

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

**PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO PAPILOMA
VÍRUS HUMANO DE ALTO-RISCO E DE LESÕES
ASSOCIADAS NO COLO UTERINO ATRAVÉS DA
CITOLOGIA CONVENCIONAL E DO MÉTODO DE
CAPTURA HÍBRIDA DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Estudo de prevalência em mulheres adultas na cidade de Campo
Bom, Estado do Rio Grande do Sul**

Nome do Autor: Paula Raffin Pohlmann

Orientação: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Co-Orientação: Prof. Dra. Bernadete Nonnenmacher

Prof. Dra. Mary Clarisse Bozzetti

TESE DE DOUTORADO

2002

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	6
INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DA LITERATURA	11
OBJETIVOS	41
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	42
ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	62
VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO	85
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	106
ANEXO I – Consentimento livre e esclarecido	108
ANEXO II – Declaração de Helsinque	111

AGRADECIMENTOS

A todas as mulheres que concordaram em participar deste estudo.

À Liga Feminina de Combate ao Câncer de Campo Bom por todo seu apoio.

À Digene de São Paulo.

Ao Dr. Cláudio G. Zettler pela citologia e pela patologia.

A todos os colegas que contribuíram na coleta dos dados.

À Jiseh, Andréia e Angela, cujo apoio foi crítico para a conclusão deste trabalho.

Aos meus orientadores, por toda sua confiança.

À minha família.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACS – *American Cancer Society* – Sociedade Americana de Cancerologia
- AJCC – *American Joint Committee on Cancer* – Comitê Conjunto do Câncer Americano
- ASCUS - *atypical squamous cells of undetermined significance* – atipias de células escamosas de significado incerto.
- AGUS - *atypical glandular cells of undetermined significance* - células glandulares de significado indeterminado.
- CH2 - captura híbrida de segunda geração
- CP - exame citopatológico de células esfoliadas da cérvix uterina
- DNA – *desoxiribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico – ADN
- E6AP - *E6-associated protein* (proteína associada à E6)
- FIGO – *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique* – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
- FDA - *Food and Drug Administration* – órgão governamental regulador de alimentos, medicamentos e testagens diagnósticas nos Estados Unidos.
- HPV – *human papillomavirus* - vírus do papiloma humano
- HSIL - *high-grade squamous intraepithelial lesion* - lesão intraepitelial escamosa de alto grau
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- LEEP - *loop electrosurgical excision procedure* - cirurgia de alta frequência

- LSIL - *low-grade squamous intraepithelial lesion* - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
- NCI - National Cancer Institute – Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
- NIC - Neoplasia intraepitelial cervical
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- RLU - *Relative Light Unit* - Unidade Relativa de Luminescência
- RNA - *ribonucleic acid* - ácido ribonucleico – ARN
- mRNA - *messenger ribonucleic acid* - ácido ribonucleico mensageiro – mARN

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Neoplasia maligna do colo do útero. Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2001, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero).....	15
Figura 2 - Distribuição por estádios clínicos dos casos de câncer do colo uterino atendidos no Hospital do Câncer do INCA, em 1993.....	16
Figura 3 - Etapas do processo de detecção do DNA do HPV por captura híbrida de segunda geração (CH2)	30

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres, sendo superado somente pelo câncer de mama [1,2]. Ele também é o mais prevenível de todos os cânceres [3,4]. Vários fatores foram associados ao desenvolvimento de câncer de colo uterino, tais como posição sócio-econômica desfavorável, tabagismo, promiscuidade sexual e infecções genitais.

A associação de infecção por tipos oncogênicos de papilomavírus humano (HPV) com o desenvolvimento de câncer cervical está muito bem documentada [5,6,7,8]. O ácido desoxirribonucleico (DNA) do HPV é encontrado em 99,7% dos cânceres cervicais [8].

No caso específico do câncer de colo de útero, o processo de desenvolvimento até um tumor invasor segue uma seqüência longa e gradativa de transformações. O período pré-maligno, no qual algumas alterações já podem ser detectadas clinicamente, pode durar até cerca de 10 anos [9,10,11].

Este longo período entre o surgimento de lesões precursoras detectáveis e o desenvolvimento de carcinomas invasores faz com que estas lesões sejam passíveis de detecção através de programas de rastreio. Empregando-se métodos diagnósticos eficazes, as lesões precursoras identificadas podem ser tratadas a tempo.

De fato, nas últimas décadas, a investigação do câncer de colo uterino através de programas de rastreamento, tem tido um reflexo importante sobre a incidência de câncer cervical invasor. Entretanto, embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países do mundo a introduzir o rastreio através de exame citopatológico para a detecção precoce do câncer do colo uterino, esta doença continua a ser entre nós

um sério problema de saúde pública. Estima-se que apenas 30% das mulheres submetem-se ao exame citopatológico pelo menos três vezes na vida, o que contribui significativamente para que o diagnóstico seja feito já em fase avançada da doença em cerca de 70% dos casos [12,13]. A verdade é que mesmo cerca de 40 anos depois dos primeiros relatos de impacto populacional favorável sobre a mortalidade através do rastreio, ainda não foi possível eliminar os problemas relacionados à cobertura populacional, à natureza subjetiva do teste e à qualidade da amostra obtida para exame.

Os programas nacionais para triagem de câncer cervical permanecem ainda hoje com problemas importantes. Estes incluem, na população coberta pelo teste, por um lado, os testes falso-positivos, que levam à execução excessiva de exames colposcópicos e de tratamentos desnecessários; e, por outro, o subdiagnóstico. A taxa de subdiagnósticos pode alcançar 25 a 50% dos casos de pacientes portadoras de lesões cervicais pré-malignas em países em desenvolvimento [14].

Vários motivos são apontados para a falha no rastreio da doença. Entre os principais está a falta de informação da população com conseqüente falta de procura pelo teste. Além disso, os resultados falso-negativos decorrentes de problemas na coleta e na fixação do material, e da subjetividade do citologista também são apontados com veemência. Em determinadas regiões podem haver dificuldades adicionais relativas ao tratamento e seguimento dos casos identificados.

Cabe mencionar que a acessibilidade anatômica do colo uterino para a realização de exame clínico representa uma oportunidade ímpar na avaliação da doença e da resposta às intervenções terapêuticas. Os métodos rotineiramente empregados na remoção de lesões cervicais pré-malignas incluem os tratamentos destrutivos locais, como a vaporização com laser [15] e a crioterapia [16], e os

tratamentos excisionais. Estes últimos têm a vantagem de fornecer material para a confirmação histológica da lesão e de suas margens. Compreendem: (1) a conização a frio ou com bisturi, (2) a ressecção por cirurgia de alta frequência (CAF), que usa alças de LEEP (*loop electrosurgical excision procedure*) [17,18]; e (3) a histerectomia.

As estratégias que combinam diagnóstico e tratamento, como a ressecção por CAF, podem ser apropriadas, especialmente em casos cujo seguimento seja problemático [19]. Na CAF a alça de LEEP faz uma biópsia excisional, retirando toda a lesão, enviando uma peça adequada ao patologista, ao mesmo tempo em que trata a lesão, eliminando-a.

Um estudo realizado por Soutter e colaboradores [20] comparou os resultados do tratamento conservador das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) em quatro centros independentes de tratamento na Inglaterra. O objetivo era identificar a taxa de desenvolvimento de invasão nas pacientes tratadas, assim como a duração do risco aumentado para o surgimento de doença invasora. Foi demonstrado que o tratamento conservador das NIC reduz o risco de desenvolvimento de câncer invasor de colo uterino em 95% durante os primeiros 8 anos de tratamento. Entretanto, mesmo com a observação cuidadosa e prolongada, o risco de desenvolvimento de câncer invasor entre estas pacientes foi cerca de 5 vezes maior do que o encontrado para a população em geral durante o mesmo período. Os autores concluíram que um seguimento cuidadoso seria essencial por pelo menos 10 anos após o tratamento conservador de NIC.

A histerectomia total, por via abdominal ou por via vaginal é considerada aceitável para pacientes pós-menopausadas. Está indicada especialmente quando o processo neoplásico compromete tecidos que estão além das margens do cone.

Para pacientes cuja cirurgia está contraindicada por motivos clínicos, braquiterapia com 8000cGy também pode ser utilizada [21]. Quando o diagnóstico for de carcinoma invasor, as opções de tratamento são histerectomia radical com linfadenectomia pélvica [22], quimioterapia e radioterapia [23,24,25], ou combinações destas estratégias terapêuticas [26,27,28,29]. A escolha do tratamento depende da avaliação do estadiamento, do tipo histológico da doença e das condições clínicas da paciente.

Se adequadamente tratado, o controle do carcinoma *in situ* deve ficar próximo de 100%. Tanto uma colposcopia com biópsia dirigida, quanto uma conização diagnóstica, que eventualmente é terapêutica, podem ser necessárias para excluir doença invasora antes que qualquer tratamento mais agressivo seja feito. Também é importante correlacionar os resultados do exame citológico com os da biópsia dirigida pela colposcopia para planejar o tratamento definitivo. Mesmo assim, caso haja doença invasora que não tenha sido identificada, um tratamento inadequado pode se transformar na maior causa de falha terapêutica [30].

É sabido que as possibilidades de sobrevida para as pacientes portadoras de carcinoma de colo uterino invasor dependem muito do seu estadiamento ao diagnóstico. Assim, em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, quando o diagnóstico é feito em estádios avançados do câncer, as pacientes podem acabar tendo um prognóstico desastroso. Existe, portanto, um grande esforço mundial em aumentar a eficácia das medidas de prevenção e diagnóstico precoce.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico do rastreio:

A detecção da doença pré-maligna do colo uterino é atualmente feita através do exame de Papanicolaou, também conhecido por citopatológico (CP) de células esfoliadas da cérvix uterina. Por volta dos anos 60 foram desenvolvidos os primeiros programas populacionais de rastreio de lesões iniciais para câncer de colo uterino empregando-se este exame [31]. Através dele é possível efetuar o rastreio de lesões displásicas e malignas iniciais, cujo tratamento reduz comprovadamente a incidência das lesões invasoras. A consequência desta redução na incidência de lesões invasoras é uma subsequente diminuição significativa da mortalidade relacionada ao câncer de colo uterino [32].

Deste então, com a implementação dos programas de rastreamento em massa, as taxas de mortalidade por câncer de colo do útero sofreram uma redução de 20 a 60% [33,34,35,36]. Estudos de caso-controle evidenciaram uma forte associação negativa entre o rastreamento e o câncer invasor, também sugerindo que o rastreamento se constitui em fator protetor [33,37,38,39,40]. O teste de Papanicolaou destaca-se devido à sua eficácia na detecção de lesões pré-malignas e carcinoma *in situ*, à sua facilidade de emprego e ao baixo custo [41].

2.2. Diagnóstico de lesão pré-maligna ou maligna inicial

A *American Cancer Society* (ACS) dos Estados Unidos recomenda que o exame Papanicolaou e o exame clínico pélvico sejam realizados anualmente em

mulheres que já tenham iniciado atividade sexual, ou que tenham atingido a idade de 18 anos. Após três exames anuais consecutivos negativos, o exame preventivo pode ser realizado menos freqüentemente. Não há limite superior de idade para a realização do exame [42,43,44].

As alterações detectáveis com o teste de Papanicolaou são relativas à morfologia e à coloração das células esfoliadas obtidas a partir do colo uterino. O coilocito é a célula que se apresenta com clareamento perinuclear e anormalidades na forma do núcleo. Esta célula é diagnóstica de infecção por HPV.

A descrição dos achados citológicos foi padronizada em uma reunião de consenso realizada em dezembro de 1988 nos Estados Unidos [45], quando foi criado o Sistema de Bethesda de descrição dos achados citopatológicos. Os termos citológicos lesão epitelial escamosa de baixo grau ou de alto grau (*low- and high-grade squamous intraepithelial lesions* - LSIL e HSIL), correlacionam-se com os diagnósticos histopatológicos de NIC1, e NIC2 ou 3, respectivamente. As anormalidades que não preenchem os critérios para lesão epitelial escamosa (SIL - *squamous intraepithelial lesions*) são denominadas atipias de células escamosas de significado incerto (*atypical squamous cells of undetermined significance* - ASCUS). Os esfregaços que apresentam achados persistentes de atipias devem ser avaliados com colposcopia [46,47].

A recomendação de repetição periódica do exame Papanicolaou (a cada 3 anos, após 3 anos consecutivos de resultados normais) baseia-se no fato de que um resultado falso-negativo tem sempre novas oportunidades de ser revisto nos testes subseqüentes, momento no qual o tratamento pode ser efetuado com iguais chances de sucesso [48]. Para mulheres idosas cuja citologia é negativa, o esquema ótimo de repetição do teste não está estabelecido.

Em um estudo realizado com uma população de mulheres pós-menopausadas, a incidência de leituras anormais no primeiro ou segundo ano após um exame normal foi baixa. Entre 110 mulheres com achados anormais, mais freqüentemente atipias escamosas de significado incerto (ASCUS), um seguimento adicional de 2 anos revelou apenas 3 lesões potencialmente importantes (uma NIC grau 1 a 2, uma neoplasia intraepitelial vaginal grau 3 e uma hiperplasia uterina sem atipias) [49]. Como o valor preditivo positivo da citologia para diagnósticos potencialmente importantes em doença cervical foi baixo neste estudo (0,0% no primeiro ano após um CP normal e 0,9% no segundo ano), os investigadores concluíram que esfregaços cervicais em mulheres pós-menopausadas não deveriam ser repetidos antes de 2 anos após um resultado normal, devido às conseqüências desnecessárias de eventuais resultados falso-positivos.

Apesar de os esfregaços vaginais serem freqüentemente feitos para seguimento de mulheres que realizaram histerectomia devido à doença maligna, um estudo retrospectivo sugeriu pouco ou nenhum benefício em realizar rastreio vaginal de rotina em mulheres submetidas a histerectomia motivada por doenças benignas [50]. Os pesquisadores encontraram uma prevalência baixa de displasia vaginal (0,1%) e uma taxa alta de falsos-positivos para esfregaços vaginais no grupo de pacientes que se submeteram a histerectomia por lesões benignas.

2.3. Dificuldades na utilização do rastreio

Para o ano 2001, o Ministério da Saúde estimou que, em todo o Brasil, terão sido registrados 305.330 casos novos de câncer. A análise por sexo mostra que as maiores taxas de incidência entre mulheres decorrem das neoplasias malignas de

mama (36,4/100.000), pele não-melanoma (30,9/100.000), colo do útero (18,8/100.000) e cólon e reto (9,6/100.000) [51,52]. O câncer de colo de útero representa cerca de 15% de todos os tumores malignos em mulheres no nosso país [53].

Infelizmente, ao contrário do que ocorre nos países mais desenvolvidos, as taxas de mortalidade por câncer do colo do útero continuam elevadas em todo Brasil e, do ponto de vista temporal, seguem tendência ascendente: em 1979, a taxa era de 3,4/100.000, enquanto em 1998 era de 4,4/100.000. Os números de óbitos e casos novos esperados para o ano 2001 em todo o país são, respectivamente, 3.725 e 16.270. Estes números correspondem às taxas brutas de mortalidade e incidência esperadas de 4,3/100.000 e 18,8/100.000, respectivamente [51,52,54]. Já nos Estados Unidos, para o ano de 1999, eram esperados 12.800 casos novos de câncer de colo uterino invasor, com um coeficiente bruto de incidência de 8/100.000 mulheres. A figura 1 mostra a representação espacial das taxas de incidência de câncer de colo uterino por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2001, por estados do Brasil [53].

No Rio Grande do Sul, até o final dos anos 80, a mortalidade por câncer de colo uterino ainda seguia uma tendência claramente ascendente [55]. Para o ano 2000, foram estimados uma incidência de 23,5 e uma mortalidade de 6,9 por 100.000 mulheres (coeficientes brutos). Em 1997, a taxa era de 4,2/100.000 [53,56].

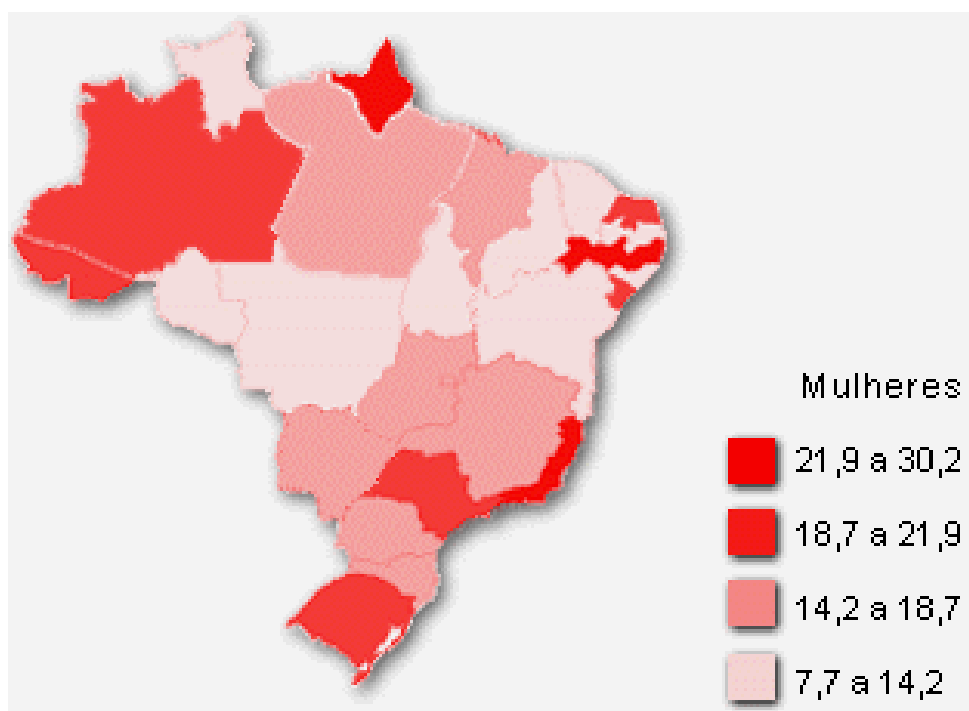


Figura 1: Neoplasia maligna do colo do útero. Representação espacial das taxas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2001, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero). Fonte: Ministério da Saúde, com permissão [53].

Mesmo que os meios de prevenir os tumores invasores sejam conhecidos, infelizmente em vários países como o Brasil ainda é necessário atender a inúmeras pacientes que já se apresentam com tumores invasores. Muitas vezes estes tumores já estão tão avançados que prejudicam significativamente as possibilidades curativas para as pacientes. A figura 2 mostra a distribuição por estádios clínicos dos casos de câncer de colo uterino que foram atendidos no Hospital do Câncer do INCA, em 1993. A exemplo do que ocorria naquele hospital, todo o país tem se defrontado diariamente com uma alta frequência de diagnósticos em estádios avançados.

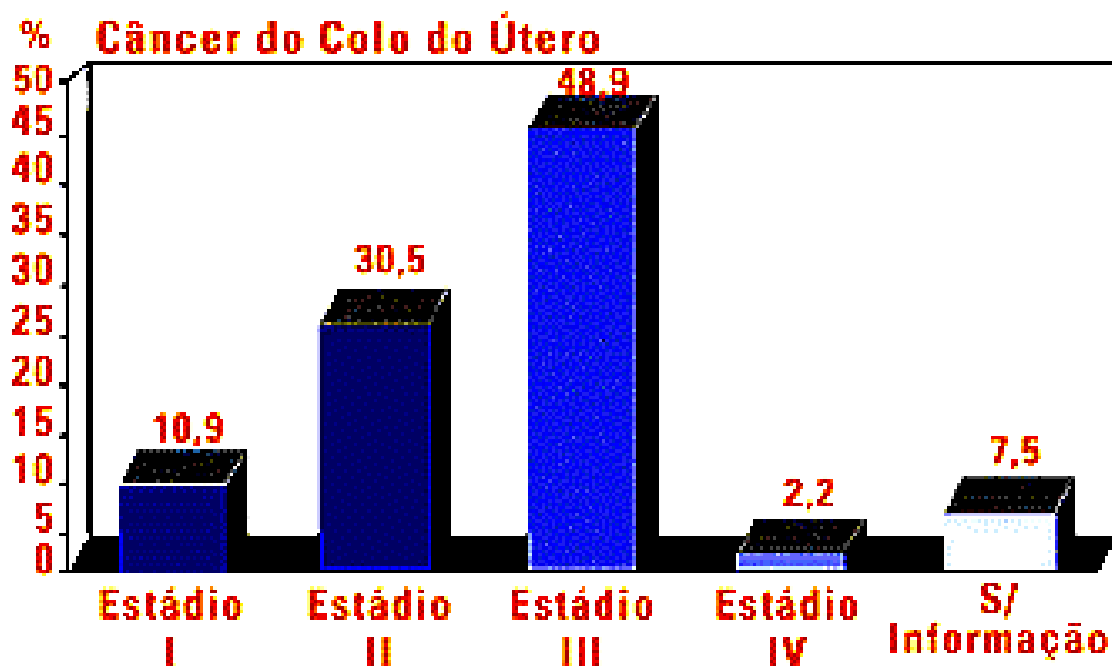


Figura 2: Distribuição por estádios clínicos dos casos de câncer do colo uterino atendidos no Hospital do Câncer do INCA, em 1993. Fonte: Ministério da Saúde, com permissão [57].

