hibridação in situ e da PCR na detecção do HPV 16/18 foi avaliada, sendo a PCR três vezes mais sensível (52.6% versus 17.8%) que a hibridação in situ²⁶.

A estandardização do processo de detecção do HPV tem vindo por esse motivo, a ser largamente defendida pela generalidade dos investigadores, como forma de minimizar as variações entre resultados obtidos^{4,5,19,24,26,28}.

A PCR foi o método de diagnóstico e tipificação por nós escolhido, pelas características próprias que lhe conferem um maior grau de sensibilidade, pela possibilidade de utilização de pequenas quantidades de material e pela sua possível aplicação em material parafinado²¹⁻²³.

Nas amostras que avaliamos, classificadas como lesões cervicais LSIL e HSIL verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) para a prevalência de infecção HPV por tipos de baixo e alto risco, tal como é referido em diversos trabalhos. A prevalência da infecção por tipos de HPV de baixo risco (HPV 6/11) era superior nas LSIL 83.3%, sendo de 41.4% nas HSIL, não tendo sido detectados tipos de HPV de baixo risco nas lesões de carcinoma. Pelo contrário a prevalência da infecção por tipos de HPV de alto risco (HPV 16,18,31,33,51) foi nitidamente superior nas lesões classificadas como de alto grau 58.6% e carcinoma 100%, diminuindo significativamente nas lesões de baixo grau 14.6% (Figura 1).

O aumento da percentagem de tipos de HPV de alto risco (HPV 16,18,31,33) associado ao grau de lesão SIL, foi demonstrado por Kurz et al²⁹ num estudo de prevalência utilizando PCR na detecção e tipificação do ADN/HPV, observando-se valores de 48% para CIN1, 75% para CIN2 e 100% para CIN3 e carcinoma invasivo. Valores semelhantes foram revelados por Arends et al³⁰ com uma prevalência do HPV 16/18 de 60% para

CIN2 e 3 e um valor inferior de 20% para CIN1.

Os dados que obtivemos estão de acordo com estes e outros valores encontrados na literatura, em que é referida uma correlação positiva entre a presença de tipos de HPV com potencial oncogénico (HPV 16,18,31,33,51) e gravidade das lesões cervicais^{5,7,24,25,28}.

A prevalência da infecção HPV é observada como dependente da idade, em diversos estudos epidemiológicos. Em vários estudos realizados em citologias normais, verificou-se um aumento da prevalência de infecção HPV em mulheres no grupo etário dos 20-25 anos, a qual diminuía com o aumento da idade^{4,5,13,14}. Em contraste, refere-se que a prevalência da infecção HPV em mulheres com citologias anormais não variou com a idade, mantendo-se alta nas diferentes faixas etárias avaliadas^{6,13,14}.

No estudo que realizámos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos etários considerados, relativamente à prevalência de infecção HPV, por grau de lesão cervical estudada. Os resultados do nosso estudo são assim semelhantes a outros referidos na literatura, em que se verificou que a prevalência da infecção HPV, quando associada a lesões cervicais, não era dependente da idade, podendo mesmo aumentar conforme o aumento da incidência e a gravidade das lesões^{6,13,14}.

Para além da infecção HPV o cancro do colo tem factores de risco epidemiologicamente bem definidos, tais como o início precoce da actividade sexual e a referência a múltiplos parceiros sexuais. Outros possíveis factores de risco associados incluem hábitos tabágicos, a multiparidade, o uso prolongado de contraceptivos orais, infecções genitais associadas, factores étnicos e sociais. A associação com algumas deficiências alimentares e a utilização de marcadores hormonais e imunológicos têm sido igualmente objecto de investigação^{7,8,11,18}.

No estudo por nós elaborado não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre lesões de baixo e alto grau, relativamente aos factores de risco tradicionalmente aceites para neoplasia cervical. A análise dos diversos parâmetros, revelou o papel dominante da infecção HPV relativamente aos outros factores de risco considerados, demonstrando-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre lesão de baixo e alto grau para infecção HPV por tipos de baixo e alto risco (Quadro I). Esta observação está de acordo com outros estudos epidemiológicos realizados (comparando a influência de diversos factores de risco para neoplasia cervical e infecção HPV), nos quais a infecção HPV é considerada como factor de risco cen-

tral no desenvolvimento do cancro do colo uterino^{7-9,12,14,17,24}.

A percentagem de infecções múltiplas HPV do nosso estudo foi de 10,4%, não existindo diferenças significativas entre lesão de baixo e alto grau (Quadro I). O valor encontrado está no entanto acima de outros valores referidos na literatura, para infecção múltipla HPV com a utilização do método de PCR. Pensa-se que tipos diferentes de HPV, actuem sinergicamente contribuindo para o processo neoplásico. A infecção múltipla poderá significar no entanto uma persistência de infecção por um dos tipos de HPV responsável pela lesão cervical, com infecção secundária por novos tipos de vírus a nível da lesão.

Percentagens entre 2,5% a 3% de infecções múltiplas HPV, foram encontradas em estudos com utilização de PCR, em lesões CIN²⁵⁻³¹. Em diversos estudos, utilizando outras técnicas de hibridação molecular, referem-se valores diferentes destes, para esta variável³¹. Outra observação referida na literatura é a de que a percentagem de infecção múltipla HPV é normalmente mais alta nas lesões de baixo grau. Foram encontrados valores de 22% de infecções múltiplas em lesões LSIL, contendo tipos de baixo e alto risco, em contraste com lesões HSIL, referidas como mais homogêneas com respeito ao tipo de vírus presente, encontrando-se em 89% destas, só 7% de infecção múltipla^{25,31}. O valor percentual relativamente alto e semelhante que obtivemos para os dois tipos de lesão cervical (LSIL/HSIL), poderá corresponder no entanto, ao resultado real que casualmente encontramos, para a nossa população de estudo.

ACOMPANHAMENTO CLÍNICO/TERAPÊUTICO

Relativamente ao acompanhamento clínico e terapêutico das doentes estudadas, patologistas e ginecologistas ignorando o tipo de HPV implicado por lesão cervical, orientaram estas mulheres segundo critérios clínicos e histopatológicos, consoante a gravidade das lesões cervicais observadas. Os critérios adoptados vieram a revelar, de uma forma geral, uma coincidência entre atitude clínica perante o grau de lesão observada e risco de infecção por tipos de HPV de baixo e alto risco, determinados posteriormente. No entanto, poder-se-à inferir, após uma *leitura* detalhada do acompanhamento clínico efectuado, que algumas destas atitudes terapêuticas poderiam ter beneficiado com o conhecimento prévio do tipo de infecção HPV presente, por grau de lesão cervical, orientando deste modo a atitude terapêutica, de uma forma mais conservadora ou mais intervencionista.

Numa análise do acompanhamento clínico das lesões

do colo uterino do estudo que efectuámos, verificou-se que:

1-No que se refere ao acompanhamento clínico inicial das lesões LSIL deste estudo (Quadro II), das quarenta e sete lesões de baixo grau associadas a infecção HPV, todas haviam sido avaliadas após o primeiro diagnóstico da lesão. Foram perdidas 14 mulheres por razões várias, estando as restantes em vigilância periódica à data do final do estudo.

Do total (n=47), 19 doentes foram sujeitas a novas biópsias dirigidas, 2 realizaram diatermo-coagulação, 1 curetagem do endocolo, 1 conização a frio e 2 vaporização laser.

A orientação clínica e terapêutica neste estudo, relativamente às lesões LSIL é globalmente conservadora, o que está de acordo com os que defendem que o risco individual para uma doente com lesão de baixo grau desenvolver carcinoma invasivo é extremamente baixo, e que o risco de sobre-tratamento é imprevisível, dada a percentagem de lesões que poderão eventualmente regredir de forma espontânea. Os mais intervencionistas têm vindo a defender contudo, que a utilização de técnicas que associem diagnóstico e terapêutica poderá solucionar o problema do acompanhamento das lesões LSIL, até que outros métodos mais eficazes sejam introduzidos, de forma a resolver o problema ligado à potencial capacidade de progressão destas lesões (em especial para as que deixam de estar sob vigilância), bem como a uma possível omissão de lesões de alto grau ou cancro invasivo a elas associadas^{27,31}.