2.4. Exame de Papanicolaou (CP)

Em outubro de 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) manifestou-se na sede das Nações Unidas relatando que há grande preocupação em relação ao controle do câncer de colo uterino em países em desenvolvimento. Foi destacado que embora vários países da Ásia e da América Latina tenham introduzido o rastreamento em sua política de saúde pública há mais de 30 anos, o sucesso da medida em controlar o câncer cervical tem sido muito limitado. Além das falhas de cobertura pelo teste, foi levantado que o rastreamento por citologia estivesse sendo feito de forma inadequada. Na mesma ocasião, foi relatado que, nos países desenvolvidos, a

incidência e a mortalidade por esta doença diminuíram substancialmente graças à eficiência dos programas de rastreio envolvendo o CP de colo uterino, que pode detectar as lesões pré-malignas e malignas iniciais.

As informações sobre a sensibilidade e especificidade do CP para a detecção de câncer e displasia, que estão disponíveis na literatura, variam em decorrência de determinantes metodológicas do estudo em questão. Dependendo do delineamento empregado, as taxas de resultados falso-negativos podem variar de 1 a 80%. Uma média de 20 a 45% tem sido demonstrada mais frequentemente em estudos que compararam resultados normais com o resultado de exames realizados subsequentemente [35,58,59,60,61]. Os estudos que utilizaram a biópsia por conização como o padrão-ouro evidenciaram taxas de resultados falso-negativos de até 10% [62].

Uma grande proporção de erros diagnósticos pode ser atribuída a falhas de laboratório. Yobs e colaboradores [63], em um estudo que incluiu mais de 300 clínicas, utilizando lâminas com diagnóstico citológico bem estabelecido, verificaram que resultados falso-negativos ocorreram em 7,5% dos casos de displasia moderada ou malignidade franca, enquanto diagnósticos falso-positivos foram feitos em 8,9% dos casos de atipia benigna ou outras alterações menos significativas.

Uma possível causa para diagnósticos citológicos falso-negativos é a má técnica de coleta do material para o esfregaço. Davey e colaboradores [64] publicaram, em 1992, um estudo de 600 laboratórios que encontrou que 1 a 5% do material recebido para exame citopatológico era insatisfatório ou sub-ótimo, usualmente devido à ausência de células endocervicais na lâmina. Em outro estudo, Dodd e colaboradores [65], em 1993, evidenciaram que 64% dos resultados falso-negativos eram consequência da má técnica de coleta. Somente cerca da metade

dos clínicos norte-americanos utiliza, para a coleta do exame de Papanicolaou, espátula para obter material da ectocérvice e suabe de algodão para amostra de células endocervicais [66].

A taxa de falha do CP em diagnosticar tumores invasivos pode chegar a 50%. Por isso é importante enfatizar a necessidade de biópsia de qualquer lesão cervical visível, mesmo que associada a um CP considerado normal [67].

Uma das dificuldades mais importantes para o controle desta doença no Brasil parece ser a cobertura insuficiente pelo exame preventivo. Estima-se que haja no Brasil cerca de 40.000.000 de mulheres em idade para rastreio. As dificuldades de cobertura populacional pelo teste estão presentes em qualquer lugar, sendo obviamente maiores nos países em desenvolvimento.

Existem inúmeras razões que fazem com que certas mulheres resistam às campanhas preventivas. Algumas mulheres preferem não se submeter periodicamente ao rastreio, mesmo que ele esteja absolutamente disponível, conforme mostrou estudo realizado nos Estados Unidos recentemente [68]. A idéia de detectar uma doença considerada letal tanto fisicamente quanto socialmente pode ser um problema importante. Há mulheres que preferem esperar por sintomas, tais como sangramento ou dor.

Em determinadas situações, devido às condições envolvidas no momento de uma coleta, certas mulheres podem ficar traumatizadas, o que representa uma barreira muito importante para a realização de futuras coletas. O ambiente ideal para coleta do material para rastreio deve ser acessível. A técnica de coleta deve ser confortável e adequada para as mulheres que vão ser rastreadas. Também deve assegurar privacidade, respeito e a natureza confidencial do exame.

Um esforço extraordinário pode vir a ser necessário para rastrear mulheres de mais idade que não tenham sido examinadas. Em países desenvolvidos, mais de 25% dos casos de câncer ocorrem em mulheres de mais de 65 anos e cerca de 40% de todos os óbitos causados por esta doença atingem a faixa etária que está acima dos 65 anos [69]. Uma proporção significativa de mulheres, especialmente as idosas de posições sócio-econômicas menos favorecidas nunca realizaram um exame preventivo citológico [70]. Em algumas regiões, cerca de 75% das mulheres acima de 65 anos não realizaram rastreio com citologia nos últimos 5 anos [71]. Estes achados salientam a importância de realizar esforços especiais para alcançar estas mulheres que não se submetem ao rastreio regularmente.

Existem efeitos adversos importantes associados à falta de acurácia de interpretação do CP. Resultados falso-negativos são significativos por permitirem que neoplasias intra-epiteliais cervicais ou lesões mais avançadas não sejam detectadas e progridam para lesões mais graves no intervalo entre os exames. Por outro lado, os efeitos adversos potenciais dos resultados falso-positivos incluem a geração de ansiedade para a paciente em relação ao risco de desenvolver câncer [72,73], bem como a realização de procedimentos diagnósticos complementares ou de controle desnecessários, inconvenientes, desconfortáveis e caros. Alguns estudos têm demonstrado que a distribuição de material educativo que explique às pacientes o significado de resultados anormais podem reduzir a ansiedade e permitir uma melhor compreensão do relatório do CP [63,74].

Segundo publicação da Organização Mundial da Saúde [75], a citologia cervical é aceita como um teste bastante específico para lesões pré-malignas de alto grau ou câncer. Entretanto, mesmo que a qualidade da coleta e do esfregaço, da fixação e da coloração do CP sejam boas, e que o resultado seja descrito por técnicos bem

treinados e por citopatologistas experientes, a sensibilidade do teste é considerada apenas moderada. Os resultados de duas meta-análises realizadas para esclarecer as questões referentes à acurácia da citologia em detectar câncer cervical e suas lesões precursoras sugerem que o rastreio pela citologia seja um teste de sensibilidade muito variável para detectar estas lesões [76,77].

Uma destas meta-análises, realizada na Austrália [76], estimou que a citologia teria uma sensibilidade mediana de 58% e uma especificidade mediana de 69%. A outra meta-análise, realizada nos Estados Unidos [77], demonstrou que a sensibilidade do CP convencional para lesões de alto risco varia muito comparando-se cada um dos diferentes estudos avaliados. Esta variação foi descrita como sendo de 30 a 87%, com uma média de 47%. Tanto erros na coleta quanto na leitura dos exames devem contribuir para estes achados quanto à sensibilidade da citologia.

Assumindo que a citologia seja apenas moderadamente sensível, o declínio no risco de câncer invasor observado nos países desenvolvidos pode ter ocorrido em decorrência de uma frequência de rastreio suficientemente alta [75]. A neoplasia cervical é uma doença de progressão lenta na maioria das vezes. E muitas lesões intra-epiteliais de baixo grau regridem espontaneamente ou permanecem estáveis, sem progredir. As lesões de alto grau que deixam de ser detectadas em uma oportunidade em que o rastreio seja feito será provavelmente detectada em um momento subsequente, caso haja um programa de rastreio que assegure a repetição freqüente da citologia.

Devido a todas estas dificuldades previamente levantadas, a idéia de desenvolver um método que possa atingir níveis aceitáveis de sensibilidade e especificidade diagnóstica, idealmente em um único ponto temporal, parece bastante sensato. A própria OMS sugere que as doenças sexualmente transmissíveis tenham

um algoritmo clínico simples, baseado em testes diagnósticos que possam idealmente ser realizados em uma única visita [78].

2.5. O vírus do papiloma humano - HPV

Há muitos anos os estudos epidemiológicos que avaliavam os fatores de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais pré-malignas e malignas concluíram que havia uma transmissão de carcinógeno por contato sexual [47]. Os avanços em virologia e na pesquisa epidemiológica têm contribuído para o reconhecimento da importância clínica da infecção genital pelo HPV no surgimento do câncer de colo uterino.

Hoje em dia é aceito que o HPV (especialmente HPV tipos 16, 18, 31 e 45) seja o agente etiológico infeccioso primário do câncer de colo uterino [2,79,80,81]. Um estudo multicêntrico revisou amostras de câncer de colo uterino em busca do DNA do HPV, chegando à conclusão de que este vírus estava presente em 99,7% das amostras [8], sendo portanto, considerado agente causal da doença.

Historicamente, os HPVs tipos 16 e 18 eram encarados como vírus de alto risco para o desenvolvimento de câncer, enquanto os HPVs tipos 6 e 11, os de baixo risco [82]. Subseqüentemente, os HPVs tipos 31, 33 e 35 também foram associados a um risco intermediário para câncer [83,84,85,86]. Estes tipos de HPV são responsáveis por apenas 70% das neoplasias cervicais [82,84,87]. Outros tipos de HPV, incluindo 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58 e 68, foram implicados como principais agentes detectados nas lesões de alto risco remanecentes [82,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97].

Os HPV podem ser categorizados como sendo grupos de risco baixo, intermediário e alto, baseado na sua distribuição relativa nas várias categorias de diagnósticos histológicos [5,88,94,95,96,97,98].

Um estudo realizado com 1518 mulheres [6] mostrou que o DNA de subtipos oncogênicos de HPV, denominados de alto risco, pode ser detectado através da técnica da captura híbrida em todos os casos de câncer invasor e na maior parte das lesões de alto risco (97,1%).

Mais de 100 tipos diferentes de HPV já foram reconhecidos, sendo cerca de 35 tipos encontrados no trato genital. Há estudos sugerindo que a infecção aguda pelos subtipos 16 e 18 de HPV possa conferir um risco adicional de desenvolvimento rápido para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau que pode variar de 11 a 16,9 vezes [79,99].

A infecção pelo HPV é uma doença sexualmente transmissível muito comum. A maior parte das infecções, incluindo aquelas com anormalidades citológicas, resolvem-se espontaneamente, tornando a pesquisa do DNA do HPV novamente negativa (freqüentemente com soropositividade) [100,101].

Assim, a grande maioria das infecções por HPV são causadas por subtipos não oncogênicos, tais como o 6 e o 11. Estas infecções não evoluem para câncer. Mesmo quando houver infecção por um subtipo de HPV oncogênico, em 70 a 80% dos casos a infecção é transitória, sem o desenvolvimento de uma neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Esta infecção costuma ser eliminada em 6 a 8 meses [14].

Vários estudos prospectivos demonstraram que uma infecção persistente por HPV de alto risco precede a manifestação das NICs (a lesão precursora para o câncer de colo uterino). A persistência desta infecção é necessária para o

desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões precursoras [14,102]. Somente 5% das pacientes infectadas por HPV oncogênicos evoluirão para o desenvolvimento de um câncer invasor. A infecção por HPV é portanto, muito mais comum do que o câncer de colo uterino.

O DNA do HPV foi identificado em cerca de 10% das mulheres com epitélio cervical normal. A prevalência do vírus em determinados grupos de mulheres pode sofrer grande influência da faixa etária ou de outras variáveis demográficas [5,82,103].

Ao contrário do que ocorre com outros tipos de vírus, no caso do HPV não é possível distinguir o tipo de HPV implicado com cada infecção com base em testes sorológicos, porque os anti-soros não estão disponíveis. Como consequência, os vírus têm sido tipados por hibridização de DNA. Os vírus que diferem entre si por mais de 50% de homologia de DNA em condições estritas de testagem são considerados tipos diferentes [104].

O HPV é composto de uma partícula viral icosaédrica (vírion), contendo 8000 pares de bases em fita dupla de DNA circular, circundadas pelo capsídeo proteico. Logo após a infecção das células epiteliais, o DNA viral se estabelece em toda espessura do epitélio. Porém, vírions intactos são encontrados somente nas camadas mais superficiais do tecido. Até o presente momento não é possível manter culturas *in vitro* de HPV.

O HPV tem um tropismo especial por células epiteliais escamosas (queratinócitos). O funcionamento de suas atividades necessárias para a produção de vírions infecciosos ocorrem somente no epitélio escamoso completamente diferenciado. A síntese de proteínas do capsídeo viral e a montagem dos vírions

ocorre somente nas células diferenciadas terminalmente das camadas mais superficiais do epitélio.

O genoma viral está presente nas células epiteliais de todas as camadas do epitélio, incluindo a camada basal. Normalmente, num epitélio escamoso, conforme as células migram em direção à superfície através das diferentes camadas, elas obedecem a uma diferenciação programada. O controle da expressão genética do HPV está intimamente relacionado ao estado de diferenciação das células epiteliais. Mas as bases deste controle não estão completamente esclarecidas.

Todos os HPV exibem uma organização genômica similar. Os genes localizados na região chamada “precoce” (*early*) do genoma são designados como *E1*, *E2* e assim por diante. Os genes localizados na região “tardia” (*late*) são denominados *L1* e *L2* [105]. Na fase produtiva do vírus, o mRNA viral é transcrito a partir das regiões “precoces” e “tardias” do genoma. O gene *L1* é responsável por codificar a proteína principal do capsídeo, enquanto o *L2* é responsável pela proteína menor. A fase não produtiva do ciclo infeccioso que ocorre nas camadas mais basais do epitélio é acompanhada da transcrição exclusiva da parte “precoce” do genoma [106]. A expressão concomitante dos genes *E6* e *E7* é suficiente para provocar a imortalização de células humanas, especialmente queratinócitos, que são o hospedeiro natural do HPV [107,108].

Em tumores onde o DNA do HPV foi detectado, verifica-se que há uma integração randômica do DNA viral ao humano. Em alguns casos o DNA viral está integrado na vizinhança de oncogenes conhecidos, tais como o locus do *c-myc* no cromossoma 8, mas isto não é a regra [109]. É interessante observar que os genes *E6* e *E7* costumam estar integrados ao DNA humano nas amostras de tumores estudadas, estando invariavelmente expressos [110].

A integração do genoma viral ao humano em geral provoca danos nos genes *E1* e *E2*. O HPV *E2* é um fator regulatório viral que, no caso do HPV 16 e 18 regula negativamente a expressão dos genes *E6* e *E7*. Várias observações embasam a noção de que a perda da expressão de *E2* nas células do câncer cervical seja um passo importante na carcinogênese associada ao HPV.

Entre estas observações está um estudo que demonstra que a introdução de *E2* nas células tumorais originadas do colo uterino *in vitro* resulta na parada do crescimento das linhagens celulares HPV-positivas, mas não das linhagens negativas para o vírus [111,112]. Esta parada no crescimento das células está relacionada à redução dos níveis de transcrição de *E6/E7* e acompanha-se de um aumento nos níveis de p53 e do inibidor de quinase dependente de ciclinas p21 [113]. Em contraste com as propriedades imortalizadoras das proteínas *E6* e *E7* dos HPV de alto risco (HPV 16 e 18), as proteínas *E6* e *E7* dos HPV de baixo risco costumam ser inativas ou apenas fracamente ativas nos mesmos experimentos.

As proteínas *E7* codificadas pelos HPVs de alto risco têm regiões que se ligam especificamente a inúmeras proteínas celulares regulatórias. Entre elas está o produto do gene supressor tumoral de retinoblastoma, pRB, e suas proteínas relacionadas, p107 e p130 [114]. A ligação destas oncoproteínas virais à pRB, p107 e p130 leva à proliferação celular através da ativação de genes que estão sob controle de fatores de transcrição. No ciclo infeccioso normal do HPV, a ligação de *E7* ao pRB é aparentemente essencial para a ativação da replicação de DNA para o ciclo celular em queratinócitos diferenciados, que de outra forma já teriam saído do ciclo celular.

Vírus DNA pequenos como o HPV dependem das polimerases e demais componentes celulares envolvidos com a replicação da célula hospedeira para

replicação de seu próprio genoma. Como estes componentes celulares só estão expressos durante a fase S do ciclo celular, estes vírus precisam estimular a proliferação celular e dirigir a célula para fase S. No caso do HPV, isto acontece através da ligação de E7 ao pRB.

As proteínas E6 dos HPV de alto risco podem formar um complexo com a p53 através de uma proteína celular chamada *E6-associated protein* (E6AP - proteína associada à E6) [115]. Isto resulta numa diminuição da meia vida da p53 em células infectadas pelos HPV de alto risco. Assim, a célula perde as propriedades repressoras da p53, perdendo portanto a capacidade de interromper o ciclo celular em resposta a danos provocados no DNA [116]. Isto resulta em aumento da instabilidade genômica celular e acúmulo de anormalidades de DNA nas células de HPV de alto risco que expressam E6. De fato, E6 pode ser diretamente implicada no estabelecimento e propagação da instabilidade genômica, uma marca na patologia da progressão maligna das lesões cervicais [117]. Além disso, a expressão das proteínas E6 dos HPV de alto risco resulta na ativação da atividade da telomerase em células infectadas [118].

Está claro que a infecção pelo HPV sozinha não é suficiente para desencadear a progressão carcinogênica. A expressão dos oncogenes *E6* e *E7* não é portanto suficiente para o desenvolvimento de câncer. O surgimento de câncer é um desfecho raro nas infecções, mesmo em pacientes com HPV de alto risco. Além do mais, o período de tempo que vai desde a infecção até o desenvolvimento de tumores invasores pode chegar a uma década. Estudos epidemiológicos têm sugerido que o tabagismo seja um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma de colo de útero [119]. Um dos principais fatores associados com as

propriedades carcinogênicas do HPV é o sinergismo observado entre eles, assim como com fatores carcinogênicos externos.

2.6. Esforços atuais na prevenção do câncer de colo uterino

Qualquer medida que resulte na diminuição da prevalência de infecção pelo HPV irá beneficiar mulheres em todo o mundo. Atualmente há uma série de estudos em vários centros de pesquisa buscando vacinas, tanto para prevenir, quanto para tratar o câncer de colo uterino já instalado.

Como o câncer de colo uterino está relacionado ao HPV, uma vacina voltada contra este vírus poderá ser efetiva para o tratamento da doença [120]. Algumas vacinas que são capazes de induzir a produção de anticorpos contra o HPV já estão em fase clínica de testes, os quais deverão gerar as respostas sobre sua eficácia e segurança, e então, poderão ser testadas em populações que se encontram sob alto risco de desenvolvimento de infecção por HPV [121]. Além disso, há uma busca constante por melhores resultados no que se refere ao tratamento de lesões precursoras, através de estudos clínicos com grande amostragem de pacientes que são acompanhadas por longos períodos de tempo.

Em 1999 foi realizado estudo que motivou a Tese de Doutorado da Dra. Bernardete Nonnenmacher [122], realizada em Porto Alegre. Este estudo teve como objetivos conhecer a resposta humoral ao HPV, as variáveis epidemiológicas relacionadas com a resposta sorológica e sua relação com o risco de lesões precursoras de neoplasia cervical. Observou-se que as mulheres que buscam livremente fazer a prevenção do câncer do colo uterino em nosso meio são, na sua maioria, mulheres não jovens, brancas, casadas, com dois ou mais filhos, com início

da vida sexual entre os 17 e 21 anos e com poucos parceiros sexuais ao longo de sua vida, ou seja, mulheres de baixo risco. A sorologia para o HPV demonstrou-se um marco de infecção pregressa e não atual, confirmando-se como um bom marcador de atividade sexual para uma determinada população. Observou-se também que não existe associação entre a positividade sorológica e risco de lesões intra-epiteliais cervicais.

2.7. Captura híbrida de segunda geração (CH2) – teste de DNA de HPV

A FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a pesquisa de DNA através da técnica de captura híbrida de segunda geração (CH2) para identificação dos diferentes tipos do HPV. Este teste pode identificar tipos oncogênicos do HPV tais como o 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, que estão freqüentemente relacionados à patogênese de HSIL e câncer. Outras cinco sondas detectam tipos de baixo risco, associados a LSIL: 6, 11, 42, 43 e 44.

A coleta do material para este exame é simples. Da mesma forma que a obtenção de material para o CP convencional, para coleta de células do colo do útero a ser realizada por profissional da saúde (médico ou enfermeira), a paciente é colocada em mesa ginecológica. Num exame ginecológico de rotina, a coleta do material para CH2 é feito antes da aplicação de ácido acético ou iodo.

A amostra é coletada com uma escova cervical (Digene Cervical Brush, Digene, Estados Unidos) e é colocada em um tubo que contém o meio adequado (Specimen Transport Medium – STM, Digene, Estados Unidos) para o seu transporte até o laboratório. A amostra coletada pode ser conservada no STM por até duas semanas em temperatura ambiente, sendo enviada ao laboratório sem necessidade de

refrigeração durante este prazo. O STM contém substâncias preservativas que retardam o crescimento bacteriano e conservam a integridade do DNA. Não há nenhuma intenção de preservar a viabilidade de organismos ou de células para realização deste exame. No laboratório as amostras devem ser conservadas a uma temperatura de 2 a 8°C, caso o teste venha a ser feito dentro de uma semana. Se o teste for realizado após uma semana, as amostras devem ser conservadas a uma temperatura de 20°C negativos.

A CH2 também pode ser realizada para exame de material proveniente de biópsias. Neste caso, o fragmento deve ter no máximo 5 mm de espessura. Imediatamente após a realização da biópsia, o fragmento deve ser colocado diretamente no STM e conservado congelado a menos 20°C. Os fragmentos conservados em STM podem ser transportados para o laboratório a uma temperatura de 2 a 30°C, por no máximo 12 horas, sendo conservados então a menos 20°C até a realização do teste. As biópsias menores que 2 mm de diâmetro não devem ser utilizadas para este teste.

A CH2 para a detecção do DNA do microrganismo em estudo, no caso HPV, consiste de cinco passos (figura 3): 1) desnaturação; 2) hibridização; 3) captura de híbridos; 4) reação dos híbridos com o conjugado; e 5) detecção dos híbridos por quimioluminescência [123,124]. Para realização do teste da CH2 no laboratório, uma alíquota da amostra congelada em STM é desnaturada para produzir DNA em fitas únicas. Estas fitas de DNA são expostas a sondas gênicas específicas para reconhecer os tipos de interesse de HPV.

Figura 3: Etapas do processo de detecção do DNA do HPV por captura híbrida de segunda geração.

	<p>1. Desnaturação dos ácidos nucleicos</p> <p>A amostra cervical é misturada a uma solução básica que rompe os vírus ou bactérias presentes, liberando o seu DNA, que é desnaturado. Não é necessária nenhuma preparação prévia do material.</p>
	<p>2. Hibridização das sondas RNA com o DNA do vírus ou bactéria</p> <p>O DNA do HPV combina-se com as sondas RNA específicas presentes no kit de testagem, criando híbridos de RNA/DNA.</p>
	<p>3. Captura de Híbridos</p> <p>Inúmeros híbridos de RNA/DNA são capturados por uma superfície sólida coberta de anticorpos específicos para captura universal de híbridos RNA/DNA.</p>
	<p>4. Reação dos híbridos com o conjugado</p> <p>Os híbridos RNA/DNA ligados são detectados por múltiplos anticorpos conjugados à fosfatase alcalina adicionados ao sistema. O sinal resultante pode ser amplificado em pelo menos 3000 vezes</p>
	<p>5. Detecção, leitura e interpretação dos resultados</p> <p>A fosfatase alcalina ligada é detectada através de um substrato dioxetano quimioluminescente. Através da clivagem pela fosfatase alcalina, o substrato produz luz que é então medida em um fotômetro em RLU (Relative Light Units).</p>

Reagindo com cada sonda gênica específica, o DNA do microrganismo eventualmente presente no material que está sendo analisado forma híbridos de RNA/DNA. Estes híbridos são então capturados por anticorpos que revestem as paredes dos tubos ou das placas de cultura. Estes anticorpos reconhecem híbridos DNA/RNA. A seguir, um segundo anticorpo ligado à fosfatase alcalina é adicionado ao sistema. Os híbridos imobilizados pelos anticorpos primários reagem com os anticorpos secundários (conjugados à fosfatase alcalina), formando um substrato estável. Quando este substrato é clivado pela fosfatase alcalina ligada, ocorre emissão de luz, a qual é medida em unidades relativas de luminescência (*relative light units* - RLUs) por um fotômetro. Este processo permite, portanto, a detecção dos híbridos DNA/RNA ligados.

A intensidade de luz emitida denota a presença ou ausência do DNA em questão na amostra examinada. Uma medida de RLUs igual ou maior que o valor do ponto de corte indica a presença das seqüências de DNA do HPV na amostra. Uma medida de RLUs menor que o valor de ponto de corte indica a ausência das seqüências de DNA específicas, ou níveis de DNA do HPV abaixo dos limites de detecção do ensaio. O calibrador para pesquisa de DNA de HPV de alto risco é 1 pg/mL de DNA de HPV 16. Todos os testes de CH2 são, ao mesmo tempo, qualitativos e quantitativos.

Para interpretação dos resultados, as amostras cujo resultado for RLU maior ou igual a 1,0 são consideradas positivas para um ou mais tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. As amostras com resultado de RLU < 1,0 são consideradas negativas ou indetectáveis. Neste caso, o DNA do HPV pode estar ausente ou ter níveis de detecção abaixo dos limites do teste.

Uma série de microrganismos freqüentemente encontrados na região anogenital feminina foram testados quanto à possibilidade de reações cruzadas com a CH2 para DNA de HPV, durante o desenvolvimento do teste. Entre estes microrganismos estão inúmeras bactérias, fungos, protozoários, vírus e plasmídios (*Lactobacillus acidophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitides*, *Neisseria sicca*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mobiluncus curtisii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Mobiluncus mulieris*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Acinetobacter anitratus*, *Acinetobacter Iwoffii*, Adenovírus 2, Cytomegalovírus, Herpes Simplex I, Herpes Simplex II, Vírus de Epstein-Barr, soro positivo para antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B, Vírus da Imunodeficiência Humana, SV40 e pBR322). O resultado destes testes foi de que não há evidências de que qualquer destes microrganismos possa causar confusão nos resultados da CH2 para HPV de alto risco.

Além disso, o teste também foi avaliado quanto à presença de hibridização cruzada com tipos de baixo risco de HPV, assim como outros tipos de HPV cutaneotrópicos. Assim como existe um coquetel de sondas para testagem de tipos de HPV de alto risco, há um coquetel para testagem dos tipos de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 43 e 44). Foi feita então a comparação entre CH2 para HPVs de baixo e de alto risco.

Quando os diferentes tipos de HPV são testados há evidências de pequena hibridização cruzada entre os HPVs 6 e 42 (ambos de baixo risco) e o grupo de HPVs de alto risco. As amostras que contêm altos níveis de DNA de HPV 6 ou 42 (4 ng/mL ou mais) podem resultar positivas em ambos ensaios (teste para HPV de baixo e de alto risco). A significância clínica deste achado é que pacientes que apresentem grandes quantidades de DNA de HPV 6 ou 42 podem acabar sendo encaminhadas para colposcopia. Além disso, o coquetel que testa HPVs de alto risco pode apresentar reação cruzada com os HPVs tipos 40, 53 e 66. Entretanto, estes tipos são raros e há evidências insuficientes para estabelecer a correlação exata entre infecção por estes tipos e desenvolvimento de lesões de alto grau.

O efeito de sangue e de outras substâncias que poderiam ter a potencialidade de interferir no resultado dos testes também foi avaliada. Entre as substâncias avaliadas estão cremes anti-fúngicos, geléia espermicida e duchas vaginais. Estas substâncias foram adicionadas ao STM de amostras cujo resultado positivo ou negativo era conhecido, a uma variedade de concentrações equivalentes às encontradas clinicamente.

Não foi observado nenhum resultado falso positivo com sangue ou qualquer outra destas substâncias em diferentes concentrações. Entretanto, houve resultado falso-negativo em amostras cujos níveis de DNA de HPV estavam próximas do ponto de corte do teste (1 pg/mL), caso grandes quantidades de creme anti-fúngico ou geléia espermicida estivessem presentes. Entretanto, é muito pouco provável que uma amostra clínica consista quase exclusivamente de uma destas substâncias, uma vez que o colo uterino é rotineiramente limpo antes da coleta de amostras para CP ou testagem de HPV.

2.8. O papel da testagem do DNA do HPV em pacientes estratificadas conforme risco pela citologia

A testagem do tipo de HPV tem sido proposta como um teste secundário, realizado após um resultado de citologia anormal, equívoco ou com atipias de baixo grau. A utilidade da testagem do HPV para determinar a triagem para colposcopia, no contexto de uma citologia anormal parece ser diferente para mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) em comparação com aquelas cujo resultado for de atipias de células escamosas de significado incerto (ASCUS).

Quatro centros em diferentes áreas dos Estados Unidos participaram de um ensaio clínico randomizado (*The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS Group)*) utilizando a testagem do DNA do HPV em mulheres com evidências citológicas de ASCUS ou LSIL [125].

Neste estudo as mulheres portadoras de LSIL demonstraram uma percentagem alta (quase 83%) de positividade para o DNA do HPV, limitando a utilidade deste teste como triagem. Relativamente poucas mulheres seriam poupadas de realizar uma colposcopia baseado em um resultado negativo de pesquisa de HPV. Portanto, o custo da testagem neste grupo de pacientes não estaria justificado.

Por outro lado, os resultados de colposcopia demonstraram que somente cerca de 5 a 10% das mulheres portadoras de ASCUS tinham lesões de alto grau ou câncer. A testagem do DNA do HPV nestas pacientes identificou quase todas que precisavam de tratamento (sendo positiva em cerca de 96,3% das vezes). Ainda,

cerca de 99,5% das mulheres com DNA HPV considerado negativo não tinham nenhuma evidência de lesões pré-malignas ou malignas. Portanto, a tipagem do HPV em pacientes com diagnóstico de ASCUS identificou um número suficiente de pacientes que não precisou de colposcopia ou de seguimento imediato, o que em última análise economizou uma quantia significativa de recursos destinados à saúde [126]. Um teste negativo neste contexto forneceu uma evidência muito forte de que não havia lesões de alto risco.

Cerca de 55% das mulheres portadoras de ASCUS teriam sido encaminhadas para colposcopia neste estudo se o teste de DNA do HPV tivesse sido utilizado na triagem em todos os casos. Então, a testagem do HPV reduziu os encaminhamentos para colposcopia em cerca da metade, quando comparada à citologia que utilizou o diagnóstico de ASCUS como ponto de corte.

Manos e colaboradores [127] realizaram um estudo para avaliar qual o papel da testagem de DNA do HPV em pacientes com risco estratificado pela citologia. As amostras foram testadas para DNA do HPV por CH2 somente quando a citologia era classificada como ASCUS. Todas as pacientes foram encaminhadas para colposcopia para diagnóstico definitivo. Devido ao excelente valor preditivo negativo do teste de DNA para HPV, o rastreamento através do DNA mostrou-se uma estratégia custo-efetiva quando comparada à repetição do CP ou colposcopia em todas as pacientes com ASCUS.

Há estudos realizados também na região de Guanacaste – Costa Rica, uma área com alta incidência de carcinoma de colo de útero. Não há programa definido de rastreamento através da citologia nesta região. Um projeto patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI – *National Cancer Institute*) realizado

em Guanacaste comparou o rastreio convencional feito pela citologia de Papanicolaou com a citologia líquida (*Cytec ThinPrep Processor*) e com a detecção de DNA do HPV através da CH2, para detecção de neoplasia intraepitelial cervical ou de carcinoma invasor [128]. Os dois novos testes mostraram maior sensibilidade e especificidade do que o teste de Papanicolaou realizado em uma única vez. Este estudo motivou o desenvolvimento de estudos adicionais, empregando novas abordagens diagnósticas, incluindo o rastreio do tipo de HPV (pela tipagem de DNA por CH2), como método potencial para uso em primeira linha no rastreio de câncer de colo de útero em países em desenvolvimento.

Um estudo realizado na província rural chinesa de Shanxi, 1997 mulheres de 35 a 45 anos foram examinadas [129]. O estudo foi delineado para auxiliar no desenvolvimento de um algoritmo diagnóstico apropriado para países em desenvolvimento. Vários métodos foram comparados, tais como exame de DNA de HPV por CH2 em material coletado pela própria paciente ou pelo médico, citologia líquida, inspeção visual e colposcopia com múltiplas biópsias cervicais.

A sensibilidade e a especificidade para detecção de lesões NIC2 ou mais graves neste estudo foram respectivamente: 83 e 86% para o DNA do HPV coletado pela paciente, 95 e 85% para o DNA do HPV coletado pelo médico, 94 e 78% para citologia líquida utilizando ASCUS como ponto de corte, 77 e 98% utilizando HGSIL como ponto de corte, 71 e 74% para inspeção visual, e 81 e 77% para colposcopia. Com base nestes achados e na estrutura de atenção primária à saúde existente nesta região da China, foi concluído que o uso da testagem de DNA do HPV centralizada em laboratórios deve ser indicada, e que o exame do material coletado pela própria paciente poderá vir a ser efetivo no rastreio da doença em localidades

específicas, desde que haja desenvolvimento do material e das técnicas envolvidas com a testagem.

A rotina em vários países da Europa é de encaminhar para biópsia colposcópica as mulheres que apresentarem dois CPs consecutivos com resultado limítrofe ou com displasia leve, dentro de um período de 6 meses de observação. Apenas cerca de 10% destas mulheres acaba tendo diagnóstico anátomo-patológico de NIC.

Em um estudo muito interessante realizado na Vrije Universiteit de Amsterdam, Holanda, 278 mulheres foram seguidas por um período mediano de um ano e meio (de 0 a 4 anos) para verificar quais as mulheres com estes achados citológicos estariam mais sujeitas a ter um diagnóstico de NIC, tanto por ocasião do encaminhamento para colposcopia, quanto após, no seguimento [130]. Para este fim foram verificados o desaparecimento do HPV de alto risco e a regressão dos achados citológicos anormais. Parte do grupo (n=172) realizou apenas um CP, enquanto outro grupo (n=106) realizou dois CPs consecutivos. Todas as pacientes tinham resultado limítrofe ou com displasia leve no CP. O material para a CH2 foi coletado na visita que antecedeu à colposcopia e outra vez durante o seguimento. Quando havia lesões aparentes à colposcopia, eram realizadas biópsias. O DNA de HPV de alto risco estava presente em esfregaços iniciais de 126 (45,0%) das mulheres; 26 (20,6%) delas tiveram confirmação histológica de NIC2 ou 3 na primeira visita e outras 14 (11,1%), durante o período de seguimento. Apenas uma das 152 mulheres (0,7%) com um resultado de DNA negativo tinha uma lesão classificada como NIC2 na primeira visita. Nenhuma NIC foi detectada durante o seguimento destas pacientes.

A sensibilidade e a especificidade da CH2 para HPV de alto risco para NIC2 ou 3 na primeira visita foi de 96,3 e 60.2%, respectivamente. O valor preditivo positivo foi de 20,6% e o valor preditivo negativo foi de 99.3%. Estes valores não variaram significativamente entre os dois grupos. Além disso, a regressão dos achados citológicos em mulheres com HPV de alto risco identificado na primeira visita ocorreu em média 4 meses mais tarde que o desaparecimento do vírus. Este estudo demonstrou a validade da CH2 em não deixar passar casos de NIC2 ou NIC3. O uso da testagem de DNA no rastreio poderia evitar 55% dos encaminhamentos para colposcopia e/ou repetições de citologia.

O diagnóstico de ASCUS é muito freqüente e seu manejo clínico ainda não está bem estabelecido. A citologia e a CH2 para DNA do HPV podem ser obtidos em uma única visita, o que pode representar uma vantagem quando a população a ser rastreada tem dificuldades de aderir às campanhas preventivas. Como mencionado, a testagem do DNA aumenta a sensibilidade do diagnóstico do HPV. Por outro lado, a testagem excessiva de HPV deve ser evitada, pois esta infecção viral representa um processo bastante comum. Existe uma necessidade clara de selecionar os casos nos quais a pesquisa do DNA do vírus pode ser útil.

Espera-se que este teste venha futuramente a ser integrado no manejo clínico da neoplasia cervical. Porém, a otimização de seu uso depende da escolha entre sua sensibilidade e sua especificidade, permitindo a identificação de casos com significância clínica, enquanto evita intervenções clínicas que não beneficiem e possivelmente venham a prejudicar as pacientes [124].

No momento, acredita-se que haja três papéis potenciais para a testagem do DNA do HPV: 1) estratificação de risco de pacientes cuja citologia apresenta atipias de células escamosas de significado incerto (ASCUS); 2) como método de rastreio

em países em desenvolvimento; e 3) como método de seguimento para pacientes portadoras de doença relacionada ao HPV após terem sido tratadas [124].

2.9. A Cidade de Campo Bom – RS

Campo Bom localiza-se no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Sua população residente total é de 47.876 habitantes, sendo cerca de 97% na região urbana e somente 3% de população rural. Cerca de 96% dos domicílios têm água canalizada e 81% têm instalações sanitárias internas. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a renda mensal média dos chefes de família em dólares americanos é de US\$ 293,48, sendo que apenas 2% deles têm mais de 15 anos de estudo [54,131,132].

Este município foi escolhido para realização deste estudo devido ao grande interesse comunitário em realizar atividades que busquem a melhor qualidade de vida e saúde da população. A Liga Feminina de Combate ao Câncer de Campo Bom teve papel fundamental.

O tema dessa pesquisa, constitui-se no estudo da identificação de pacientes infectadas pelo papilomavírus humano, lesões pré-malignas do câncer do colo uterino e, rastreamento do próprio câncer de colo de útero em mulheres adultas, sexualmente ativas e não gestantes, que participaram do rastreamento para o câncer do colo uterino realizado pela Liga Feminina de Combate ao Câncer de Campo Bom, RS no período de agosto e setembro de 2000.

Este projeto visa melhorar os programas de rastreio para o câncer de colo uterino no nosso país. Pretende-se aumentar a sensibilidade do diagnóstico das

lesões pré-malignas, curáveis, e desta forma diminuir o número de casos novos de câncer invasor em nosso país.

3. OBJETIVOS

Geral

Comparar o impacto da citologia convencional, da captura híbrida de segunda geração e da utilização dos dois métodos combinados no rastreamento de lesões de alto risco para o câncer de colo uterino.

Específicos

- 1) Determinar a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo na detecção de lesões de alto risco para câncer de colo uterino:
 - a) pela citologia convencional;
 - b) pela captura híbrida de segunda geração;
 - c) pela citologia convencional combinada com a captura híbrida de segunda geração.
- 2) Determinar o percentual de mulheres da população estudada encaminhadas à colposcopia para diagnóstico definitivo de lesões de alto grau nos diferentes grupos.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- (1) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2000. Rio de Janeiro: *Instituto Nacional do Câncer, Coordenação de Câncer/Pro-Onco/INCA*, 2000.
- (2) Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(12):958-964.
- (3) Villa LL, Franco EL. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81(5):332-340.
- (4) Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993; 55(6):891-903.
- (5) Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79(3):328-337.
- (6) Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M et al. Hybrid Capture 2-based human papillomavirus detection, a sensitive test to

- detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. Br J Cancer 1999; 80(9):1306-1311.
- (7) Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I et al. HPV testing in primary screening of older women. Br J Cancer 1999; 81(3):554-558.
- (8) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999; 189(1):12-19.
- (9) Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. J Natl Cancer Inst 1999; 91(3):252-258.
- (10) Green GH. The progression of pre-invasive lesions of the cervix to invasion. N Z Med J 1974; 80(525):279-287.
- (11) Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. Obstet Gynecol 1986; 67(5):665-669.
- (12) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. Sistema de informação sobre mortalidade 1979 - 1997: Dados de declaração de óbito. Brasília: SUS. CD-ROM.
- (13) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Sistema de informações sobre mortalidade. Disponível na Internet: <http://www.datasus.gov.br/>. 1999.
- (14) Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and

- consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354(9172):20-25.
- (15) Tsukamoto N. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia with the carbon dioxide laser. *Gynecol Oncol* 1985; 21(3):331-336.
- (16) Benedet JL, Miller DM, Nickerson KG, Anderson GH. The results of cryosurgical treatment of cervical intraepithelial neoplasia at one, five, and ten years. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157(2):268-273.
- (17) Wright VC, Chapman W. Intraepithelial neoplasia of the lower female genital tract: etiology, investigation, and management. *Semin Surg Oncol* 1992; 8(4):180-190.
- (18) Bloss JD. The use of electrosurgical techniques in the management of premalignant diseases of the vulva, vagina, and cervix: an excisional rather than an ablative approach. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(5):1081-1085.
- (19) Spitzer M, Chernys AE, Seltzer VL. The use of large-loop excision of the transformation zone in an inner-city population. *Obstet Gynecol* 1993; 82(5):731-735.
- (20) Soutter WP, de Barros LA, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaidis E et al. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 1997; 349(9057):978-980.

- (21) Grigsby PW, Perez CA. Radiotherapy alone for medically inoperable carcinoma of the cervix: stage IA and carcinoma in situ. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21(2):375-378.
- (22) Jones WB, Mercer GO, Lewis JL, et al.: Early invasive carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology* 1993; 51(1):26-32.
- (23) Thomadsen BR, Shahabi S, Stitt JA, et al.: High dose rate intracavitary brachytherapy for carcinoma of the cervix: the Madison system: II. procedural and physical considerations. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1992; 24(2):349-357.
- (24) Eifel PJ, Burke TW, Delclos L, et al.: Early stage I adenocarcinoma of the uterine cervix: treatment results in patients with tumors ≤ 4 cm in diameter. *Gynecologic Oncology* 1991; 41(3):199-205.
- (25) Stitt JA, Fowler JF, Thomadsen BR, et al.: High dose rate intracavitary brachytherapy for carcinoma of the cervix: the Madison system: I. clinical and radiobiological considerations. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1992; 24(2):335-348.
- (26) Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340:1137-1143.
- (27) Peters WA III, Liu PY, Barrett RJ II, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, Souhami L, Grigsby P, Gordon W Jr, Alberts DS. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant

- therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18(8):1606-13.
- (28) Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340:1154-1161.
- (29) Sardi JE, Giaroli A, Sananes C, Ferreira M, Soderini A, Bermudez A, Snaidas L, Vighi S, Gomez Rueda N, di Paola G. Long-term follow-up of the first randomized trial using neoadjuvant chemotherapy in stage Ib squamous carcinoma of the cervix: the final results. *Gynecol Oncol* 1997; 67(1):61-9.
- (30) Shumsky AG, Stuart GC, Nation J. Carcinoma of the cervix following conservative management of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1994; 53(1):50-54.
- (31) Christopherson WM, Parker JE, Mendez WM, Lundin FE, Jr. Cervix cancer death rates and mass cytologic screening. *Cancer* 1970; 26(4):808-811.
- (32) Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med* 1996; 334(16):1030-1038.
- (33) Anderson GH, Boyes DA, Benedet JL, Le Riche JC, Maticic JP, Suen KC et al. Organisation and results of the cervical cytology screening programme in British Columbia, 1955-85. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296(6627):975-978.