Nos 19 fragmentos de biópsia estudados (Quadro III), verificou-se que em 65% (n=11), se mantinha o mesmo grau de lesão cervical LSIL com infecção por tipos de HPV de baixo risco. Em 34% (n=7) foi detectada, no entanto, infecção HPV por tipos de HPV de alto risco, o que demonstra, dados os resultados igualmente obtidos nos *follow up* seguintes (persistência da infecção HPV, por tipos de HPV de alto risco), que a detecção e tipificação do ADN/HPV ter-se-ia revelado de grande utilidade na orientação clínica e terapêutica destas lesões.

Enquanto se debatem em termos clínicos, os problemas da orientação das lesões LSIL, parece-nos lógica, perante os resultados que obtivemos, a posição daqueles que defendem que, a introdução do teste de detecção do ADN/HPV associado ao exame citológico, em especial no grupo de mulheres com lesões cervicais de baixo grau, poderá melhorar no futuro a atitude clínica e terapêutica, determinando um valor preditivo para lesões de alto grau e cancro do colo nestas mulheres^{4,5,10,24,25,31,32}.

tral no desenvolvimento do cancro do colo uterino^{7-9,12,14,17,24}.

A percentagem de infecções múltiplas HPV do nosso estudo foi de 10,4%, não existindo diferenças significativas entre lesão de baixo e alto grau (Quadro I). O valor encontrado está no entanto acima de outros valores referidos na literatura, para infecção múltipla HPV com a utilização do método de PCR. Pensa-se que tipos diferentes de HPV, actuem sinergicamente contribuindo para o processo neoplásico. A infecção múltipla poderá significar no entanto uma persistência de infecção por um dos tipos de HPV responsável pela lesão cervical, com infecção secundária por novos tipos de vírus a nível da lesão.

Percentagens entre 2,5% a 3% de infecções múltiplas HPV, foram encontradas em estudos com utilização de PCR, em lesões CIN²⁵⁻³¹. Em diversos estudos, utilizando outras técnicas de hibridação molecular, referem-se valores diferentes destes, para esta variável³¹. Outra observação referida na literatura é a de que a percentagem de infecção múltipla HPV é normalmente mais alta nas lesões de baixo grau. Foram encontrados valores de 22% de infecções múltiplas em lesões LSIL, contendo tipos de baixo e alto risco, em contraste com lesões HSIL, referidas como mais homogêneas com respeito ao tipo de vírus presente, encontrando-se em 89% destas, só 7% de infecção múltipla^{25,31}. O valor percentual relativamente alto e semelhante que obtivemos para os dois tipos de lesão cervical (LSIL/HSIL), poderá corresponder no entanto, ao resultado real que casualmente encontramos, para a nossa população de estudo.

ACOMPANHAMENTO CLÍNICO/TERAPÊUTICO

Relativamente ao acompanhamento clínico e terapêutico das doentes estudadas, patologistas e ginecologistas ignorando o tipo de HPV implicado por lesão cervical, orientaram estas mulheres segundo critérios clínicos e histopatológicos, consoante a gravidade das lesões cervicais observadas. Os critérios adoptados vieram a revelar, de uma forma geral, uma coincidência entre atitude clínica perante o grau de lesão observada e risco de infecção por tipos de HPV de baixo e alto risco, determinados posteriormente. No entanto, poder-se-à inferir, após uma *leitura* detalhada do acompanhamento clínico efectuado, que algumas destas atitudes terapêuticas poderiam ter beneficiado com o conhecimento prévio do tipo de infecção HPV presente, por grau de lesão cervical, orientando deste modo a atitude terapêutica, de uma forma mais conservadora ou mais intervencionista.

Numa análise do acompanhamento clínico das lesões

do colo uterino do estudo que efectuámos, verificou-se que:

1-No que se refere ao acompanhamento clínico inicial das lesões LSIL deste estudo (Quadro II), das quarenta e sete lesões de baixo grau associadas a infecção HPV, todas haviam sido avaliadas após o primeiro diagnóstico da lesão. Foram perdidas 14 mulheres por razões várias, estando as restantes em vigilância periódica à data do final do estudo.

Do total (n=47), 19 doentes foram sujeitas a novas biópsias dirigidas, 2 realizaram diatermo-coagulação, 1 curetagem do endocolo, 1 conização a frio e 2 vaporização laser.