- (34) Boon ME, Graaff Guilloud JC, Rietveld WJ, Wijsman-Grootendorst A. Effect of regular 3-yearly screening on the incidence of cervical smears: the Leiden experience. *Cytopathology* 1990; 1(4):201-210.
- (35) Laara E, Day NE, Hakama M. Trends in mortality from cervical cancer in the Nordic countries: association with organised screening programmes. *Lancet* 1987; 1(8544):1247-1249.
- (36) Kim HS, Underwood D. Adenocarcinomas in the cervicovaginal Papanicolaou smear: analysis of a 12-year experience. *Diagn Cytopathol* 1991; 7(2):119-124.
- (37) Clarke EA, Anderson TW. Does screening by "Pap" smears help prevent cervical cancer? A case-control study. *Lancet* 1979; 2(8132):1-4.
- (38) Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, de Britton RC, Gaitan E et al. Screening for cervical cancer in Latin America: a case-control study. *Int J Epidemiol* 1992; 21(6):1050-1056.
- (39) La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Fasoli M, Gentile A, Tognoni G. "Pap" smear and the risk of cervical neoplasia: quantitative estimates from a case-control study. *Lancet* 1984; 2(8406):779-782.
- (40) Berrino F, Gatta G, d'Alto M, Crosignani P, Riboli E. Efficacy of screening in preventing invasive cervical cancer: a case-control study in Milan, Italy. *IARC Sci Publ* 1986;(76):111-123.
- (41) Papanicolaou G. New York: The Commonwealth Fund, 1943.

- (42) Update January 1992: the American Cancer Society guidelines for the cancer-related checkup. *CA Cancer J Clin* 1992; 42(1):44-45.
- (43) Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies. IARC Working Group on evaluation of cervical cancer screening programmes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293(6548):659-664.
- (44) Sawaya GF, Grady D, Kerlikowske K, Valleur JL, Barnabei VM, Bass K et al. The positive predictive value of cervical smears in previously screened postmenopausal women: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS). *Ann Intern Med* 2000; 133(12):942-950.
- (45) The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1989; 262(7):931-934.
- (46) Davey DD, Naryshkin S, Nielsen ML, Kline TS. Atypical squamous cells of undetermined significance: interlaboratory comparison and quality assurance monitors. *Diagn Cytopathol* 1994; 11(4):390-396.
- (47) Williams ML, Rimm DL, Pedigo MA, Frable WJ. Atypical squamous cells of undetermined significance: correlative histologic and follow-up studies from an academic medical center. *Diagn Cytopathol* 1997; 16(1):1-7.
- (48) Moss SM, Day NE. Meeting on Prevention and Control of Cancer of the Cervix Uteri-Working, paper 445. Geneva, World Health Organization, 1985.

- (49) Sawaya GF, Kerlikowske K, Lee NC, Gildengorin G, Washington AE. Frequency of cervical smear abnormalities within 3 years of normal cytology. *Obstet Gynecol* 2000; 96(2):219-223.
- (50) Pearce KF, Haefner HK, Sarwar SF, Nolan TE. Cytopathological findings on vaginal Papanicolaou smears after hysterectomy for benign gynecologic disease. *N Engl J Med* 1996; 335(21):1559-1562.
- (51) REGISTRO DE CÂNCER DE BASE POPULACIONAL DE SALVADOR. Dados em mimeo do RCBP-Salvador para o período de 1996 a 1998, 2001.
- (52) UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS/UNICAMP. REGISTRO DE CÂNCER DE BASE POPULACIONAL DE CAMPINAS. Dados em mimeo do RCBP-Campinas para o período de 1991 a 1995, 2001.
- (53) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DO CÂNCER. Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Câncer de Base Populacional. Volume II. Rio de Janeiro, MS/INCA, 1995.
- (54) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2000. Rio de Janeiro: *Instituto Nacional do Câncer, Coordenação de Câncer/Pro-Onco/INCA*, 2000.
- (55) Dietz J, Prolla JC, Pohlmann PR, Loss JF, Da Costa LA, Daudt AW et al. [Mortality from uterine cervix cancer in Rio Grande do Sul]. *Rev Assoc Med Bras* 1993; 39(3):146-150.

(56) REGISTRO DE CÂNCER DE BASE POPULACIONAL DE PORTO ALEGRE.

Dados em mimeo do RCBP-POA para o período de 1979 a 1992, 1996.

(57) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER.

COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DO CÂNCER."O

Problema do Câncer no Brasil", quarta edição revisada e atualizada. Rio de Janeiro, 1997.

(58) Benoit AG, Krepert GV, Lotocki RJ. Results of prior cytologic screening in

patients with a diagnosis of Stage I carcinoma of the cervix. Am J Obstet Gynecol 1984; 148(5):690-694.

(59) Boyes DA, Morrison B, Knox EG, Draper GJ, Miller AB. A cohort study of

cervical cancer screening in British Columbia. Clin Invest Med 1982; 5(1):1-29.

(60) Jones DE, Creasman WT, Dombroski RA, Lentz SS, Waeltz JL. Evaluation of

the atypical Pap smear. Am J Obstet Gynecol 1987; 157(3):544-549.

(61) Soost HJ, Lange HJ, Lehmacher W, Ruffing-Kullmann B. The validation of

cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values. Acta Cytol 1991; 35(1):8-14.

(62) Sfameni SF, Jobling TW, Trickey NR, Havelock C. Evaluation of serial cervical

cytology in the assessment of preinvasive cervical neoplasia. Aust N Z J Obstet Gynaecol 1989; 29(1):40-43.

(63) Yobs AR, Swanson RA, Lamotte LC, Jr. Laboratory reliability of the

Papanicolaou smear. Obstet Gynecol 1985; 65(2):235-244.

- (64) Davey DD, Nielsen ML, Rosenstock W, Kline TS. Terminology and specimen adequacy in cervicovaginal cytology. The College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program experience. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116(9):903-907.
- (65) Dodd LG, Sneige N, Villarreal Y, Fanning CV, Staerkel GA, Caraway NP et al. Quality-assurance study of simultaneously sampled, non-correlating cervical cytology and biopsies. *Diagn Cytopathol* 1993; 9(2):138-144.
- (66) Clement KD, Christenson PD. Papanicolaou smear cell recovery techniques used by primary care physicians. *J Am Board Fam Pract* 1990; 3(4):253-258.
- (67) Koss LG. Cervical (Pap) smear. New directions. *Cancer* 1993; 71(4 Suppl):1406-1412.
- (68) O'Malley DM, Munkarah AR, Morris RT, Gunter D, Malone Jr JM, Gray N. Reasons for Failure to Seek Cervical Cancer Screening in a Non-Indigent Population. *Proc Am Soc Clin Oncol* . Abstract # 851, 2001.
- (69) Remington P, Lantz P, Phillips JL. Cervical cancer deaths among older women: implications for prevention. *Wis Med J* 1990; 89(1):30, 32-30, 34.
- (70) Makuc DM, Freid VM, Kleinman JC. National trends in the use of preventive health care by women. *Am J Public Health* 1989; 79(1):21-26.
- (71) Mandelblatt J, Gopaul I, Wistreich M. Gynecological care of elderly women. Another look at Papanicolaou smear testing. *JAMA* 1986; 256(3):367-371.

- (72) Lauver D, Rubin M. Women's concerns about abnormal Papanicolaou test results. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1991; 20(2):154-159.
- (73) Lerman C, Miller SM, Scarborough R, Hanjani P, Nolte S, Smith D. Adverse psychologic consequences of positive cytologic cervical screening. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165(3):658-662.
- (74) Wilkinson C, Jones JM, McBride J. Anxiety caused by abnormal result of cervical smear test: a controlled trial. *BMJ* 1990; 300(6722):440.
- (75) Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R. Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. *Bull World Health Organ* 2001; 79(10):954-962.
- (76) Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995; 141(7):680-689.
- (77) Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132(10):810-819.
- (78) World Health Organization (WHO) Fact Sheet 249, 2000.
- (79) Brisson J, Morin C, Fortier M, Roy M, Bouchard C, Leclerc J et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol* 1994; 140(8):700-710.

- (80) Ley C, Bauer HM, Reingold A, Schiffman MH, Chambers JC, Tashiro CJ et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(14):997-1003.
- (81) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M 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(5):743-749.
- (82) Fuchs PG, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 1988; 41(1):41-45.
- (83) Lorincz AT, Lancaster WD, Temple GF. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 1986; 58(1):225-229.
- (84) Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79(4):671-677.
- (85) Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 1986; 321(6067):246-249.
- (86) Lorincz AT, Quinn AP, Lancaster WD, Temple GF. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 1987; 159(1):187-190.

- (87) Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M, Willett J, Daoud Y et al. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156(1):212-222.
- (88) Naghashfar ZS, Rosenshein NB, Lorincz AT, Buscema J, Shah KV. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J Gen Virol* 1987; 68 (Pt 12):3073-3079.
- (89) Nuovo GJ, Crum CP, de Villiers EM, Levine RU, Silverstein SJ. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 1988; 62(4):1452-1455.
- (90) Shimoda K, Lorincz AT, Temple GF, Lancaster WD. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 11):2925-2928.
- (91) Lorincz AT, Quinn AP, Goldsborough MD, McAllister P, Temple GF. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J Gen Virol* 1989; 70 (Pt 11):3099-3104.
- (92) Beaudenon S, Kremsdorf D, Obalek S, Jablonska S, Pehau-Arnaudet G, Croissant O et al. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 1987; 161(2):374-384.
- (93) Volpers C, Streeck RE. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 1991; 181(1):419-423.

- (94) Matsukura T, Sugase M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 1990; 177(2):833-836.
- (95) Rho J, Roy-Burman A, Kim H, de Villiers EM, Matsukura T, Choe J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 1994; 203(1):158-161.
- (96) Longuet M, Beaudenon S, Orth G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3):738-744.
- (97) Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(11):796-802.
- (98) Stewart AC, Gravitt PE, Cheng S, Wheeler CM. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Res* 1995; 5(1):79-88.
- (99) Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327(18):1272-1278.
- (100) Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169(2):235-240.

- (101) Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J et al. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis* 1996; 174(5):927-936.
- (102) Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61(3):306-311.
- (103) Lorincz AT, Reid R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr Opin Oncol* 1989; 1(1):123-132.
- (104) de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186:1-12.
- (105) Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; 352(6338):824-827.
- (106) Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61(4):962-971.
- (107) Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989; 8(13):4099-4105.

- (108) Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989; 8(12):3905-3910.
- (109) Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(4):1070-1074.
- (110) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314(6006):111-114.
- (111) Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* 1995; 69(12):7791-7799.
- (112) Goodwin EC, Naeger LK, Breiding DE, Androphy EJ, DiMaio D. Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1998; 72(5):3925-3934.
- (113) Hwang ES, Naeger LK, DiMaio D. Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene. *Oncogene* 1996; 12(4):795-803.
- (114) Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and

- sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63(10):4417-4421.
- (115) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248(4951):76-79.
- (116) Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(9):3988-3992.
- (117) White AE, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994; 8(6):666-677.
- (118) Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996; 380(6569):79-82.
- (119) Clarke EA, Morgan RW, Newman AM. Smoking as a risk factor in cancer of the cervix: additional evidence from a case-control study. *Am J Epidemiol* 1982; 115(1):59-66.
- (120) Pastrana DV, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. NHPV16 VLP vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV16. *Virology* 2001; 279(1):361-369.
- (121) Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP et al. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 2001; 186(2):169-182.

- (122) Nonnenmacher B. Resposta humoral ao papilomavírus humano e sua relação com o risco de neoplasia cervical em mulheres submetidas a rastreamento para o câncer do colo uterino na Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre / Bernardete Nonnenmacher; orient. Gilberto Schwartzmann; co-orient. Eduardo Luis Fabiano Franco e Mary Clarisse Bozzetti. – Porto Alegre: 1999. 104p.il. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica: Epidemiologia.
- (123) Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172(3):946-954.
- (124) Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000; 283(1):87-93.
- (125) Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(5):397-402.
- (126) Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined

- significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4):293-299.
- (127) Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, Sherman ME, Shieh-Ngai J, Kurman RJ et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 1999; 281(17):1605-1610.
- (128) Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME, Herrero R, Alfaro M, Bratti MC et al. Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma. *Cancer* 1999; 87(2):48-55.
- (129) Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, Zhang WH, Elson P, Li L et al. Shanxi province cervical cancer screening study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001; 83(2):439-444.
- (130) Zielinski DG., Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Runsink AP, de Schipper FA et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol* 2001; 195(3):300-306.
- (131) BRASIL. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO E ORÇAMENTO. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. DIRETORIA DE PESQUISA. DEPARTAMENTO DE POPULAÇÃO E INDICADORES

SOCIAIS. População residente 1980 - 1996: Brasil, unidades da federação e municípios. Rio de Janeiro: DESEM, 1990. CD-ROM.

- (132) BRASIL. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO E ORÇAMENTO. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. DIRETORIA DE PESQUISA. DEPARTAMENTO DE POPULAÇÃO E INDICADORES SOCIAIS. População residente - Censo 2000: Brasil, unidades da federação e municípios. Disponível na Internet: <http://www.ibge.gov.br/>.

5. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Hybrid Capture for HPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening

Abstract

Context Human papillomaviruses (HPVs) are known to cause most cervical cancer worldwide. Thousands of women all over the world still presents with advanced disease with a high morbidity and mortality. Efforts to improve the screening accuracy are indispensable. Effective colposcopy triage strategies are also needed to identify the minority of women who have clinically significant disease while avoiding excessive follow-up evaluation for others.

Objective To provide comprehensive data on the screening performance of HPV testing for the most common carcinogenic types in a southern Brazilian city.

Design Laboratory analysis conducted during in 2000, using cytologic and hybrid capture techniques, followed by colposcopic examination of women with any abnormal cervical finding, to detect all intraepithelial lesions and cancer. The HPV testing was performed with masking regarding clinical findings.

Setting Campo Bom, Brazil.

Participants 4,725 selected adult, nonpregnant, sexually active women without hysterectomies underwent initial HPV conventional screening with Pap smears. At the same time samples were collected for the second-generation Hybrid Capture test (HC2). Those with abnormal findings went to colposcopy with biopsy when a lesion was found.

Results Overall, the HC2 test was positive only in 488 (11.7%) of the 4,169 analyzed results, and in 446 the Pap smear result was negative. Therefore, the overall triage to colposcopy, exclusively based on a positive or a missing HC2 result, would be 11,7%. The majority of Pap smear specimens were called negative (96.2%); 109 were classified as ASCUS (2.6%); 22 were LSIL (0.5%); and only 18 showed HSIL/+ (HSIL and carcinoma) (0.4%). Evaluation of results yielded the following prevalence percentages: 98.5% - normal; 0.8% - cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1); and 0.6% - CIN2/+. In this population, we showed that HPV testing with HC2 at 1.0 pg/mL detected 24 (88.9%) of the 27 testable high-grade lesions (CIN2/+). The combination of Pap smears and HC2 tests shown better performance than each isolated test as screening for high-risk lesions.

Conclusions As HPV prevalence varies by population, HPV by HC2 testing performance for detection of high-grade lesions and cancer will vary accordingly, with implications for utility relative to other cervical cancer screening methods. In this study the cytologic screening in a threshold of ASCUS/+ combined to HC2+ tests showed 100.0% sensitivity and negative predictive value. With these procedures the percentage of colposcopy referral was 15.4%. In regions where cervical cancer still have a high incidence and mortality, the combination of both methods in screening can be an alternative to try to improve cervical cancer control.

Cervical cancer is the second or third leading cause of cancer in women worldwide, with about 400,000 cases diagnosed per year [1]. Papanicolaou (Pap) smear screening is widely recognized as an effective method for preventing cervical carcinoma, when often repeated. Since the late 50's Pap test reporting classifications have evolved, with the current standard being the Bethesda system [2].

Most of the deaths caused by cervical cancer occur in women who have never had a Pap test, but some occur in women who recently received negative test results. Many false-negative results are caused by sampling error, when abnormal cells are not collected or are not transferred to the Pap slide. Other can occur by detection error. Sampling and detection errors are reduced when Pap test screening is repeated frequently [3].

A primary goal of Pap screening and follow-up procedures is to prevent cervical cancer by identifying and treating high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). There is general consensus by health care providers that cytological diagnosed HSIL should be evaluated by colposcopy and biopsy. Nonetheless, low-grade cytologic results, or inaccurate and equivocal Pap smear diagnoses are a serious concern, remaining a large and complex clinical and public health challenge.

The most common abnormal Pap smear result is one of the equivocal, atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) [4]. The majority of ASCUS Pap tests results reflect a benign reactive process, but in until 10% of the cases it is related to underlined high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) [5]. It was also shown that the ASCUS cytology report is not reproducible, even among expert cervical cytopathologists [6]. Given the relatively large proportion of HSIL cases that are associated with ASCUS cytology, effective triage of ASCUS reports is essential. Although routine colposcopic evaluation of all ASCUS cases would provide the greatest patient protection, the frequency of ASCUS makes it impractical, even in developed countries.

During the past 20 years, it has been shown that the same carcinogenic, genital human papillomaviruses (HPV) cause nearly all cases of cervical cancer [7]. Human papillomavirus infection is a very common sexually transmitted infection, with more than 35 genital types; however, only 10 to 15 types cause cancer [8,9]. Most infections, including those with cytological abnormalities, resolve spontaneously, returning to HPV DNA negativity (often with seropositivity) [10,11]. Uncommonly, an HPV infection will progress to a high-grade preinvasive lesion [12]. High-grade lesions typically contain carcinogenic types of HPV. Once established, these lesions tend to persist. Many high-grade lesions become invasive cervical cancers.

Due to this strong association between HPV and cervical cancer, added to the difficulties of Pap test screening, accurate methods to diagnose HPV infection were needed. Current HPV infection is now measured most sensitively by DNA detection. Several HPV DNA detection methods have been described during the last decade, each of which allows the detection of a wide spectrum of HPV types, but none had fulfilled all expectations [13]. Amplification-based methods, mainly PCR (polymerase

chain reaction), are currently the most sensitive methods for detection of HPV DNA. They allow the detection of low-viral-load infections and also minimize the risk of misclassification of HPV infectious status. However, due to frequent contamination problems and consequent false-positive results and the present unacceptably high costs of amplification technology, they are not currently readily applicable to diagnostic laboratories for the routine detection of HPV infection [14].

Several studies suggest that the Hybrid Capture test (Digene Diagnostic, Silver Spring, United States) for cancer-associated HPV types is useful for identifying patients with ASCUS Pap results who have underlying HSIL [15,16]. The HPV DNA testing can be made from residual specimens collected for routine cervical cytology. The majority of high-risk cases could be identified and referred for colposcopy based on a single screening [17].

The analytic sensitivity level that optimizes clinical effectiveness of HPV testing by Second-generation Hybrid Capture was studied and the cut point chosen at 1pg/mL [18]. Because HPV prevalence varies by population, HPV testing positive predictive value for detection of high-grade lesions and cancer can vary accordingly, with implications for utility relative to other cervical cancer screening methods [19]. The improvements in screening sensitivity with newer methods or their combinations are expected to provide increased clinical sensitivity in the detection of CIN2, CIN3 and cervical cancers.

This study was conducted to provide comprehensive data on HPV testing performance for carcinogenic types in a population from the south of Brazil. We evaluated HPV testing in screening for high-grade lesions and cancer, and estimated HPV test sensitivity and specificity and resultant rates of referral to colposcopy over a possibly useful range of thresholds used previously for screening. Patients in this study were screened once by conventional cytology (Pap smears) as well as by second-generation Hybrid Capture (HC2). If any screening results were abnormal they were examined with colposcopy and histological studies. The "gold standard" diagnosis for each patient is based on histology results.

METHODS

Study Population

Women were selected for recruitment from a special 2-months community-based screening campaign carried on in Campo Bom, south of Brazil. This is a 48,000-habitants city. It was chosen because a well-committed public plan and community support, aimed to improve cervical disease control. By 6 months all the cytologic and colposcopic studies, as well as Hybrid Captures were done. A follow-up phase is under way, but enrollment data only are presented here.

All sexually active women with age ≥ 18 years who presented for the screening were eligible for the study. The exclusion criteria were previous hysterectomy, present pregnancy, mental incapacity and

refusal to participate. All subjects provided written informed consent. Signed informed consent included a discussion of risks and benefits of participation and the possibility of being called back for new appointments.

Clinical Specimens

For the conventional Pap test, all exfoliated cervical cells were collected by a group of ten people (nurses and physicians). A Digene Cervical Brush (Digene Corporation, Silver Spring, MD) was used and the samples were prepared as conventional smears. This specimen was placed in Specimen Transport Medium (Digene Corporation, Silver Spring, MD) and shipped frozen to São Paulo, Brazil, for HPV DNA testing using the Hybrid Capture 2 (HC2, Digene Corporation).

Clinical Evaluation

Conventional smears were screened in Brazil by an expert cytopathologist (C.G.Z.) The cytological diagnose was made as per the Bethesda system [2] as within normal limits or reactive cellular changes (negative), atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), or carcinoma. Specimens of 8 women were considered insufficient.

Colposcopic Referral

As screening results became known, patients with any of the following conditions were referred for colposcopy: (1) cytologic diagnosis of ASCUS (or AGUS – atypical glandular cells of undetermined significance) or more severe abnormality rendered on conventional smear, or (2) Hybrid Capture considered positive as above 1 pg/ml ($RLU/CO \geq 1.0$).

An experienced gynecologist (B.N.) performed all colposcopically directed biopsies of visible lesions. Biopsy specimens, obtained for any colposcopically suspected cervical intraepithelial neoplasia (CIN), were placed in separate prelabeled vials containing 10% buffered formalin. Endocervical curettage was performed according to clinician judgment in cases where the entire transformation zone or extent of a lesion was not visualized adequately. Material was collected by punch-biopsies and prepared as hematoxylin-eosin stained sections. The local diagnosis was considered for clinical purposes. Histological interpretation of biopsy specimens was conducted using a combination of the Bethesda System [2,20] and CIN [21] terminologies.

Patients with a cytological diagnosis of high-grade lesion, and those with a high-grade histological diagnosis (CIN2 or CIN3) or carcinoma, were referred for standard treatment. The Social Security System responsible physicians in Campo Bom – Brazil, rendered all follow-up and final treatment decisions. Of the 4,725 women in study, 610 were referred to colposcopy and 77.5% participated.

As a quality control measure, a 5% random sample of study subjects was referred to colposcopy to test the screening protocol sensitivity. No low- or high-grade lesions were found in women in the

random sample having normal screening results (n = 207), suggesting that the combined screening protocol was sensitive in identifying abnormalities.

The colposcopist was blinded about the indication for the procedure (altered Pap smear, altered HC2 or control sample with both screenings negative).

Final Diagnoses

Final case diagnoses were based on combining screening diagnoses and review (C.G.Z.) of pathologic biopsy material from colposcopic and treatment visits. Glandular diagnoses were rare (15 cases) and subsumed under the appropriate squamous diagnosis. "Normal" was conferred on women with negative screening tests, women referred to colposcopy for ASCUS cytology in whom a lesion was excluded, and occasionally women downgraded to negative by final review after histology despite initially positive cytological findings. "CIN1" included biopsy-confirmed low-grade lesions as CIN1. "Disease" was defined as high-grade lesions (CIN2 and 3) and cancer. Of the 28 cases classified as "disease", 4 were histological confirmed of cancer.

The majority (4,658 women) had completely negative screening results without further needs for colposcopy or biopsy, and were classified as "normal". From 644 performed colposcopies, 472 had normal colposcopic findings on exam and 111 had normal histology (from 178 performed biopsies).

HPV Testing

All testing was rigorously masked by the principal investigator.

The HC2 assay includes a mixture of probes for the following cervical cancer-associated HPV types: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68. The U.S. Food and Drug Administration-approved threshold of 1 pg of HPV DNA/mL of test solution was used for a positive result [19]. The low-risk probe set (types 6, 11, 42, 43, and 44) was not used in this study, because it would not give additional information for clinical based decisions in this setting.

An aliquot of Specimen Transport Medium was denatured to produce single-stranded DNA and reacted with a cocktail of the 13 full-length RNA probes recognizing oncogenic HPV types. Hybrids consisting of target HPV bound to RNA probes were bound or "captured" on sides of tubes coated with antibodies recognizing DNA:RNA hybrids. Adding a second antibody tagged with alkaline phosphatase permitted detection of bound hybrid by a chemiluminescent readout. Test specimens in which light emission (expressed as relative light units [RLUs]) equaled or exceeded the mean of positive controls (PCs) consisting of 10 pg/mL HPV 16 DNA run in triplicate were categorized as positive (RLU/CO \geq 1.0). Higher viral levels could be estimated as the ratio of test signal over positive control, but estimation of much lower levels was not possible because of nonlinear downward extrapolation [19].

CO means cutoff, which is 1pg/mL level. In this study, the assay was qualitative so every sample with RLU/CO ratio 1 or above was considered positive.

Data Analysis

The primary study endpoint case definition was established as a histological diagnosis of CIN2/+ (CIN2, CIN3, carcinoma *in situ*, and invasive cancer). It was based on current clinical practice in Brazil, as in other countries, by which these considered high-risk lesions require treatment.

The binomial distribution was used to compute exact confidence intervals (CI) for proportions (e.g., sensitivity). Pearson's chi-square tests for contingency tables were used to assess the associations between categorical variables (e.g., cytological diagnoses versus HPV test results). Yates' chi-square was used for 2x2 tables. Chi-square statistics for trend were calculated to test the significance of data with evident ordering (such as increasing severity of cytological diagnoses related to HPV positivity). All statistical tests were two-sided and were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 4,806 women were identified, of whom 4,725 were eligible for the study and were interviewed. The table 1 shows the population characteristics. About the ethnicity, 99.5% were of Caucasian origin. Age range was 18 to 78 years, with a median age of 37 years. About 70% of the population was younger than 45-years old. Median age at first intercourse was 18 years, with 61.5% reporting only one lifetime sexual partner and 5.3% women with 5 or more. Of the women, 23.6 % had three or four pregnancies with about only 10% reporting at least 5 pregnancies. The main contraceptive method was hormonal, as mentioned by 45.2% of women. Condom was used only by 8%. Few women (18%) had ever smoked.

HC2 Results

HC2 was performed in 4,286 (90.7%) from the 4,725 eligible women. Studying the 439 lost cases for this exam, 435 (99.1%) had normal cytology, 3 (0.7%) had ASCUS and 1 (0.2%) had HSIL/+. From these four cytological altered results, two biopsies results were altered. The HSIL/+ had confirmatory biopsy of "disease" (CIN2/+) and one ASCUS had CIN1 histology.

The HC2 test positivity at the 1.0 pg/mL cut point was strongly associated with screening results from conventional cytology and final histological diagnoses. Overall, the HC2 test was positive only in 488 (11.7%) of the 4,169 analyzed results. Percentages of HPV positivity in subgroups were 11.1% in women with negative Pap smear, 16.5% with initial unconfirmed atypical cytologic (ASCUS) diagnoses alone, 36.4% with low-grade lesions (LSIL), and 72.2% of high-grade lesions (HSIL/+) – Table 2 –

$p < 0.001$. The overall triage to colposcopy, exclusively based on a positive or a missing HC2 result, would be 11.7%.

Cytology Results

Pap smears specimens were collected from 4,608 (97.5%) of the 4,725 enrolled women. There were 8 unsatisfactory samples (0.2%).

Table 2 shows the cytology results compared with the HPV test results (HC2). The majority of Pap smear specimens were called negative (4,012 cases - 96.2%); 109 were classified as ASCUS (2.6%); 22 were LSIL (0.5%); and only 18 showed HSIL/+ (HSIL and carcinoma) (0.4%). There was a trend toward increasing HPV positivity with increasing severity of cytology diagnoses: 11.1% of the negative cytology results, 16.5% of ASCUS, 36.4% of LSIL, and 72.2% of HSIL/carcinoma cytologies were HPV positive. From the 4,012 women with a normal cytology result, in 3,566 (88.9%) the HC2 was negative ($p < 0.001$). The overall triage to colposcopy, exclusively based on a cytologic result of ASCUS/+ or a missing case, would be 3.7%.

Histology Results

Based on enrollment test results and the protocol algorithm, of 4,169 analyzed patients, 110 were triaged to colposcopy (3.7%) by abnormal Pap smear (ASCUS/+), 449 (10.7%) by a positive result in HC2, and 39 (0.9%) by both findings together. Only in 181 cases a lesion was found and so biopsied (29.6% of indicated colposcopies). There was no high-grade lesion identified in colposcopies performed in the negative control group (with both screenings negative).

Directed biopsy was performed if any CIN lesion was suspected by colposcopic examination. If the biopsy results showed CIN2/+, the patients were referred for treatment.

Results obtained by the histology are shown in Table 3 and 4. The worse the histological diagnosis, more often the HC2 results was positive ($p < 0.001$). There were only 3 cases of negative HC2 with a high-grade histology. The results from cytology vs. histology cross tabulation also showed there is a concordance between both diagnostic methods, but in a lesser extent than with the HC2. From 17 cases of HSIL/+ cytology, 11 (64.7%) had confirmation of histological diagnosis of disease. However, from 28 cases with histological diagnosis of disease, there were 14 (50.0%) cases of normal Pap smear ($p < 0.001$).

Prevalence of Disease

We assume that a colposcopically directed biopsy provides virtually complete ascertainment of disease as previously done by other groups [22]. Evaluation of 176 biopsies, yielded the following prevalence percentages based on histological diagnoses: 62.5% - no pathologic lesion on biopsy; 21.6% - CIN1 (low-grade histologic lesion); 15.9% - Disease (CIN2, CIN3, and carcinoma). Considering the whole

group of women in study, the prevalence percentages were 98.5% normal, 0.8% CIN1 and 0.6% disease.

With the single use of HC2, 11.7% of women would be referred to colposcopy compared with only 0.6% for HSIL/+ cytology. As mentioned, at the lowest cytology threshold of ASCUS/+, 3.7% of women would be referred to colposcopy. For a combination of ASCUS cytology and positive HC2, the referral to colposcopy would be 15.4%.

Test Sensitivity

Test sensitivity varies, depending on the threshold established for a positive test as well as on the definition of the disease to be detected. In this protocol, ASCUS/+ was used as the threshold for cytologic triage to colposcopy as well as the positive result in the HPV triage (HC2). Table 5 shows the different predicted outcomes of triage strategies considering cases with diagnosis of "disease" (CIN2/+). For calculations the following test thresholds were used: HC2 positive at 1 pg/mL and/or cytology at ASCUS/+, LSIL/+, or HSIL/+. The values calculated for different age groups are also shown. The percentage of women who would be referred to colposcopy in all groups is mentioned.

The HC2 test for HPV was positive in 488, resulting in a total triage sensitivity of 88.9% (95% CI = 69.7% to 97.1%) cases. Cytology was less sensitive; with 39.3% (95% CI = 22.1% to 59.3%) of sensitivity showed by HSIL/+. From the three cases of CIN2/+ histology with a negative HC2 test result, two had a cytologic diagnosis of HSIL/+ and one had ASCUS.

With the use of HC2, 11.7% of women would be referred to colposcopy compared to only 0.6% for HSIL/+ cytology. Cytologies at a threshold of HSIL/+ or LSIL/+ were much less sensitive than HC2 (cytology sensitivity of 39.3 and 42.8% vs. 88.8%, respectively) and referred far fewer women to colposcopy. They were also slightly more specific (98.1% for HC2, 99.8% for HSIL/+, 99.3% for LSIL/+ and 98.9% for ASCUS/+). At the lowest cytology threshold of ASCUS/+, the sensitivity for CIN2/+ improved to 50.0% (95% CI = 31.1% to 68.9%), with 3.7% of women referred to colposcopy.

When combining both screening methods (HC2 and cytology), the sensitivity increases significantly (to 96.3 to 100%), with small losses in specificity (range of 97.4 to 97.9%, depending on the cytology threshold). The colposcopic referral when considering both screenings together is higher, reaching percentages around 12 to 15%. It is remarkable that the percentage prevalence for "disease" in this population was 0.6%.

The negative predictive value was very high in all categories (99.6 to 100%). As expected, the positive predictive value was higher in HSIL/+ group and lower in the ASCUS/+ and HC2+ group: 64.7% (95% CI = 38.6 to 84.7%) and 20.0% (95% CI = 13.8 to 27.9%), respectively.

We repeated the calculations for age groups because HPV infection is sexually transmitted and thus the acute and transient infections (unrelated to prevalent high-grade lesions and cancer) peak at

young ages [19]. Interestingly, the high-risk lesions (CIN2/+) were more prevalent in younger women, with 0.8% in 18 to 40-y group, 0.6% in older than 30-y group and 0.3% in older than 40-y group.

As shown in table 6, HPV testing performance combined to cytology tend to show slightly better results in the group of women above 30-years old. Unfortunately, the small number of cases diagnosed as “disease” in each age group limited subgroup analysis. The colposcopic referral for women above 40 years old ranged from 6.3 to 8.5%, depending on cytology threshold; 4.4 to 5.4%, for women above 30 years old; and 13.1 to 15.3% in 18 to 40y age group.

COMMENT

This study was undertaken in a small countryside Brazilian city. This city has a good quality of life pattern and is localized in the south of the country. Its immigration was mainly from Germany, what can justify the ethnicity findings. The majority of women had only one lifetime sexual partner and only 5.3% had more than five. The first sexual intercourse median age was 18 years. Only 18% had ever smoked. This pattern of low-risk behavior of women must be considered when discussing the findings in this study.

The screening tests used to elect women for colposcopy were HC2 and conventional cytology. In this study there was no external Cytopathology Quality Control Group [22] to re-review the cytology results. The Pap smears were aimed to be just as in the normal routine procedure to avoid better results due to optimized screening, which would not be representative of reality for this population. So the cytology results can be seen as standard methods for this geographic area, even if potentially less sensitive than described in similar studies. Precise estimates of cytologic test sensitivity and specificity as it is normally done are important because they may be used to determine policy decisions, such as recommendations for optimal frequency of screening, management of mild abnormalities, and use of newer methods [3].

The positive and negative predictive values of HC2 for detection of high-grade lesions and cancer, depends largely on age-specific societal sexual practices. The selected population was relatively young, with more than 70% of women being younger than 45-y old. This could be explained by the way women were selected. The community-based screening campaign carried on in Campo

Bom, involved advertising at schools for children to invite their mothers, as well as at regional industries, directed to female workers. These younger women may have had higher chances to be reached by campaign and so selected for study.

False-positive HPV DNA results obtained with the HC2 method usually represent true infections without serious neoplasia in young, sexually active women. The persistent infections with high-risk HPV convey a greatly elevated risk of future high-grade neoplasia [12,23]. The addition of HPV DNA testing to cervical cytologic screening has the potentiality to be most effective in older woman past the peak incidence of acute infections, or in programs of repeat testing that assess viral persistence [18].

Overall, HPV testing by HC2 was more sensitive than conventional Pap testing at ASCUS/+ (88.8% vs. 50.0%) for high-grade lesions and cancer. The combined sensitivity/specificity of our Brazilian cytopathologist collaborator (C.G.Z.) was at the high end of these values in reported literature for conventional Pap tests [19,24]. In a methanalysis conducted to evaluate accuracy of screening to detect cervical cancer [3], the few studies of Pap screening that were conducted in low-prevalence samples provided the best estimates of sensitivity and specificity. Although specificity was high, the sensitivity estimates are much lower than generally believed.

When the HC2 was added to Pap in the present study, the sensitivity increased significantly, without important losses in specificity. The negative predictive value was near by 100% in all groups and the positive predictive value was higher in the more severe cytologic diagnosis (HSIL/+).

As expected, a negative DNA test did provide reassurance that precancer or cancer is not present. But also did cytology. Then main advantage feature of HC2 could rest at the lower examiner subjective interferences than conventional cytology.

HPV DNA testing should be the most sensitive screening tool for the detection of serious cervical neoplasia, especially if adequate for local virus prevalence. This high sensitivity is critical, because the predictive value of a negative HPV test results extremely high. HPV DNA testing should not be used alone for general screening of women, specially younger, because of the high prevalence of infection in this age group. In this study 47% of the HC2 positive results occurred in women younger than 30-years old (data not shown). The complementary strengths of HPV testing and Pap screening can improve cervical cancer prevention in this and other groups.

Any application of general testing will require careful planning, to avoid excessive referrals to colposcopy based on detection of HPV infection in its usually benign state. Using Pap smear ASCUS/+ diagnosis as cut point for colposcopy referrals, only 3.7% of women should be directed to the exam. When referring patients with LSIL/+ diagnosis 1.1% would have a colposcopy. As mentioned, the referral rate for positive HC2 alone would be 11.7%. For a combination of ASCUS/+ cytology and positive HC2, the referral to colposcopy would be 15.4%, which still lower than other studies [17,22].

The failure of cytologic screening programs to eliminate cervical cancer in regions where they are widely available is due to many factors including the inherent false-negative results rate of the Papanicolaou (Pap) smear, failure of both clinicians and patients to act on abnormal test results, and, perhaps most importantly, underscreening of the population at risk [25]. In the present study only the screening tests are being evaluated. They can be done only when the woman has decided to visit the physician.

The potential role of HPV DNA testing in cervical screening is highly dependent on the existing infrastructure. For settings in which screening is nonexistent, or is ineffective because of poor-quality cytology or inherent limitations due to a high rate of inflammatory smears, the more basic questions of sensitivity, specificity, and simplicity of testing procedures become paramount. In places like Campo Bom, where there is a low incidence of high-risk cervical lesions comparing to other regions in Brazil, the improvement of sensitivity should be discussed with a special interest, in the broad range of activities must be done to achieve better cervical cancer control.

Table 1: Characteristics of participating women

Variable	No. - %
Age	range 18 – 78 years (Median 37 years)
Age groups	18-24y = 13.8% 25-34y = 27.0% 35-44y = 31.4% 45-54y = 17.9% 55-64y = 7.0% 65y or more = 2.2% not known = 2.2%
Ethnicity	caucasian = 99.5%
Age at first sexual intercourse	median 18 years
Entire life number of sexual partners	1 partner = 61.5% 2 partners = 19.1% 3 or 4 partners = 14.1% 5 or more partners = 5.3%
Parity	none = 15.2% 1-2 pregnancies = 50.9% 3-4 pregnancies = 23.6% 5 or more pregnancies = 10.2%
Contraceptive methods	hormonal methods = 45.2% condom = 8.0%
Had ever smoked	18.0%

Table 2: The cytology (Pap smears) results compared with the HPV test (HC2) results.

HC2 results	Negative Pap smear	Positive Pap smear			Unsatisfactory	Total
		ASCUS	LSIL	HSIL/+		
POSITIVE	446 11.1%	18 16.5%	8 36.4%	13 72.2%	3 37.5%	488 11.7%
NEGATIVE	3566 88.9%	91 83.5%	14 63.6%	5 27.8%	5 62.5%	3681 88.3%
Total	4012 96.2%	109 2.6%	22 0.5%	18 0.4%	8 0.2%	4169 100%

Pearson Chi-Square Test

Value 85,660

p < 0.001

Legends for table 2

HC2 → Hybrid capture (second generation assay)

ASCUS → atypical squamous cells of undetermined significance

LSIL → low-grade squamous intraepithelial lesion

HSIL/+ → high-grade squamous intraepithelial lesion or worse (carcinoma)

Table 3: Second-generation hybrid capture results obtained by the histology of 176 biopsied patients irrespective the Pap smear.

HC2 results	HISTOLOGY			Total
	NORMAL	CIN1	DISEASE	
POSITIVE	55 49.5%	27 71.1%	24 88.9%	106 60.2%
NEGATIVE	56 50.5%	11 28.9%	3 11.1%	70 39.8%
Total	111 63.1%	38 21.6%	27 15.3%	176 100%

Pearson Chi-square test

Value 16,402

p<0.001

Legends for table 3

HC2 → Hybrid capture (second generation assay)

NORMAL → Negative histologic result

CIN1 → Low-grade histologic lesion (CIN1)

DISEASE → High-grade histologic lesion (CIN2, CIN3, carcinoma *in situ*, invasive carcinoma)

Table 4: Histology results of 176 biopsied patients considering the Pap smear.

Pap smear results	HISTOLOGY			Total
	NORMAL	CIN1	DISEASE	
NORMAL	80 72.7%	23 60.5%	14 50.0%	117 66.5%
ASCUS	15 13.6%	8 21.1%	2 7.1%	25 14.2%
LSIL	11 10.0%	5 13.2%	1 3.6%	17 9.7%
HSIL/+	4 3.6%	2 5.3%	11 39.3%	17 9.7%
Total	110 62.5%	38 21.6%	28 15.9%	176 100%

Pearson Chi-square test

Value 36,159

p<0.001

Legends for table 4

- HC2 → Hybrid capture (second generation assay)
 NORMAL → Negative histologic result
 CIN1 → Low-grade histologic lesion (CIN1)
 DISEASE → High-grade histologic lesion (CIN2, CIN3, carcinoma *in situ*, invasive carcinoma)
 ASCUS → atypical squamous cells of undetermined significance
 LSIL → low-grade squamous intraepithelial lesion
 HSIL/+ → high-grade squamous intraepithelial lesion or worse (carcinoma)

Table 5: Predicted outcomes of triage strategies considering cases with diagnosis of “disease” (CIN2/+). Data presented as percentage (95% confidence intervals).

Test cutt-off: Pap result with or without HC2	Sensivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Colposc. referral
Only HC2 +	88.8 (69.7-97.1)	98.1 (97.6-98.4)	22.6 (15.3-31.9)	99.9 (99.8-99.9)	11.7
HSIL/+	39.3 (22.1-59.3)	99.8 (99.7-99.9)	64.7 (38.6-84.7)	99.6 (99.4-99.8)	0.6
HSIL/+ and/or HC2+	96.3 (79.1-99.8)	97.9 (97.5-98.3)	23.6 (16.3-32.9)	99.9 (99.8-99.9)	12.3
LSIL/+	42.8 (25.0-62.5)	99.3 (98.9-99.5)	27.9 (15.8-43.9)	99.6 (99.4-99.8)	1.1
LSIL/+ and/or HC2+	96.3 (79.1-99.8)	97.7 (97.1-98.1)	21.3 (14.6-29.8)	99.9 (99.8-99.9)	12.8
ASCUS/+	50.0 (31.0-68.9)	98.9 (98.6-99.2)	23.7 (14.0-36.9)	99.7 (99.4-99.8)	3.7
ASCUS/+ and/or HC2+	100.0 (84.5-100)	97.4 (96.8-97.8)	20.0 (13.8-27.9)	100.0 (99.8-100)	15.4

* Disease prevalence for the whole group = 0.6%

Legends of table 5

CIN2/+ → CIN2, CIN3, carcinoma

Pap → Conventional cytology by Pap smear

HC2 → Hybrid capture

Neg → negative result

Pos → positive result

Only HC2 + → calculations for all positive HC2 women, irrespective cytology

HSIL/+ → high-grade squamous intraepithelial lesion or more severe cut-off

LSIL/+ → low-grade squamous intraepithelial lesion or more severe cytologic cut-off

ASCUS/+ → atypical squamous cells of undetermined significance or more severe cytologic cut-off

Test cutt-off for cytology and HC2 combinations → if each of the tests or both together were positive, test was considered positive; if both negative, test was considered negative.

Table 6: Predicted outcomes of triage strategies considering cases with diagnosis of “disease” (CIN2/+), according age groups. Data presented as percentages (95% confidence interval).