A orientação clínica e terapêutica neste estudo, relativamente às lesões LSIL é globalmente conservadora, o que está de acordo com os que defendem que o risco individual para uma doente com lesão de baixo grau desenvolver carcinoma invasivo é extremamente baixo, e que o risco de sobre-tratamento é imprevisível, dada a percentagem de lesões que poderão eventualmente regredir de forma espontânea. Os mais intervencionistas têm vindo a defender contudo, que a utilização de técnicas que associem diagnóstico e terapêutica poderá solucionar o problema do acompanhamento das lesões LSIL, até que outros métodos mais eficazes sejam introduzidos, de forma a resolver o problema ligado à potencial capacidade de progressão destas lesões (em especial para as que deixam de estar sob vigilância), bem como a uma possível omissão de lesões de alto grau ou cancro invasivo a elas associadas^{27,31}.

Nos 19 fragmentos de biópsia estudados (Quadro III), verificou-se que em 65% (n=11), se mantinha o mesmo grau de lesão cervical LSIL com infecção por tipos de HPV de baixo risco. Em 34% (n=7) foi detectada, no entanto, infecção HPV por tipos de HPV de alto risco, o que demonstra, dados os resultados igualmente obtidos nos *follow up* seguintes (persistência da infecção HPV, por tipos de HPV de alto risco), que a detecção e tipificação do ADN/HPV ter-se-ia revelado de grande utilidade na orientação clínica e terapêutica destas lesões.

Enquanto se debatem em termos clínicos, os problemas da orientação das lesões LSIL, parece-nos lógica, perante os resultados que obtivemos, a posição daqueles que defendem que, a introdução do teste de detecção do ADN/HPV associado ao exame citológico, em especial no grupo de mulheres com lesões cervicais de baixo grau, poderá melhorar no futuro a atitude clínica e terapêutica, determinando um valor preditivo para lesões de alto grau e cancro do colo nestas mulheres^{4,5,10,24,25,31,32}.

2-No que se refere às lesões cervicais HSIL (Quadro IV), manteve-se para a maioria dos casos o diagnóstico de lesão de alto grau com infecção HPV de alto risco associada, o que está de acordo com as diminutas probabilidades de regressão para as lesões de alto grau, e com o alto grau de persistência de infecção HPV para este tipo de lesão. O HPV 16 sendo o tipo de HPV de alto risco mais frequentemente encontrado em lesões de alto grau e cancro, é aquele que aparece na maioria dos estudos como influenciando mais directamente a persistência e progressão das lesões intra-epiteliais escamosas para carcinoma invasivo do colo uterino^{4,5,17-20,25,28,32}. Foi também o HPV 16, o tipo mais frequente de HPV de alto risco, encontrado (>50% dos casos) nas peças operatórias de conização (n=13) e histerectomia total (n=10), a que foram sujeitas as lesões de alto grau HSIL (n=29) do nosso estudo.

As doentes submetidas a conização (n=13) mantiveram em seis casos o mesmo tipo de lesão de alto grau (CIN3 ou CIN2/3) com infecção por tipos de HPV de alto risco (Quadro V), tendo sido propostas para vigilância clínica. Embora considerando critérios individuais na avaliação clínica de cada doente, verifica-se que com o conhecimento simultâneo do tipo de infecção viral em causa, algumas destas mulheres poderiam ter sido orientadas de imediato para uma terapêutica mais radical, dado o risco aumentado que apresentavam de progressão das suas lesões, para carcinoma invasivo do colo uterino.

Após histerectomia total (Quadro VI), verificou-se que nas doentes que apresentavam lesões de alto grau (n=8) com infecção HPV de alto risco, manteve-se na maioria delas (n=6) lesões de alto grau (CIN3/CIS) com infecção por tipos de HPV de alto risco, considerando-se desta forma que o critério clínico adoptado nestes casos, se veio a revelar compatível com o tipo de infecção HPV em causa.

Verificaram-se do total das peças operatórias de conização e histerectomia (n=23), três casos com ausência de lesão e três com diagnóstico de carcinoma (Quadros V, VI). Relativamente aos primeiros, poder-se-à concluir que provavelmente a lesão inicial havia sido totalmente excisada na biópsia inicial. A infecção HPV mantida em dois deles, poderá significar a existência de infecção oculta ao nível das peças operatórias, sem tradução histopatológica evidente. Foi documentado que o nível de doença oculta (definido por presença de ADN/HPV na ausência de diagnóstico histopatológico de SIL) é de cerca de 10% por dot blot e de 30% por PCR²⁷. A observação de que a PCR tem uma grande sensibilidade mas um valor preditivo baixo, resulta da sua

capacidade de detecção de infecções ocultas, as quais nem sempre estarão associadas com um risco aumentado para SIL^{27,32}.