Population	Test cutt-off		Sensivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Colposc. referral
	Pap	HC2					
Age > 40y (*0.3%)	HSIL/+	POS	90.1 (51.7-98.4)	99.0 (98.4-99.4)	25.0 (10.6-47.0)	100 (99.7-100)	6.3
	LSIL/+	POS	90.1 (51.7-98.4)	98.8 (98.2-99.2)	21.4 (9.0-41.4)	100 (99.7-100)	6.5
	ASCUS/+	POS	90.1 (51.7-98.4)	98.6 (97.9-99.1)	19.3 (8.1-38.0)	100 (99.7-100)	8.5
Age > 30y (*0.6%)	HSIL/+	POS	94.7 (71.9-99.7)	98.6 (98.2-99.0)	28.6 (18.2-41.5)	99.9 (99.8-99.9)	4.4
	LSIL/+	POS	94.7 (71.9-99.7)	98.5 (98.0-98.8)	26.5 (16.8-38.8)	99.9 (99.8-99.9)	4.5
	ASCUS/+	POS	96.6 (78.1-99.5)	98.3 (97.7-98.7)	23.7 (14.9-35.1)	100 (99.8-100)	5.4
Age 18 - 40y (*0.8%)	HSIL/+	POS	92.3 (62.1-99.6)	98.8 (98.3-99.2)	26.1 (14.7-41.4)	99.9 (99.7-99.9)	13.1
	LSIL/+	POS	92.3 (62.1-99.6)	99.1 (98.6-99.4)	31.6 (18.1-48.8)	99.9 (99.7-99.9)	13.4
	ASCUS/+	POS	94.1 (69.9-99.2)	97.8 (97.2-98.3)	16.2 (9.0-27.0)	100 (99.8-100)	15.3

* Group prevalence of disease.

Legends of table 6

CIN2/+ → CIN2, CIN3, carcinoma
 Pap → Conventional cytology by Pap smear
 HC2 → Hybrid capture
 Neg → negative result
 Pos → positive result

- HSIL/+ → high-grade squamous intraepithelial lesion or more severe cut-off
- LSIL/+ → low-grade squamous intraepithelial lesion or more severe cytologic cut-off
- ASCUS/+ → atypical squamous cells of undetermined significance or more severe cytologic cut-off

Test cut-off for cytology and HC2 combinations → if each of the tests, or both together, were positive, test was considered positive; if both negative, test was considered negative.

REFERENCES

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999 Jan-Feb;49(1):33-64.
2. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1989 Aug 18;262(7):931-4.
3. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: A systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132:810-819.
4. Davey DD, Naryshkin S, Nielsen ML, Kline TS. Atypical squamous cells of undetermined significance: interlaboratory comparison and quality assurance monitors. *Diagn Cytopathol* 1994 Dec;11(4):390-6.
5. Kinney WK, Manos MM, Hurley LB, Ransley JE. Where's the high-grade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal Papanicolaou diagnoses. *Obstet Gynecol* 1998 Jun;91(6):973-6.
6. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, Manos MM, Scott DR, Kuman RJ, Kiviat NB, Stoler M, Glass AG, Rush BB. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology. Correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types. *Am J Clin Pathol* 1994 Aug;102(2):182-7.
7. *Human Papillomaviruses*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1995. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 64.
8. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995 Jun 7;87(11):796-802.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 Sep;189(1):12-9.
10. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994 Feb;169(2):235-40.
11. Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis* 1996 Nov;174(5):927-36.

12. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999 Jul 3;354(9172):20-5.
13. Coutlee F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* 1997 Aug;8(2):123-41.
14. Trofatter KF Jr. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* 1997 May 5;102(5A):21-7.
15. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995 Mar;172(3):946-54.
16. Wright TC, Sun XW, Koulos J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 1995 Feb;85(2):202-10.
17. Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, Sherman ME, Shieh-Ngai J, Kurman RJ, Ransley JE, Fetterman BJ, Hartinger JS, McIntosh KM, Pawlick GF, Hiatt RA. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 1999 May 5;281(17):1605-10.
18. Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Bratti C. Human papillomavirus testing as a screening tool for cervical cancer. *JAMA* 2000 May 17;283(19):2525-6.
19. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD, Lorincz AT. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000 Jan 5;283(1):87-93.
20. Broder S. From the National Institutes of Health. Report of the 1991 Bethesda Workshop. *JAMA* 1992 Apr 8;267(14):1892.
21. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 1973;8:301-28.
22. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4):293-299.
23. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-28.

24. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995 Apr 1;141(7):680-9.
25. Hakama M, Chamberlain J, Day NE, Miller AB, Prorok PC. Evaluation of screening programmes for gynaecological cancer. *Br J Cancer* 1985; 52:669-673.
26. Cuzick J. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *JAMA* 2000 Jan 5;283(1):108-9.

6. VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO

Captura híbrida para pesquisa de DNA de HPV no rastreamento do câncer de colo uterino

Resumo

Contexto Sabe-se que o Papiloma Vírus Humano (HPV) é agente causador do câncer de colo uterino. Milhares de mulheres em todo mundo continuam apresentando-se em estágios avançados desta doença, com alta morbimortalidade associada. O empenho em melhorar a validade do rastreio para este tipo de câncer é indispensável. São necessárias estratégias de triagem para colposcopia efetivas, para identificar uma minoria de mulheres que têm doença clinicamente significativa, evitando seguimento excessivo para as outras.

Objectivo Determinar sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do rastreio através da testagem do DNA do HPV para os tipos carcinogênicos mais comuns em uma cidade do sul do Brasil.

Planejamento As análises laboratoriais foram conduzidas em 2000, utilizando-se técnicas citológicas e a captura híbrida, seguidas de colposcopia para mulheres com qualquer achado cervical anormal, para detectar todas as lesões intraepiteliais e câncer. A testagem de HPV foi realizada com mascaramento em relação aos achados clínicos.

Cenário Campo Bom, Rio Grande do Sul.

Participantes 4.725 mulheres adultas, não gestantes e sexualmente ativas, sem história de histerectomia, foram submetidas ao rastreio convencional inicial através da citologia pelo método de Papanicolaou. Ao mesmo tempo, amostras foram coletadas para o teste da captura híbrida de segunda geração (CH2). Aquelas mulheres que tiveram achados anormais foram encaminhadas para colposcopia, com biópsia quando fosse identificada lesão.

Resultados Em geral a CH2 foi positiva em 488 (11,7%) de 4.169 resultados analisados, e em 446, a citologia convencional foi negativa. Portanto, o percentual de triagem para colposcopia, exclusivamente baseado em um caso positivo de CH2, seria de 11,7%. A maior parte das amostras da citologia convencional foi considerada negativa (96,2%); 109 foram classificadas como ASCUS (2,6%); 22 foram LSIL (0,5%); e apenas 18 mostraram HSIL/+ (HSIL e carcinoma) (0,4%). A avaliação dos resultados dos testes mostrou as seguintes prevalências percentuais: 98,5% - normais; 0,8% - neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC1); e 0,6% - doentes (NIC2/+). Nesta população, foi demonstrado que o teste de HPV com CH2 1,0 pg/mL detectou 24 (88,9%) de 27 casos de lesões de alto grau (NIC2/+). A combinação da citologia convencional e do teste de CH2 mostrou melhores resultados do que cada um dos dois testes utilizados isoladamente como rastreio para lesões cervicais de alto risco.

Conclusões Como a prevalência de infecção por HPV varia na população, o rendimento da CH2 para detecção de lesões de alto grau e câncer pode variar substancialmente, com implicações para sua utilidade relativa aos outros métodos de rastreio para câncer de colo de útero. Neste estudo, o rastreio através da citologia, considerando-se resultados de ASCUS/+ combinados com teste de CH2 positivo, demonstrou sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%. Com esta combinação o percentual de encaminhamentos para colposcopia foi de 15,4%. Nas regiões nas quais o câncer de colo uterino persiste com incidência e mortalidade elevados, a combinação da citologia e da CH2 pode ser uma alternativa para tentar melhorar o controle desta doença.

O câncer de colo uterino é a segunda ou terceira causa de mortalidade por câncer em mulheres do mundo inteiro, com cerca de 400.000 casos diagnosticados por ano [1]. O rastreamento efetuado pela citologia de Papanicolaou (CP) é universalmente reconhecido como um método efetivo para a prevenção do câncer de colo de útero, quando realizado repetidamente. Desde o final da década de 50, a classificação dos achados do CP evoluiu muito, sendo atualmente empregada rotineiramente a classificação pelo sistema de Bethesda [2].

A maior parte dos óbitos por câncer de colo uterino ocorrem em mulheres que nunca realizaram um CP. Porém, alguns óbitos acometem mulheres que haviam tido rastreamento recente com resultado negativo. Muitos resultados falso-negativos ocorrem por erros na coleta do material, quando as células anormais não chegam a ser coletadas ou não são transferidas para a lâmina de vidro. Outros resultados falso-negativos estão relacionados a erros de detecção. Os erros de coleta e de detecção estão reduzidos quando o rastreamento é repetido frequentemente [3].

O objetivo principal do rastreamento com CP e dos procedimentos de seguimento é evitar o câncer de colo de útero pela identificação e tratamento das lesões intraepiteliais de alto-grau (HSIL). Existe um consenso geral por parte dos responsáveis pela promoção de saúde das diferentes populações de que um diagnóstico citológico de HSIL deva ser avaliado através de colposcopia e biópsia. Entretanto, CPs com resultado inválido ou equívoco são um problema sério, persistindo um grande desafio de saúde pública.

O resultado anormal mais comum do CP é um dos equívocos: atipias de células escamosas de significado incerto (ASCUS) [4]. A maioria dos CPs com ASCUS refletem um processo reativo e benigno, mas em até 10% dos casos, pode estar relacionado a uma lesão de alto grau subjacente (HSIL/+) [5]. Também foi demonstrado que o diagnóstico de ASCUS pode ser pouco reprodutível, mesmo entre citopatologistas experientes [6]. O principal objetivo do rastreamento com CP e das medidas de seguimento é o de prevenir o câncer cervical através da identificação e do tratamento de lesões intra-epiteliais de alto-grau (pré-malignas). Considerando a proporção relativamente alta de casos de HSIL que estão associados com um CP lido como ASCUS, a triagem efetiva dos casos assim diagnosticados é essencial. Apesar de a avaliação colposcópica de todos os casos de ASCUS fornecer o maior índice de proteção às pacientes, a frequência do diagnóstico de ASCUS torna esta opção inviável, mesmo em países desenvolvidos.

Durante os últimos 20 anos, demonstrou-se que os mesmos papilomavírus humanos (HPVs) genitais carcinogênicos causam quase todos os casos de câncer de colo de útero [7]. A infecção por HPV é uma doença sexualmente transmitida muito comum, com mais de 35 tipos genitais descritos; porém apenas 10 ou 15 tipos causam câncer [8,9]. A maior parte das infecções, incluindo aquelas com anormalidades citológicas, resolvem-se espontaneamente, retornando o teste de DNA de HPV para negatividade (frequentemente com soroconversão) [10,11]. Mais raramente, uma infecção por HPV

progredir até uma lesão epitelial de alto grau [12]. As lesões de alto grau tipicamente contêm tipos carcinogênicos de HPV. Uma vez estabelecidas, estas lesões tendem a persistir. Muitas lesões de alto grau se tornam tumores cervicais invasores.

Devido a esta forte associação entre HPV e câncer, adicionada às dificuldades inerentes ao rastreamento com CP, verifica-se a necessidade de se desenvolver métodos válidos para o diagnóstico da infecção por HPV. A infecção por HPV é, atualmente, medida mais sensivelmente por detecção de DNA. Vários métodos para detecção do DNA viral foram descritos durante a última década, cada um dos quais permitindo a detecção de um amplo espectro de tipos de HPV, mas nenhum preencheria totalmente as expectativas [13]. Métodos de amplificação, principalmente PCR (*polymerase chain reaction*), são os métodos mais sensíveis para detectar o DNA de HPV. Eles permitem a detecção de infecções com baixa carga viral e ainda minimizam o risco de classificação errônea das etapas de infecção do HPV. Entretanto, devido aos problemas de contaminação frequentes, com consequentes resultados falso-positivos, e ao custo inaceitavelmente alto da tecnologia de amplificação, esta técnica não tem sido aplicada de forma rotineira para a pesquisa de DNA de HPV nos laboratórios diagnósticos [14].

Inúmeros estudos sugeriram que o teste da Captura Híbrida (Digene Diagnostic, Silver Spring, MD, Estados Unidos) de segunda geração (CH2) para tipos de HPV associados a câncer seja útil para identificação de pacientes com diagnóstico citopatológico de ASCUS que tenham uma lesão de alto grau subjacente [15,16]. A testagem do DNA de HPV pode ser realizada a partir do material residual da coleta de citologia cervical de rotina. A maioria dos casos de alto-risco poderia ser encaminhado para colposcopia baseado em um rastreamento único [17].

O nível de sensibilidade analítica ótimo para a testagem do HPV através da Captura Híbrida de segunda geração foi estudado. O ponto de corte escolhido para positividade do teste foi de 1 pg/mL [18]. Devido ao fato de a prevalência de HPV variar conforme a população estudada, o valor preditivo positivo de um teste de HPV para a detecção de HSIL/+ pode variar substancialmente, com implicações para a sua utilidade relativa aos outros métodos de rastreamento [19]. As melhoras na sensibilidade do rastreamento através do uso de métodos mais novos ou combinações devem melhorar a sensibilidade clínica na detecção de neoplasias intraepiteliais cervicais graus 2 e 3 (NIC2 e NIC3), e de câncer de colo uterino.

Este estudo foi realizado para fornecer dados relativos ao desempenho da testagem do DNA de tipos oncogênicos do HPV em uma população da cidade de Campo Bom, localizada ao sul do Brasil. A testagem do HPV foi avaliada como rastreamento de lesões de alto-risco e câncer, com estimativas de sensibilidade e especificidade, assim como taxas finais de encaminhamentos para colposcopia, tomando-se como base diferentes pontos de corte em cada método de rastreamento. As pacientes participantes deste estudo foram rastreadas através de uma coleta única de material para a citologia convencional pelo método de Papanicolaou (CP) e da Captura Híbrida de segunda geração (CH2), e então examinadas com colposcopia e biópsia, caso algum resultado dos exames de rastreamento fosse

considerado anormal. O teste diagnóstico considerado “padrão-ouro” para cada paciente foi baseado nos resultados de histologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

População estudada

As mulheres foram selecionadas para o estudo a partir de uma campanha pública especial, com duração de 2 meses, realizada em Campo Bom – RS, Brasil. Esta cidade tem 48.000 habitantes e foi escolhida devido ao interesse de governantes e habitantes em melhorar o controle do câncer de colo uterino no município. Em seis meses todos os exames de citologia e colposcopia, assim como CH2 haviam sido concluídos. O período de seguimento está em andamento, mas os dados de inclusão na coorte são aqui apresentados.

Todas as mulheres sexualmente ativas com idade ≥ 18 anos que se apresentaram para o rastreio foram elegíveis para o estudo. Os critérios de exclusão foram histerectomia prévia, gestação atual, incapacidade mental e recusa em consentir a participação. Todas as pacientes forneceram consentimento pós-informação escrito. A assinatura do consentimento pós-informação incluía uma discussão sobre os riscos e benefícios da participação e a possibilidade de ser chamada no futuro para novos encontros.

Coleta das amostras

Para o CP convencional, todas as amostras de células exfoliadas do colo uterino foram coletadas por um grupo de dez pessoas (médicos e enfermeiras). Foi utilizada uma escova chamada Digene Cervical Brush (Digene Corporation, Silver Spring, MD, Estados Unidos) e o material foi preparado de forma convencional. A mesma escova era então colocada em um recipiente especial que continha o meio apropriado para congelamento e transporte da amostra: STM (*Specimen Transport Medium* - Digene Corporation, Silver Spring, MD). A amostra era enviada congelada para São Paulo – Brasil, para a testagem do DNA do HPV através da técnica da CH2 (Hybrid Capture 2, Digene Corporation).

Avaliação Clínica

Os CPs foram examinados no Brasil por um citopatologista experiente (C.G.Z.). O diagnóstico citológico foi descrito conforme a classificação de Bethesda então vigente (publicada em 1989) [2], como negativo (dentro dos limites de normalidade ou alterações celulares reativas), atipias de células escamosas de significado incerto (ASCUS), lesão intraepitelial escamosa de baixo-grau (LSIL), lesão

intraepitelial escamosa de alto-grau (HSIL), ou carcinoma. As amostras de 8 pacientes foram consideradas insuficientes para o exame.

Indicação de colposcopia

Conforme os resultados do rastreio tornavam-se disponíveis, as seguintes pacientes eram encaminhadas para colposcopia: (1) diagnóstico citopatológico de ASCUS (ou AGUS – células glandulares atípicas de significado incerto) ou anormalidade mais grave; ou (2) CH2 considerada positiva como superior a 1pg/mL (RLU/CO \geq 1,0).

Um ginecologista experiente (B.N.) realizou todas as colposcopias e biópsias dirigidas para lesões visíveis. O material coletado nas biópsias, obtido por qualquer neoplasia intraepitelial suspeita na colposcopia, era colocado em frascos separados e pré-identificados, contendo formalina 10%. Foi realizada curetagem endocervical de acordo com o juízo clínico nos casos em que não era possível visualizar adequadamente toda a zona de transformação ou toda a extensão da lesão. As biópsias foram feitas por *punch-biopsy* e subseqüentemente preparadas e coradas com hematoxilina-eosina. As condutas clínicas foram indicadas pelo diagnóstico patológico feito no local. A interpretação histológica da biópsia foi conduzida utilizando-se a combinação do sistema de Bethesda [2,20] e a terminologia de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) [21].

As pacientes com citologia de HSIL ou anormalidades mais severas e aquelas com um diagnóstico histológico de lesão de alto grau (NIC2 ou 3) ou carcinoma foram referidas para tratamento convencional. Os médicos responsáveis pela assistência à população de Campo Bom tomaram as decisões terapêuticas finais e de seguimento. Das 4.725 mulheres estudadas, 610 foram encaminhadas a colposcopia, e 77,5% efetivaram o exame.

Como uma medida de controle de qualidade, uma amostra randômica de cerca de 5% das pacientes foram encaminhadas à colposcopia a fim de testar a sensibilidade do protocolo de rastreio. Nenhuma lesão de baixo ou de alto-grau foi encontrada nestas mulheres (n=207), sugerindo que o protocolo de rastreio combinado era sensível em detectar anormalidades.

Houve cegamento do colposcopista no que diz respeito à indicação do procedimento (CP alterado, CH2 alterada, ou amostra de controles com ambos negativos).

Diagnóstico Final

O diagnóstico final dos casos foi baseado na combinação dos diagnósticos do rastreio e na revisão das biópsias colposcópicas por patologista (C.G.Z.). As lesões glandulares foram raras (15 casos), tendo sido portanto somadas ao diagnóstico de lesão escamosa equivalente (ASCUS/AGUS). Os casos “normais” foram considerados todas as mulheres com rastreio negativo, mulheres

encaminhadas à colposcopia por ASCUS nas quais qualquer lesão tenha sido excluída, e ocasionalmente mulheres foram rebaixadas a “resultado negativo” após revisão histológica de um diagnóstico citológico positivo inicial. “NIC1” incluiu as lesões de baixo grau confirmadas por histologia. “Doença” foi definida como lesões de alto grau (NIC2 e NIC3) e câncer. Dos 28 casos classificados como “doença”, 4 tiveram confirmação histológica de câncer.

A maioria (4.658 mulheres) tinha rastreio com resultados totalmente negativos, sem necessidade subsequente de colposcopia ou biópsia, e foi classificada como “normal”. De 644 colposcopias realizadas, 472 apresentaram achados colposcópicos classificados como normais durante o exame e, de 178 biópsias realizadas, 111 tiveram histologia normal.

Testagem do DNA do HPV

Houve cegamento do principal investigador quanto a todas as testagens realizadas.

O ensaio utilizado na CH2 inclui uma mistura de sondas gênicas para os seguintes tipos de HPV associados a câncer de colo uterino: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. A FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos aprovou o valor de 1 pg de DNA de HPV por mililitro de solução como ponto de corte para um resultado positivo [19]. O *kit* para detecção de HPV de baixo-risco não foi utilizado neste estudo (tipos 6, 11, 42, 43 e 44), porque não acrescentaria informações adicionais para decisões clínicas sobre como tratar lesões consideradas de alto risco.

Uma alíquota do material conservado no STM foi desnaturada para produzir DNA em fitas únicas. Estas fitas de DNA são expostas a sondas gênicas específicas para reconhecer os tipos de interesse de HPV (no teste em questão são testados 13 tipos de HPV oncogênicos). Reagindo com cada sonda gênica específica, o DNA do microrganismo eventualmente presente no material que está sendo analisado forma híbridos de RNA:DNA. Estes híbridos são então capturados por anticorpos específicos que revestem as paredes dos tubos. A seguir, um segundo anticorpo ligado à fosfatase alcalina é adicionado ao sistema. Os híbridos imobilizados pelos anticorpos primários reagem com os anticorpos secundários (conjugados à fosfatase alcalina), formando um substrato estável. Este processo permite a detecção dos híbridos DNA:RNA ligados por quimioluminescência ultra-sensível. São consideradas positivas ($RLU/PC \geq 1,0$) as amostras cuja emissão de fótons (expressa como unidades relativas de luz – RLU) é igual ou superior a média dos controles positivos (PCs), que consistem de 10 pg/mL de DNA de HPV 16 testado em triplicatas. Níveis virais mais altos podem ser estimados na razão do sinal do teste sobre seu controle positivo, mas a estimativa de valores muito mais baixos não costuma ser possível devido à falta de linearidade na extrapolação de valores menores [19]. O ponto de corte é então 1 pg/mL. Neste estudo, o ensaio foi usado como informação qualitativa, assim toda amostra que apresentou razão de RLU/CO igual a 1 ou superior foi considerada positiva.

Análise dos dados

O principal desfecho deste estudo foi a definição histológica de casos de NIC2/+ (NIC2, NIC3, carcinoma *in situ* ou invasor). Esta decisão baseou-se na prática clínica nacional, a exemplo do que ocorre em outros países, pela qual estas lesões consideradas de alto risco requerem tratamento.

A distribuição binomial foi utilizada para computar os intervalos de confiança para proporções (por ex. sensibilidade). O teste de qui-quadrado de Pearson para tabelas de contingência foi utilizado para examinar as associações entre as variáveis categóricas (por exemplo, resultados de CP versus resultados de CH2). O teste de qui-quadrado de Yates foi utilizado para tabelas 2x2. A estatística de qui-quadrado para as tendências foram calculadas para testar a significância dos dados com ordenação evidente (como o aumento da severidade do diagnóstico citológico relacionado à positividade do HPV). Todos os testes estatísticos são de duas caudas e foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Um total de 4.806 mulheres compareceram para o estudo, das quais 4.725 foram consideradas elegíveis. A tabela 1 mostra as características da população. Quanto à etnia, 96,5% eram de origem caucasiana. A variação de idade foi de 18 a 78 anos, com uma mediana de 37 anos de idade. Cerca de 70% da população tinha até 45 anos de idade. A idade mediana da primeira relação sexual foi de 18 anos, com 61,5% das mulheres relatando apenas um parceiro sexual ao longo da vida e 5,3% das mulheres relatando cinco ou mais parceiros. Das mulheres estudadas, 23,6% tiveram três ou quatro gestações e apenas 10% tiveram pelo menos cinco. O método contraceptivo principal foi hormonal, com 45,2% das mulheres. Preservativos masculinos foram usados para contracepção somente por 8% delas. Poucas mulheres (18%) foram alguma vez fumantes.

Resultados da captura híbrida de segunda geração (CH2)

A CH2 foi realizada em 4.286 (90,7%) das 4.725 mulheres consideradas elegíveis. Estudando as 439 perdas para este exame, 435 (99,1%) tinham citologia normal, 3 (0,7%) tinham ASCUS e 1 (0,2%) tinha HSIL/+. Destes quatro resultados de citologia anormal, duas biópsias estavam alteradas. O caso de HSIL/+ teve biópsia confirmatória de “doença” (NIC2/+) e um dos ASCUS teve histologia de NIC1.

A positividade da CH2, considerando-se como ponto de corte 1,0 pg/mL, esteve fortemente associada aos resultados do rastreio realizado através da citologia convencional (CP) e ao diagnóstico histológico final. Em geral, o teste de CH2 foi positivo apenas em 488 (11,7%) dos 4169 resultados analisados. Os percentuais de CH2 positiva foram 11,1% nas mulheres com CP negativo, 16,5% com resultado do CP inicial de ASCUS (antes da confirmação histológica), 36,4% nas lesões de baixo grau

(LSIL), e 72,2% nas lesões consideradas de alto grau (HSIL ou mais grave) – Tabela 2 – $p < 0,001$. A triagem para colposcopia exclusivamente baseada em resultados positivos de CH2 teria sido 11,7%.

Resultados da citologia

As amostras para o CP foram coletadas de 4608 (97,5%) das 4725 mulheres estudadas. Houve apenas 8 amostras consideradas insatisfatórias (0,2%).

A tabela 2 mostra os resultados citológicos comparados aos da CH2 para HPV. A maioria dos CP foram negativos (4012 casos - 96,2%); 109 foram classificados como ASCUS (2,6%); 22 foram LSILs (0,5%); e apenas 18 mostraram HSILs/+ (HSIL e carcinoma) (0,4%). Houve uma relação crescente entre o aumento da positividade do HPV na CH2 e o aumento da severidade do diagnóstico do CP: 11,1% dos resultados citológicos negativos, 16,5% de ASCUS, 36,4% de LSIL, e 72,2% de CP com HSIL/carcinoma eram positivos para HPV de alto-risco. Das 4012 mulheres que apresentaram resultado de CP normal, 3566 (88,9%) tinham CH2 negativa ($p < 0,001$). A triagem de mulheres para a colposcopia, baseada exclusivamente em um resultado de citologia de ASCUS/+ teria sido 3,7%.

Resultados da histologia

Baseado nos resultados dos testes de rastreio efetuados na primeira visita e no algoritmo do protocolo, das 4169 pacientes analisadas, 110 foram triadas para colposcopia (3,7%) por CP anormal (ASCUS/+), 449 (10,7%) por CH2 com resultado positivo, e 39 (0,9%) pelos resultados dos dois exames combinados. Em apenas 181 casos a colposcopia evidenciou a presença de lesão, a qual foi então biopsiada (29,6% de todas as colposcopias indicadas). Não houve lesões de alto grau identificadas nas colposcopias realizadas no grupo controle randômico negativo (ambos exames de rastreio negativos).

Biópsias dirigidas foram realizadas caso qualquer lesão intraepitelial fosse identificada durante o exame colposcópico. Se a biópsia demonstrasse a presença de NIC2/+ a paciente era encaminhada a tratamento.

Os resultados obtidos pela histologia estão representados nas tabelas 3 e 4. Quanto mais grave o diagnóstico histológico, mais frequentemente a CH2 foi positiva ($p < 0,001$). Houve apenas três casos em que a CH2 foi negativa e o diagnóstico histológico de lesão de alto grau. A comparação entre a citologia e a histologia também mostra certa concordância entre ambas, porém menos clara do que com a CH2. De 17 casos de CP com HSIL/+, 11 (64,7%) tiveram confirmação histológica de doença. Entretanto, de 28 casos de diagnóstico histológico de doença, 14 (50,0%) apresentavam CP normal ($p < 0,001$).

Prevalência da doença

Ficou estabelecido que as biópsias dirigidas por colposcopia forneceriam o diagnóstico de certeza, conforme sugerido em estudos prévios [22]. A avaliação de 176 biópsias produziram as seguintes prevalências percentuais baseadas no diagnóstico histológico: 62,5% - sem lesão patológica na biópsia; 21,6% - NIC1 (lesão histológica de baixo grau); 15,9% - Doença (NIC2, NIC3 e carcinoma). Considerando-se o grupo geral de mulheres participantes do estudo, as prevalências percentuais foram 98,5% normal, 0,8% NIC1 e 0,6% doença.

Com o uso da CH2, 11,7% das mulheres teriam sido encaminhadas à colposcopia quando comparadas a apenas 0,6% para citologia de HSIL/+. Utilizando-se um ponto de corte mais baixo na citologia, o diagnóstico de ASCUS/+, 3,7% das mulheres seriam encaminhadas à colposcopia. Para a combinação de ASCUS no CP e CH2 positiva, a taxa de referência para colposcopia seria de 15,4%.

Sensibilidade dos testes

A sensibilidade dos testes varia na dependência do ponto de corte para um resultado ser considerado positivo, assim como na definição de doença a ser detectada. Neste protocolo, o resultado de ASCUS/+ e a CH2 positiva foram utilizados como ponto de corte para a triagem citológica para colposcopia. A tabela 5 mostra os efeitos das diferentes estratégias de triagem, considerando os casos classificados histologicamente como “doença” (NIC2/+). Para os cálculos foram utilizados os seguintes pontos de corte: CH2 positiva em 1 pg/mL e/ou citologia de ASCUS/+, LSIL/+ ou HSIL/+. Os valores calculados para os diferentes grupos etários estão apresentados. O percentual de mulheres que teriam sido encaminhadas para colposcopia em cada um dos subgrupos também é mencionado.

O teste de CH2 para HPV foi positivo em 488 mulheres, resultando em uma sensibilidade de 88,9% para este método de triagem (IC 95% = 69,7 a 97,1%). A citologia foi menos sensível: 39,3% (IC 95% = 22,1 a 59,3%) apresentaram diagnóstico de HSIL/+. Dos três casos de NIC2/+ com resultado de CH2 negativo, dois tinham diagnóstico citológico de HSIL/+ e um de ASCUS.

Com o uso da CH2, 11,7% das mulheres teriam sido encaminhadas para colposcopia, comparado com apenas 0,6% para citologia de HSIL/+. A citologia avaliada nos pontos de corte de HSIL/+ ou LSIL/+ foi muito menos sensível do que a CH2 (sensibilidade da citologia de 39,3 e 42,8%, *versus* 88,8%, respectivamente) e encaminhou um número bem menor de mulheres para colposcopia. A citologia também foi um pouco mais específica que a CH2 (98,1% para CH2, 99,8% para HSIL/+, 99,3% para LSIL/+ e 98,9% para ASCUS/+). No ponto de corte mais baixo da citologia, ASCUS/+, a sensibilidade para NIC2/+ foi de 50,0% (IC 95% = 31,1 a 68,9%), com 3,7% das mulheres sendo encaminhadas para colposcopia.

Quando utilizada a combinação dos dois métodos de rastreio (CH2 e citologia), a sensibilidade aumentou significativamente (para 96,3 a 100%), com uma pequena perda na especificidade (que variou de 97,4 a 97,9%, dependendo do ponto de corte da citologia). O encaminhamento para colposcopia quando os dois testes de rastreio são utilizados em combinação foi maior, atingindo percentuais em torno de 12 a 15%. Salienta-se que a prevalência percentual de “doença” nesta população foi de 0,6%.

O valor preditivo negativo foi bastante alto em todas as categorias (99,6 a 100%). Conforme esperado, o valor preditivo positivo foi mais alto no grupo HSIL/+ e mais baixo no ASCUS/+, quando combinados à CH2+: 64,7% (IC 95% = 38,6 a 84,7%) e 20,0% (IC 95% = 13,8 a 27,9%), respectivamente.

Os cálculos foram repetidos para diferentes grupos etários, uma vez que a infecção por HPV é transmitida sexualmente. Sendo assim, infecções agudas e transitórias (não relacionadas à prevalência de lesões de alto grau e câncer) tendem a ter pico de frequência em mulheres mais jovens [19]. É interessante observar que as lesões de alto risco nesta população (NIC2/+) foram mais prevalentes entre as mulheres mais jovens, com 0,8% no grupo etário de 18 a 40 anos, 0,6% nas mulheres com idade maior que 30 anos e 0,3% em mulheres com idade maior que 40 anos.

Conforme demonstrado na tabela 6, o desempenho do teste de HPV combinado com a citologia tende a ser um pouco melhor nas mulheres com mais de 30 anos de idade. Infelizmente, o pequeno número de casos diagnosticados como “doença” em cada grupo etário limitou a análise de subgrupos. Os encaminhamentos para colposcopia para mulheres de mais de 40 anos variou de 6,3 a 8,5%, dependendo do ponto de corte utilizado para a citologia; de 4,4 a 5,4% para mulheres de mais de 30 anos; e de 13,1 a 15,3% no grupo de 18 a 40 anos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo foi realizado em uma cidade pequena do interior do Brasil – Campo Bom. Esta cidade tem um padrão de qualidade de vida relativamente bom e está localizada ao sul do país. Sua imigração mais importante foi a alemã, o que pode justificar os achados étnicos. A maioria das mulheres referiu ter tido apenas um parceiro sexual durante toda a vida e apenas 5,3% referiu mais de cinco. A idade mediana para a primeira relação sexual foi de 18 anos. Apenas 18% tinham sido alguma vez fumantes. Este padrão de comportamento de baixo-risco na população estudada deve ser considerado ao discutir-se os achados deste estudo.

Os testes de rastreio utilizados para eleger mulheres para colposcopia foram a CH2 e a citologia convencional de Papanicolaou. Neste estudo não houve revisão repetida da citologia, por grupos especialmente criados com esta finalidade [22]. Os citopatológicos foram realizados da maneira que o são rotineiramente, para evitar resultados melhores devido à otimização do exame, os quais não seriam então representativos da realidade do método realizado habitualmente nesta população. Assim, os resultados de citologia podem ser encarados como padrão para esta área geográfica, mesmo que pudessem ser potencialmente menos sensíveis do que o descrito em estudos similares. As estimativas verdadeiras de sensibilidade e especificidade dos testes são importantes porque devem ser utilizadas para determinar as recomendações clínicas, tais como frequência ótima de rastreio, manejo de anormalidades leves e uso de métodos mais novos [3].

Os valores preditivos positivo e negativo da CH2 para a detecção de lesões de alto grau e câncer dependem muito das práticas sexuais específicas para idade dentro de cada comunidade. A população selecionada para o estudo foi relativamente jovem, com mais de 70% das mulheres tendo até 44 anos de idade. Isto pode ser explicado pela forma pela qual as mulheres foram selecionadas. A campanha comunitária realizada em Campo Bom, RS, contou com anúncios nas escolas, para estimular as crianças a convidarem suas mães, assim como nas indústrias regionais, dirigidos para as trabalhadoras. As mulheres mais jovens da comunidade podem ter tido maiores chances de terem sido atingidas pela campanha e conseqüentemente serem selecionadas para a pesquisa.

Os resultados falso positivos da pesquisa de DNA do HPV obtidos pelo método da CH2 geralmente representam infecções verdadeiras sem neoplasia séria em mulheres jovens e sexualmente ativas. As infecções persistentes por HPV de alto risco acarretam risco elevado para desenvolvimento futuro de neoplasias de alto grau [12,23]. A adição da pesquisa de DNA de HPV à citologia no rastreio tem a potencialidade de ser mais efetiva em mulheres mais idosas, nas quais o pico de incidência de infecções agudas tenha passado, ou em programas de testagem repetitiva que verifiquem a persistência viral [18].

De forma geral, o teste de HPV por CH2 foi mais sensível do que a citologia convencional, utilizando-se o diagnóstico de ASCUS como ponto de corte para o diagnóstico de lesões de alto grau e câncer (88,8% *versus* 50,0%). Os resultados de sensibilidade e especificidade de nosso citopatologista colaborador (C.G.Z.) foram relativamente altos, comparando-se com os resultados na literatura descrita para citologia convencional. Em uma metanálise conduzida para avaliar a validade do rastreio em detectar o câncer cervical e lesões associadas [3], os poucos estudos que avaliaram a citologia convencional e foram conduzidos em amostras de baixa prevalência forneceram as melhores estimativas de sensibilidade e especificidade. Nestes estudos, apesar de a especificidade ter sido alta, as estimativas de sensibilidade foram muito mais baixas do que se acreditava.

Quando a CH2 foi adicionada à citologia no presente estudo, a sensibilidade aumentou significativamente, sem perdas importantes em termos de especificidade. O valor preditivo negativo

esteve próximo aos 100% em todos os grupos e o valor preditivo positivo foi mais alto nas pacientes com diagnósticos citológicos mais severos (HSIL/+).

Conforme esperado, um teste de CH2 negativo forneceu segurança de que lesões pré-malignas ou malignas não estavam presentes; mas a citologia também. O principal fator de vantagem para a CH2 pode estar em uma menor interferência da subjetividade do observador do que a citologia convencional.

A pesquisa de DNA de HPV por CH2 deve ser uma das ferramentas de rastreio mais sensíveis para a detecção de neoplasia cervical severa, especialmente se for adequada para a prevalência viral local. Esta sensibilidade alta é crítica, porque o valor preditivo de um teste negativo resultante é extremamente alto. A CH2 não deverá ser utilizada sozinha para rastreio geral de mulheres, especialmente das mais jovens, devido à alta prevalência de infecção neste grupo. Neste estudo, 47% dos resultados de CH2 positiva ocorreram em mulheres de até 30 anos (dados não apresentados). As forças complementares da pesquisa do DNA do HPV por CH2 e citologia podem melhorar a prevenção do câncer de colo uterino.

Qualquer aplicação genérica da testagem irá requerer um planejamento cuidadoso, para evitar encaminhamentos excessivos para colposcopia, baseados na detecção de infecção por HPV em seu estado benigno, que é tão comum. Utilizando-se o diagnóstico citológico de ASCUS/+ como ponto de corte para os encaminhamentos à colposcopia, apenas 3,7% das mulheres deveriam ter sido referidas para o exame. Quanto ao encaminhamento de pacientes com diagnóstico de LSIL/+, 1,1% teriam a colposcopia indicada. Conforme mencionado, a taxa de encaminhamentos para a CH2 positiva sozinha teria sido de 11,7%. Para a combinação de ASCUS/+ e CH2+, a referência para colposcopia foi de 15,4%, o que ainda é mais baixo do que o observado em outros estudos [17,22].

As falhas dos programas de rastreio citológico em eliminar a mortalidade provocada pelo câncer de colo uterino em regiões onde os métodos de prevenção estão disponíveis podem ser devidas a inúmeros fatores. Entre eles, estão a taxa de resultados falso-negativos da citologia pelo método de Papanicolaou, as falhas tanto de médicos quanto de pacientes em agir frente a um resultado anormal e talvez, mais importante, a falta de cobertura da população sob risco pelo rastreio [25]. No presente estudo, apenas os testes de rastreio foram avaliados. Eles podem ser efetuados somente quando a mulher tiver decidido visitar o serviço de saúde.

O papel potencial da testagem de DNA de HPV por CH2 no rastreio de lesões de colo uterino depende fundamentalmente da infraestrutura existente no local. Para situações nas quais não há rastreio, ou em que este é inefetivo devido à baixa qualidade da citologia ou a limitações resultantes da alta taxa de esfregaços inflamatórios, questões mais básicas tais como sensibilidade, especificidade e a simplicidade dos testes de rastreio se tornam fundamentais. Em localidades como Campo Bom, RS, onde há uma incidência relativamente baixa de lesões de alto grau, quando comparada a outras regiões do Brasil, uma melhora potencial na sensibilidade do rastreio deve ser

discutida com muito interesse, dentro do amplo conjunto de medidas que devem ser debatidas e desenvolvidas para atingir melhor controle do câncer de colo uterino.

Tabela 1: Características da população estudada

Variável	No. - %
Idade	variação 18 – 78 anos de idade (Mediana 37 anos)
Grupos etários	18-24 anos = 13,8% 25-34 anos = 27,0% 35-44 anos = 31,4% 45-54 anos = 17,9% 55-64 anos = 7,0% 65 anos ou mais = 2,2% não conhecida = 2,2%
Etnia	caucasianas = 99,5%
Idade da primeira relação sexual	mediana 18 anos de idade
Número de parceiros sexuais (por toda vida)	1 parceiro = 61,5% 2 parceiros = 19,1% 3 ou 4 parceiros = 14,1% 5 ou mais parceiros = 5,3%
Número de gestações	nenhuma = 15,2% 1-2 gestações = 50,9% 3-4 gestações = 23,6% 5 ou mais gestações = 10,2%
Métodos de contracepção	métodos hormonais = 45,2% condom = 8,0%
Foram alguma vez fumantes	18,0%

Tabela 2: Resultados da citologia (CP) comparados com os resultados da captura híbrida (CH2).

Resultados da CH2	CP Negativo	CP Positivo			Não satisfatório	Total
		ASCUS	LSIL	HSIL/+		
POSITIVO	446 11,1%	18 16,5%	8 36,4%	13 72,2%	3 37,5%	488 11,7%
NEGATIVO	3566 88,9%	91 83,5%	14 63,6%	5 27,8%	5 62,5%	3681 88,3%
Total	4012 96,2%	109 2,6%	22 0,5%	18 0,4%	8 0,2%	4169 100%

Teste qui-quadrado de Pearson

Valor 85,660

$p < 0,001$

Legendas para a tabela 2

CH2 → Captura Híbrida (ensaio de segunda geração)

ASCUS → atipias de células escamosas de significado incerto

LSIL → lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

HSIL/+ → lesão intraepitelial escamosa de alto grau ou mais severa (carcinoma)

Tabela 3: Resultados da captura híbrida (CH2) conforme a histologia em 176 pacientes submetidas a biópsia, independente do resultado do CP.

Resultados da CH2	HISTOLOGIA			Total
	NORMAL	NIC1	DOENÇA	
POSITIVO	55 49,5%	27 71,1%	24 88,9%	106 60,2%
NEGATIVO	56 50,5%	11 28,9%	3 11,1%	70 39,8%
Total	111 63,1%	38 21,6%	27 15,3%	176 100%

Teste qui-quadrado de Pearson

Valor 16,402

p<0,001

Legendas para a tabela 3

CH2 → Captura Híbrida (ensaio de segunda geração)

NORMAL → Resultado histológico negativo

NIC1 → Lesão histológica de baixo grau (Neoplasia Intraepitelial Cervical 1)

DOENÇA → Lesão histológica de alto-grau (NIC2, NIC3, carcinoma *in situ*, carcinoma invasor)

Tabela 4: Resultados da histologia em 176 pacientes biopsiadas, considerando-se o resultado da citologia (CP).