No que se refere aos três resultados com diagnóstico de carcinoma poder-se-à concluir que, devido ao facto das lesões associadas a infecção HPV terem muitas vezes uma distribuição focal, houve por esse motivo omissão do seu diagnóstico histopatológico, ou que simplesmente a localização exacta destas lesões de carcinoma não havia sido visualizada no exame colposcópico inicial. A infecção HPV manteve-se no entanto para todas estas lesões com as mesmas características (HPV de alto risco), o que está de acordo com a gravidade e evolução das lesões de alto grau associadas a persistência da infecção HPV por tipos de HPV de alto risco.

3- Relativamente às doentes com diagnóstico de Carcinoma do colo (suspeito ou com evidência de invasão) (Quadro VII), verificámos que os resultados histopatológicos após terapêutica não revelaram carcinoma em nenhuma das peças operatórias, excepto para o adenocarcinoma do colo que se manteve o diagnóstico inicial. Os diagnósticos pós-operatórios dividiram-se entre ausência de lesão e lesões de alto grau. Todos estes resultados terapêuticos revelaram no entanto persistência de infecção HPV com os mesmos tipos de HPV de alto risco que haviam sido detectados e tipificados antes. O HPV 16 foi o tipo de vírus mais frequentemente encontrado (75%), o que está de acordo com a maioria dos estudos publicados. Ao contrário do que de alguma forma seria previsível, designadamente a nível do adenocarcinoma, não se detectou HPV 18 em nenhuma destas lesões. O HPV 18 é como foi referido antes, considerado o tipo de HPV mais agressivo, e por outro lado um dos tipos de alto risco mais frequentes a nível do adenocarcinoma do endocolo. Não será contudo indiferente para esta observação o número limitado de casos estudados.

A atitude clínica e terapêutica que foi utilizada é a normalmente aceite para este tipo de lesões. Embora não seja nas lesões de carcinoma que seja visível a sua maior utilidade, mas sim como valor preditivo exactamente nas lesões precursoras de cancro, a detecção e tipificação do ADN/HPV determinada nestes casos reforçou o carácter de risco dos diagnósticos histopatológicos propostos, e a conhecida alta incidência de tipos de HPV de alto risco em lesões de alto grau e carcinoma do colo.

No âmbito deste e de outros estudos publicados, a implicação dos resultados obtidos, apontam para o interesse cada vez maior, da detecção e tipificação da infecção HPV associada ao diagnóstico precoce de lesões intra-epiteliais do colo uterino, numa perspectiva

de uma mais ampla actuação ao nível da prevenção primária, até ao desenvolvimento de vacinas específicas para evitar a infecção HPV.

CITOLOGIA/HISTOLOGIA/PCR(DNA/HPV)

Os valores para falsos negativos encontrados no exame citológico estão dentro dos parâmetros referidos na literatura para falsos negativos do exame citológico (10-30%)

O número de falsos negativos da citologia, considerando todas as lesões (n=84) foi de 6 (7,1%), mas as percentagens variaram quando se avaliaram as lesões separadamente.

Na correlação estabelecida entre Citologia e Histologia iniciais (Quadro VIII), o valor de $K=0,52$ significa que o índice de comparação apresenta um valor intermédio de acordo, entre os dois exames.

Em relação ao problema dos falsos negativos para lesões de alto grau e cancro, o teste de detecção do ADN/HPV poderia significar um esclarecimento adicional em termos da avaliação do risco para cancro do colo associado a estas lesões. Na análise de dados que foi realizada nesta perspectiva, compararam-se os resultados relativos à detecção pela PCR do tipo de infecção HPV (determinado por grau de lesão histopatologicamente definida), com o diagnóstico citológico inicial.

Verificou-se que para os 11 falsos positivos da citologia nas lesões LSIL, 9 (81%) apresentavam infecção por tipos de HPV de baixo risco, e somente dois (18%) apresentavam HPV de alto risco. No grupo das lesões de alto grau HSIL, para os cinco falsos negativos da citologia, três (60%) apresentavam infecção por tipos de HPV de alto risco. Nas lesões de carcinoma verificou-se que o falso negativo da citologia, apresentava igualmente infecção por tipo de HPV de alto risco. Este falso negativo correspondia a lesão de adenocarcinoma do endocólio, o que está de acordo com o maior número de falsos negativos para estas lesões, no exame citológico.

Sendo interessantes de correlacionar, já que demonstram uma relação entre grau de lesão observada posteriormente e tipos de HPV detectados, estes valores não são contudo rigorosamente comparáveis, já que não poderemos assegurar que se encontrariam os mesmos resultados se a detecção e tipificação do ADN/HPV fosse realizada directamente nos esfregaços citológicos.

CONCLUSÕES

- A prevalência de infecção HPV para o total das lesões cervicais estudadas (LSIL; HSIL e Cancro) foi de

97.8%.

-Demonstrou-se um predomínio dos tipos de HPV de baixo risco (HPV6/11) nas lesões de baixo grau (LSIL) 83.3% e de tipos de HPV de alto risco (HPV16,18,31,33,51) entre lesões de alto grau (HSIL) 58.4% e carcinoma do colo 100%.

-Analisando os factores de risco para cancro do colo uterino (idade, menarca, idade de início de actividade sexual, número de parceiros sexuais, número de gestas, número de partos, métodos contraceptivos) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas, entre lesões de baixo e alto grau.

-A infecção HPV (baixo e alto risco) foi o único factor de risco considerado, que revelou uma diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) entre lesões cervicais de baixo e alto grau.

-Dos sub-tipos de HPV de alto risco, o HPV 16 foi o mais frequentemente detectado nas lesões cervicais de alto grau (31.3%) e carcinoma (71.4 %).

-A análise do acompanhamento clínico e terapêutico a que foram submetidas estas doentes revelou que de uma forma geral, existiu uma coincidência dos critérios clínicos adoptados com a detecção e tipificação do ADN/HPV realizada à *posteriori*.

No entanto a detecção e tipificação HPV realizada em simultâneo com o estudo histopatológico, ter-se-ia revelado importante:

-para as lesões de alto grau (HSIL), como reforço do carácter de risco dos diagnósticos histopatológicos, utilizando-o como método adjuvante no diagnóstico e orientação do tratamento, em especial para as que não foram submetidas a terapêuticas radicais.

-para as lesões de baixo grau (LSIL), como indicador de prognóstico quanto à possibilidade de regressão, persistência ou progressão destas lesões.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ernesto Fernandes e a Victor Rodrigues a colaboração dada no tratamento estatístico dos resultados obtidos. A Nuno Verdasca e Fátima Ribeiro (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa), João Rui Gama Mendes (Laboratório de Histopatologia do Centro de Oncologia, Coimbra) toda a colaboração prestada na execução técnico-laboratorial deste estudo.

BIBLIOGRAFIA

1. ZUR HAUSEN H: Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current Topics Microbiology Imunology* 1977; 78:1-30.