Resultado do CP	HISTOLOGIA			Total
	NORMAL	NIC1	DOENÇA	
NORMAL	80 72,7%	23 60,5%	14 50,0%	117 66,5%
ASCUS	15 13,6%	8 21,1%	2 7,1%	25 14,2%
LSIL	11 10,0%	5 13,2%	1 3,6%	17 9,7%
HSIL/+	4 3,6%	2 5,3%	11 39,3%	17 9,7%
Total	110 62,5%	38 21,6%	28 15,9%	176 100%

Teste qui-quadrado de Pearson

Valor 36,159

p<0,001

Legendas para a tabela 4

- CH2 → Captura Híbrida (ensaio de segunda geração)
- NORMAL → Resultado histológico negativo
- NIC1 → Lesão histológica de baixo grau (Neoplasia Intraepitelial Cervical 1)
- DOENÇA → Lesão histológica de alto-grau (NIC2, NIC3, carcinoma *in situ*, carcinoma invasor)
- ASCUS → atipias de células escamosas de significado incerto
- LSIL → lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
- HSIL/+ → lesão intraepitelial escamosa de alto grau ou mais severa (carcinoma)

Tabela 5: Sensibilidade, especificidade, valores preditivos e percentual de encaminhamentos para colposcopia nos diferentes grupos (todas mulheres, resultados de CP e de CH2), para diagnóstico quando doença (NIC2/+) estiver presente. Dados apresentados em percentuais (Intervalos de Confiança para 95%)

Ponto de corte para cada teste: CP e/ou CH2	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo	Encaminhamentos à colposcopia
Apenas CH2 +	88,8 (69,7-97,1)	98,1 (97,6-98,4)	22,6 (15,3-31,9)	99,9 (99,8-99,9)	11,7
HSIL/+	39,3 (22,1-59,3)	99,8 (99,7-99,9)	64,7 (38,6-84,7)	99,6 (99,4-99,8)	0,6
HSIL/+ e/ou CH2+	96,3 (79,1-99,8)	97,9 (97,5-98,3)	23,6 (16,3-32,9)	99,9 (99,8-99,9)	12,3
LSIL/+	42,8 (25,0-62,5)	99,3 (98,9-99,5)	27,9 (15,8-43,9)	99,6 (99,4-99,8)	1,1
LSIL/+ e/ou CH2+	96,3 (79,1-99,8)	97,7 (97,1-98,1)	21,3 (14,6-29,8)	99,9 (99,8-99,9)	12,8
ASCUS/+	50,0 (31,0-68,9)	98,9 (98,6-99,2)	23,7 (14,0-36,9)	99,7 (99,4-99,8)	3,7
ASCUS/+ e/ou CH2+	100,0 (84,5-100)	97,4 (96,8-97,8)	20,0 (13,8-27,9)	100,0 (99,8-100)	15,4

* Prevalência de doença para todo o grupo = 0,6%

Legendas da tabela 5

NIC2/+ → NIC2, NIC3, carcinoma

CP → Citologia convencional de Papanicolaou

CH2 → Captura híbrida de segunda geração

Apenas CH2 + → cálculos para todas as mulheres CH2+, independente da citologia

HSIL/+ → lesão intraepitelial de alto grau ou mais severa

LSIL/+ → lesão intraepitelial de baixo grau ou mais severa

ASCUS/+ → células escamosas com atipias de significado incerto ou mais severo

Ponto de corte para combinações entre a citologia e a CH2 → se um dos dois testes ou ambos fosse positivo, teste considerado positivo; se ambos negativos, teste considerado negativo.

Table 6: Sensibilidade, especificidade, valores preditivos e percentual de encaminhamentos para colposcopias nos diferentes grupos etários, considerando casos com diagnóstico de “doença” (NIC2/+). Dados percentuais (95% confidence interval).

População	Ponto de corte		Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo	Encam. para colposcopia
	CP	CH2					
Idade > 40 anos (*0,3%)	HSIL/+	POS	90,1 (51,7-98,4)	99,0 (98,4-99,4)	25,0 (10,6-47,0)	100 (99,7-100)	6,3
	LSIL/+	POS	90,1 (51,7-98,4)	98,8 (98,2-99,2)	21,4 (9,0-41,4)	100 (99,7-100)	6,5
	ASCUS/+	POS	90,1 (51,7-98,4)	98,6 (97,9-99,1)	19,3 (8,1-38,0)	100 (99,7-100)	8,5
Idade > 30 anos (*0,6%)	HSIL/+	POS	94,7 (71,9-99,7)	98,6 (98,2-99,0)	28,6 (18,2-41,5)	99,9 (99,8-99,9)	4,4
	LSIL/+	POS	94,7 (71,9-99,7)	98,5 (98,0-98,8)	26,5 (16,8-38,8)	99,9 (99,8-99,9)	4,5
	ASCUS/+	POS	96,6 (78,1-99,5)	98,3 (97,7-98,7)	23,7 (14,9-35,1)	100 (99,8-100)	5,4
Idade de 18 a 40 anos (*0,8%)	HSIL/+	POS	92,3 (62,1-99,6)	98,8 (98,3-99,2)	26,1 (14,7-41,4)	99,9 (99,7-99,9)	13,1
	LSIL/+	POS	92,3 (62,1-99,6)	99,1 (98,6-99,4)	31,6 (18,1-48,8)	99,9 (99,7-99,9)	13,4
	ASCUS/+	POS	94,1 (69,9-99,2)	97,8 (97,2-98,3)	16,2 (9,0-27,0)	100 (99,8-100)	15,3

* Prevalência de doença no grupo.

Legendas da tabela 6

- NIC2/+ → NIC2, NIC3, carcinoma
 CP → Citologia convencional de Papanicolaou
 CH2 → Captura híbrida de segunda geração
 Neg → Resultado negativo

Pos	→ Resultado positivo
HSIL/+	→ lesão intraepitelial de alto grau ou mais severa
LSIL/+	→ lesão intraepitelial de baixo grau ou mais severa
ASCUS/+	→ células escamosas com atipias de significado incerto ou mais severo

Ponto de corte para combinações entre a citologia e a CH2 → se um dos dois testes ou ambos fosse positivo, teste considerado positivo; se ambos negativos, teste considerado negativo.

7. CONCLUSÕES

Conclusão geral

A combinação da citologia convencional e da captura híbrida de segunda geração foi superior ao uso isolado de cada um destes métodos como instrumento de detecção de lesões de alto risco para o câncer de colo uterino.

Conclusões específicas

1. Com relação à detecção de lesões de alto risco:
 - a. A citologia convencional teve uma sensibilidade de 39,3 a 50%, uma especificidade de 98,9 a 99,8%, um valor preditivo positivo de 23,7 a 64,7% e um valor preditivo negativo de 99,6%.
 - b. A captura híbrida de segunda geração teve sensibilidade de 88,8%, especificidade de 98,1%, valor preditivo positivo de 22,6% e valor preditivo negativo de 99,9%.
 - c. O uso combinado da citologia convencional e da captura híbrida de segunda geração apresentou uma sensibilidade de 96,3 a 100%, uma especificidade de 97,4 a 97,9%, um valor preditivo positivo de 20,0 a 23,6% e um valor preditivo negativo de 99,9%.

2. O percentual de referências para colposcopia a partir do rastreo é baixo quando se utiliza a citologia isoladamente (de 0.6 a 3.7%), podendo ser mais elevado quando se utiliza a CH2 (11.7%), ou quando ambos métodos são empregados em combinação (de 12,3 a 15,4%).

ANEXO I – Consentimento livre e esclarecido

Consentimento Livre e Esclarecido

RASTREAMENTO DA CÂNCER DO COLO UTERINO POR CAPTURA HÍBRIDA DE SEGUNDA GERAÇÃO (CH2)

.....
(Nome completo do paciente – preencher em letra de forma)

Idade

Prezada Senhora,

Estou lhe consultando e convidando a participar de um estudo de pesquisa intitulado “Uma nova era no rastreamento do câncer do colo uterino e doenças sexualmente transmissíveis por captura híbrida de segunda geração”. Este Estudo faz parte de uma colaboração entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Liga Feminina de Combate ao Câncer de Campo Bom. Este estudo está sendo coordenado por mim, pela Prof. Mary Clarisse Bozzetti e pelo Prof. Gilberto Schwartzmann.

Objetivo do Estudo: Rastrear o maior número possível de lesões pré-malignas no colo uterino, através do rastreamento convencional com o exame Papanicolaou associado ao teste de DNA para o HPV.

Procedimentos: Se a senhora concordar em participar deste estudo, em primeiro lugar irá responder a um questionário. A seguir irá coletar o exame Papanicolaou da mesma forma com que já vem coletando: uma escova será introduzida em seu colo uterino e estas células aí coletadas serão enviadas para exame. Pela mesma coleta será obtido material para pesquisa de DNA para HPV, Clamídia e Gonococo.

Número de Participantes: Neste estudo participarão cerca de 4000 mulheres.

Benefícios do estudo : A senhora não receberá dinheiro para participar deste estudo. Estará realizando os exames Papanicolaou e DNA gratuitamente. Estará igualmente recebendo tratamento adequado, caso venha a ser necessário, pela detecção de uma lesão em seu colo uterino, ou mesmo câncer; ou seja, caso seus exames de citologia convencional, ou exame de DNA para HPV estiverem alterados, lhe chamaremos para retornar para uma colposcopia e, se apresentar lesão em seu colo do útero, será submetida à biópsia. Caso a senhora apresente lesão de alto grau (lesão pré-maligna mais séria e ainda curável), será convidada a realizar um pequeno procedimento cirúrgico chamado conização do seu colo uterino. Este é o procedimento convencional para mulheres com estas alterações, mesmo que fora do presente Estudo.

Neste estudo, a senhora estará igualmente recebendo tratamento para doenças sexualmente transmissíveis, como Clamídia ou Gonococo, caso seu exame seja positivo para tal. A senhora também poderá contar com qualquer esclarecimento que necessite sobre seus exames pelo meu telefone 051 3113846.

Riscos de participar: O seu risco potencial na participação neste estudo é a possibilidade de ter sangramento leve após a coleta do exame Papanicolaou. No momento da coleta inicial (citologia e DNA) poderá sentir um leve desconforto como uma cólica, e pode também apresentar um leve sangramento que costuma durar não mais do que 2 dias (quando ocorrer).

Caso a senhora venha a realizar uma biópsia, poderá ter sangramento, ainda leve, por quase 15 dias, que é o tempo que leva para o colo uterino cicatrizar. Estes riscos serão controlados através da realização da coleta por pessoal experiente.

Gostaria ainda que a senhora lesse com cuidado os ítems abaixo, e caso concorde com todos, assine o presente documento:

1. Neste estudo estamos oferecendo o procedimento tradicional de coleta de células para a prevenção do câncer do colo uterino, apenas acrescentando, na mesma forma de coleta, novos métodos diagnósticos, aumentando sua chance de encontrar lesões que devam ser tratadas.
2. Estamos lhe dando a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o seu tratamento.
3. Você têm a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do Estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do seu cuidado e tratamento.
4. É dada a garantia de que a senhora não será identificada e será mantido o caráter confidencial de informação em relação à sua privacidade.

5. Foi assumido o compromisso de proporcionar-lhe informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar sua vontade em continuar participando.

6. Foi garantido que gastos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Assino o presente documento em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse. A minha assinatura neste *Consentimento Livre e Esclarecido* dará autorização ao coordenador do estudo, ao Comitê de Ética, e à organização governamental de saúde de utilizarem os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a minha privacidade.

Data: ____ de _____ de 2000.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Nome do pesquisador responsável: Dra. Bernadete Nonnenmacher.

Conselho Regional N° : 16166 (CRM)

Declaro que este formulário foi lido para _____ em __/__/__ pela Dra. Bernadete Nonnenmacher ou sua equipe, quando eu estava presente.

Assinatura da Testemunha

Assinatura de Testemunha

ANEXO II - Declaração de Helsinque VI

Associação Médica Mundial - 1964 - 2000

Adotada na 18ª Assembléia Médica Mundial, Helsinque, Finlândia (1964), alterada na 29ª Assembléia, em Tóquio, Japão (1975), 35ª em Veneza, Itália (1983), 41ª em Hong Kong (1989), 48ª Sommerset West/África do Sul (1996) e 52ª Edimburgo/Escócia (out/2000).

Texto da Declaração

A . INTRODUÇÃO

1. A Associação Médica Mundial promulgou a Declaração de Helsinque como uma proposta de princípios éticos que sirvam para orientar os médicos e outras pessoas que realizam pesquisa médica. A pesquisa médica inclui a investigação do material humano ou de informações identificáveis.
2. O dever do médico é promover e velar pela saúde das pessoas. Os conhecimentos e a consciência não de se subordinar ao cumprimento desse dever.
3. A Declaração de Genebra da Associação Médica Mundial vincula o médico com a fórmula “A saúde de meu paciente será minha principal consideração”, e o Código Internacional de Ética Médica afirma que: “Qualquer ato ou conselho que possa vir a

reduzir a resistência física ou mental de um ser humano só poderá ser usado em seu interesse”.

4. O progresso da medicina se baseia na investigação, a qual, em última instância, tem que recorrer, muitas vezes, à experimentação em seres humanos.

5. Na pesquisa biomédica, a preocupação pelo bem-estar dos seres humanos deve ter sempre primazia sobre os interesses da ciência e da sociedade.

6. O propósito principal da pesquisa biomédica em seres humanos é o aperfeiçoamento dos procedimentos preventivos, diagnósticos e terapêuticos, e também compreender a etiologia e patogenia das enfermidades. Inclusive, os melhores métodos preventivos, diagnósticos e terapêuticos disponíveis devem ser postos à prova continuamente através da investigação para que sejam eficazes, efetivos, acessíveis e de qualidade.

7. Na prática médica atual, a maioria dos procedimentos preventivos, diagnósticos e terapêuticos envolvem riscos e custos. Isto se aplica à pesquisa biomédica.

8. A pesquisa biomédica está sujeita a normas éticas que servem para promover o respeito a todos os seres humanos e para proteger sua saúde e seus direitos individuais. Algumas populações submetidas à pesquisa biomédica são vulneráveis e necessitam proteção especial. Devem-se reconhecer as necessidades particulares dos que têm desvantagens econômicas e médicas. Também se deve prestar atenção especial aos que não podem outorgar ou recusar o consentimento por si

mesmos, aos que podem outorgar o consentimento sob pressão, aos que não se beneficiarão pessoalmente com a pesquisa e aos que têm a investigação combinada com a atenção médica.

9. Os investigadores devem conhecer os requisitos éticos, legais e jurídicos para a pesquisa biomédica em seus próprios países, da mesma forma que os requisitos internacionais vigentes. Não se deve permitir que um requisito ético, legal ou jurídico diminua ou elimine qualquer medida de proteção para os seres humanos estabelecida nesta Declaração.

B. PRINCÍPIOS BÁSICOS PARA TODA PESQUISA BIOMÉDICA

10. Na pesquisa biomédica é dever do médico proteger a vida, a saúde, a intimidade e a dignidade do ser humano.

11. A pesquisa biomédica que envolve seres humanos deve estar de acordo com os princípios científicos geralmente aceitos e deve se apoiar em um profundo conhecimento da bibliografia científica, em outras fontes de informação pertinentes, assim como na experimentação adequadamente conduzida com animais ou em laboratório, quando seja oportuno.

12. Ao pesquisar, há que se prestar atenção adequada aos fatores que possam prejudicar o meio ambiente. Deve-se cuidar também do bem-estar dos animais utilizados nos experimentos.

13. O projeto e o método de todo procedimento experimental em seres humanos deve ser formulado claramente em um protocolo experimental (projeto de pesquisa). Este deve ser enviado para consideração, comentários, orientação, e, quando seja oportuno, aprovação por um comitê de avaliação ética especialmente designado, que deve ser independente do investigador, do patrocinador ou de qualquer tipo de influência indevida. Subentende-se que esse comitê independente deve atuar em conformidade com as leis e regulamentos vigentes no país onde se realiza a pesquisa. O comitê tem o direito de controlar o experimento em curso. O investigador tem a obrigação de proporcionar informação do controle ao comitê, em especial sobre todo incidente adverso grave. O investigador também deve apresentar ao comitê, para que a revise, toda informação sobre financiamento, patrocinadores, filiações institucionais, outros possíveis conflitos de interesse e incentivos para as pessoas envolvidas com o estudo.

14. O projeto de pesquisa deve sempre fazer referência às considerações éticas pertinentes, e deve indicar que tenham sido observados os princípios enunciados nesta Declaração.

15. A pesquisa biomédica que envolve seres humanos deve ser desenvolvida somente por pessoas cientificamente qualificadas e sob supervisão de um médico clinicamente competente. A responsabilidade pelos seres humanos deve recair

sempre em uma pessoa com capacitação médica, nunca nos participantes da investigação, mesmo que tenham outorgado seu consentimento.

16. Todo projeto de pesquisa biomédica que envolve seres humanos deve ser precedido de uma cuidadosa comparação dos riscos calculados com os benefícios previsíveis para o indivíduo ou para outros. Isto não impede a participação de voluntários sãos na investigação. Os projetos de todos os estudos devem estar disponíveis para o público.

17. Os médicos devem se abster de participar de projetos de investigação em seres humanos a menos que estejam seguros de que os riscos inerentes tenham sido adequadamente avaliados e de que seja possível enfrentá-los de maneira satisfatória. Devem interromper o experimento em andamento se observarem que os riscos implicados são mais importantes que os benefícios esperados, ou se existem provas conclusivas de resultados positivos ou proveitosos.

18. A pesquisa biomédica envolvendo seres humanos só deve ser realizada quando a importância de seu objetivo for maior que o risco inerente e os custos para o indivíduo. Isto é especialmente importante quando os seres humanos são voluntários saudáveis.

19. A pesquisa biomédica só se justifica se existirem possibilidades razoáveis de que a população, sobre a qual a investigação se realiza, poderá se beneficiar de seus resultados.

20. Para tomar parte em um projeto de pesquisa, os indivíduos devem ser participantes voluntários e informados.

21. Sempre deve ser respeitado o direito de proteção à integridade dos participantes da investigação. Devem ser tomadas todas as formas de precaução para resguardar a privacidade dos indivíduos, a confidencialidade da informação do paciente e para reduzir ao mínimo as conseqüências da pesquisa sobre sua integridade física e mental, e sua personalidade.

22. Em toda investigação em seres humanos, cada indivíduo potencial deve receber informação adequada sobre os objetivos, métodos, fontes de financiamento, possíveis conflitos de interesses, filiações institucionais do investigador, benefícios esperados, possíveis riscos e sobre o desconforto que a pesquisa possa trazer. O participante em potencial deve ser informada de que tem plena liberdade para se abster de participação na pesquisa e de que é livre para suspender o consentimento sobre sua participação a qualquer momento, sem expor-se a represálias. Depois de estar assegurado que o indivíduo compreendeu a informação, o médico deve obter então, de preferência por escrito, o consentimento informado e voluntário da pessoa. Se o consentimento não pode ser obtido por escrito, o processo para obtê-lo deve ser documentado formalmente perante testemunhas.

23. Ao obter o consentimento informado para o projeto de pesquisa, o médico deve ter especial cuidado com o indivíduo que, de alguma forma, está vinculado por uma relação de dependência ou possa ter concordado sob pressão. Neste caso, o consentimento informado deve ser obtido por um médico bem informado que não

participe da investigação e que seja completamente independente nesse relacionamento oficial.

24. No caso de incapacidade legal, o investigador deve obter o consentimento informado do representante legal e de acordo com a legislação do país. Se o potencial participante for inabilitado física ou mentalmente para outorgar consentimento, ou menor de idade, não deveria ser incluído na investigação, a menos que esta seja necessária para promover a saúde da população representada e este estudo não possa ser realizado em pessoas legalmente capazes.

25. Se um potencial participante, considerado legalmente incapaz, como o caso de um menor de idade, é capaz de dar seu assentimento para participar ou não da pesquisa, o investigador deve obtê-lo, além do consentimento do representante legal.

26. A pesquisa em indivíduos dos quais não se pode obter consentimento, inclusive por representante ou com antecedência, deve-se realizar somente se a condição física e mental que impede a obtenção do consentimento informado seja uma característica necessária da população investigada. As razões específicas pelas quais se utilizam participantes na investigação que não podem outorgar seu consentimento informado devem ser estipuladas no protocolo experimental que se apresenta para consideração e aprovação do comitê de avaliação. O protocolo deve estabelecer que o consentimento para se manter na investigação deve ser obtido, com a brevidade possível, do indivíduo ou de um representante legal.

27. Tanto os autores como os editores têm obrigações éticas. Ao publicar os resultados de sua investigação, o médico está obrigado a manter a exatidão dos dados e resultados. Devem-se publicar tanto os resultados negativos como os positivos ou então, de alguma maneira, devem estar à disposição do público. Na publicação deve ser citada a fonte de financiamento, filiações institucionais e qualquer possível conflito de interesses. As informações sobre investigações que não se cinjam aos princípios descritos nesta Declaração, não devem ser aceitos para publicação.

C. PRINCÍPIOS APLICÁVEIS QUANDO A PESQUISA BIOMÉDICA SE COMBINA COM A ATENÇÃO MÉDICA.

28. O médico pode combinar a pesquisa biomédica com a atenção médica, só na medida em que tal investigação estabeleça um crédito justificado no seu valor potencial preventivo, diagnóstico ou terapêutico. Quando a pesquisa biomédica se combina com a atenção médica, as normas adicionais se aplicam para proteger os pacientes que participam da investigação.

29. Os possíveis benefícios, riscos, custos e eficácia de todo procedimento novo devem ser avaliados mediante sua comparação com os melhores métodos preventivos, diagnósticos e terapêuticos disponíveis. Isso não exclui o uso de um placebo, ou nenhum tratamento em estudos para os quais não se dispõe de procedimentos preventivos, diagnósticos ou terapêuticos comprovados.

30. Ao final da investigação, todos os pacientes que participam do estudo devem ter a certeza de que contarão com os melhores métodos preventivos, diagnósticos e terapêuticos disponíveis, identificados pelo estudo.

31. O médico deve informar cabalmente ao paciente sobre os aspectos da atenção que têm relação com a pesquisa. A negativa de um paciente a participar de uma investigação nunca deve perturbar a relação médico-paciente.

32. Quando os métodos preventivos, diagnósticos ou terapêuticos disponíveis resultaram ineficazes na atenção de um enfermo, o médico, com o consentimento informado do paciente, pode se permitir usar procedimentos preventivos, diagnósticos e terapêuticos novos ou não experimentados, se a seu juízo, isso dá alguma esperança de salvar a vida, restituir a saúde ou aliviar o sofrimento. Sempre que seja possível, tais medidas devem ser investigadas a fim de avaliar a sua segurança e eficácia. Em todos os casos essa informação nova deve ser registrada e, quando seja oportuno, publicada. Devem-se seguir todas as outras normas pertinentes desta Declaração.