2. GISSMAN L, SCHNEIDER A: The role of human papillomaviruses in genital cancer. In: Hepes and papillomaviruses. Their role in carcinogenesis of the lower genital tract. Zur Hausen H, Palo G, Rilkes F, eds. New York : Raven Press 1986; 31: 15-25.
3. SCHNEIDER A, KOUTSKY LA: Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. Lyon: IARC 1992; 25-52
4. MELKERT P W J, HOPMAN E, VAN DEN BRULE A J C et al: Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993; 53: 919-3.
5. MEIJER C J L M, VAN DEN BRULE A J C, SNIJDERS P J F, HELMERHORST T, KENEMANS P, WALBOOMERS J M M: Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon: IARC 1992; 271-281
6. DE VILLIERS E M, WAGNER D, SCHNEIDER A, WESCH H, MUNOZ N, MIKAW H & ZUR HAUSEN H: Human papillomavirus DNA in woman without and with cytological abnormalities: results of five year follow up study. *Gynecol Oncol* 1992; 44: 33-9.
7. MUNOZ N, BOSCH F X, SANJOSÉ S et al: The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 743-9.
8. FISHER S G: Epidemiology: a tool for the study of human papillomavirus - related carcinogenesis. *Intervirolgy* 1994; 37: 215-25.
9. KOUTSKY L: Role of epidemiology in defining events that influence transmission and natural history of anogenital papillomavirus infections. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 978-9
10. SCHIFFMAN M H: Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 394-8
11. SCHNEIDER A: Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirolgy* 1994; 37: 201-14
12. BOSCH F X, MUNOZ N, SANJOSÉ S et al: Risk factors for cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 750-758.
13. LEY C, BAUER H M, REINGOLD A, SCHIFFMAN M H, CHAMBERS J C, TASHIRO C J, MANOS M M: Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst* 1991; No.14, 83: 997-1003.
14. MORRISON E A B, HO G Y F, VERMUND S T, GOLDBERG G L, KADISH A S, KELLEY K F, BURK D: Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 1991; 49: 6-13.
15. REEVES W C, BRINTON L A, GARCÍA M et al: Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *New Engl J Med* 1989; No.22, 320: 1437-41.
16. AZOCAR J, ABAD S M J, ACOSTA H et al: Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behaviour. *Int J Cancer* 1990; 45: 622-5.
17. FRANCO E L: Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *R.I.D.* 1991; 13: 1195-1206.
18. HERRINGTON C S: Human papillomaviruses and cervical neoplasia I. Classification, virology, pathology, and epidemiology. *J Clin Pathol* 1994; 47: 1066-1072.
19. VAN DEN BRULE A J C, SNIJDERS J F P, GORDIJN R L J, BLEKER O P, MEIJER C J L M, WALBOOMERS J M M: General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 45: 644-9.
20. CUZICK J, SZAREWSKI A, TERRY G J et al: Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995; 345: 1533-6.
21. SMITS H L, TIEBEN L M, TJONG-A-HUNG S P et al: Detection and typing of human papillomavirus present in fixed and stained archival cervical smears by a consensus polymerase chain reaction and direct sequence analysis allow the identification of a broad spectrum of human papillomavirus types. *J Gen Virol* 1992; 73: 3263-6.
22. ASK E, JENKINS A, KRIN J, TROPE C, KRISTIANSEN B E: Comparison of HPV detection in parallel biopsies and cervical scrapes by PCR. *APMIS* 1992; 100: 752-6.
23. KIENE P, MILDE-LANGOSCH K, RUNKEL M, SCHULZ K, LONING T: A Simple and rapid technique to process formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for the detection of viruses by the polymerase chain reaction. *Virchows Arch. A Pathol Anat Histopathol* 1992; 429: 269-273.
24. WALBOOMERS J M M, HUSMAN A M R, VAN DEN BRULE A J C, SNIJDERS P J F, MEIJER C J L M: Detection of genital human papillomavirus infections: critical review of methods and prevalence studies in relation to cervical cancer. "Human Papillomaviruses and Cervical Cancer". Editor: Stern P, Oxford University Press 1994; 3: 41-71.
25. CORNELISSEN M T E, BOTS T, BRI M A et al: Detection of human papillomavirus types by the polymerase chain reaction and the differentiation between high-risk and low-risk cervical lesions. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 1992; 62: 167-171.
26. MARGALL N, MATIAS-GUIU X, CHILLON M et al: Detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA in epithelial of the lower genital tract by in situ hybridization and polymerase chain reaction; cervical scrapes are not substitutes for biopsies. *J Clin Microbiol* 1993; No.4, 31: 924-930.
27. NUOVO G J, MORITZ J, WALSH L L, MACCONNELL P, KOULOS J: Predictive value of human papillomavirus DNA detection by filter hybridization and polymerase chain reaction in women with negative results of colposcopic examination. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 489-492.
28. SCHIFFMAN M H, KIVIAT N B, BURK R D et al: Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 545-550.
29. KURZ J, MIRA K, ADAM R, MIAU X et al: PCR Detection and Typing of Genital Papillomavirus in a New Brunswick Population. *Int J Cancer* 1993; 55: 604-8.
30. ARENDS M J, Editorial : Identification of HPV: in situ hybridisation or polymerase chain reaction?. *J Clin Pathol* 1991; 164: 191-3.
31. RICHART R M, WRIGHT T C: Controversies in the management of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1993; 71: 1413-21.
32. CUZICK J, TERRY G, HO L, HOLLINGWORTH T & ANDERSON M: Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994; 69: 167-171.