

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**“A EXPOSIÇÃO AO FUMO DE CIGARROS EM LESÕES DO COLO UTERINO:  
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE”**

**Viviane Kubiszewski dos Santos**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Clarisse Bozzetti**

**Dissertação de Mestrado**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**



**“A EXPOSIÇÃO AO FUMO DE CIGARROS EM LESÕES DO COLO UTERINO:  
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE”**

**Viviane Kubiszewski dos Santos**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Clarisse Bozzetti**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

**2010**

*Dedico esta Dissertação aos meus pais, Clarice e Rosalvino,  
pelo empenho na educação das filhas, realizando um  
sonho do qual eles foram privados.*

*Ao Marcos, meu amor, por acreditar em mim e me fazer  
acreditar que eu posso ir cada vez mais longe.*

*Amo vocês acima de tudo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Clarisse Bozzetti, pela orientação, compreensão, oportunidade e confiança.

Aos mestres com os quais convivi no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela contribuição que cada um deixou em minha vida.

À amiga Cristine Nascente Igansi, que acreditou no meu potencial, oferecendo-me seu incentivo e amizade, mesmo estando distante.

Aos meus amigos e familiares, em especial a Nilsa e Carlos Trein, pelo apoio e compreensão durante os momentos de ausência.

À amiga e colega Luciane Busine, por termos realizado juntas esta etapa.

À equipe do Posto Jardim Leopoldina – Grupo Hospitalar Conceição, que acolheu nosso projeto, empenhando-se para nos ajudar nos dias de coleta.

Às colegas do CDCT-LACEN, pela troca de experiências.

Às mulheres participantes do estudo, pela importante contribuição com a pesquisa em benefício da saúde.

Ao CNPq e CAPES por subsidiarem este trabalho, permitindo sua realização.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES .....	11
LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....	13
1.INTRODUÇÃO .....	14
2.REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1.Epidemiologia do câncer cervical.....	16
2.2.Etiologia e patogenia do câncer cervical.....	17
2.2.1.Mecanismos da oncogenicidade induzida pelo HPV.....	20
2.3.Papilomavírus Humano e lesões cervicais.....	23
2.3.1Prevenção da infecção genital pelo HPV e do câncer cervical: vacinas	26
2.4.Co-fatores da carcinogênese cervical .....	28
2.4.1.O fumo como co-fator na carcinogênese cervical .....	30
3.OBJETIVOS .....	33
3.1.Objetivo Geral .....	33
3.2.Objetivos Específicos .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	45
RESUMO .....	46
INTRODUÇÃO .....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO .....	55
CONCLUSÃO .....	58
AGRADECIMENTOS .....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
Tabela 1 .....	66
Tabela 2 .....	67
Figura 1 .....	68
Figura 2.....	68
ARTIGO EM INGLÊS .....	69

ABSTRACT.....	70
INTRODUCTION.....	71
MATERIAL AND METHODS.....	72
RESULTS .....	76
DISCUSSION.....	77
CONCLUSION .....	80
CONFLICT OF INTEREST STATEMENT .....	80
REFERENCES .....	81
Table 1 .....	87
Table 2 .....	88
Figure 1.....	89
Figure 2.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	90
ANEXO 1 .....	92
ANEXO 2.....	93
ANEXO 3.....	99
ANEXO 4.....	105

## RESUMO

A infecção do colo uterino por tipos oncogênicos do HPV é a causa principal para desenvolvimento de lesões cervicais de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL), bem como do câncer invasivo. No entanto, considerando que um grande número de mulheres infectadas por HPVs oncogênicos não desenvolve o câncer cervical, torna-se necessário verificar o papel de outros potenciais fatores de risco, como o tabagismo, no desenvolvimento desse tipo de câncer.

Este estudo de caso-controle tem como objetivo verificar a associação da exposição ativa ao tabagismo com a infecção genital pelo Papilomavírus humano e com o grau de lesões em colo uterino. Para tal, utilizamos uma amostra de 306 mulheres. O grupo caso foi composto por 84 mulheres com infecção genital pelo HPV e com alteração no exame histopatológico do colo uterino. O grupo controle corresponde a 222 mulheres HPV-DNA negativas e sem alteração ao exame citopatológico da cérvix uterina. A detecção e a genotipagem do HPV foram feitas por PCR, utilizando os *primers* GP5+/GP6+ e *primers* específicos para os HPVs 16, 18 e 31. Foi utilizada Regressão Logística Múltipla para verificar a associação das variáveis estudadas com os desfechos (i) infecção genital pelo HPV e (ii) grau de lesões cervicais.

As variáveis independentemente associadas à infecção pelo HPV foram grupo etário inferior a 35 anos (OR 4,83; IC95% 2,28-10,20) e fumo de cigarros (OR 2,80; IC95% 1,55-5,08). O fumo também mostrou-se associado ao grau de lesão cervical - HSIL (OR 14,5; IC95% 3,07-66,7;  $p=0,001$ ). A baixa escolaridade ( $p=0,06$ ) e histórico de DSIs ( $p=0,07$ ) apresentaram associação limítrofe com este desfecho.

Os resultados sugerem associação entre o fumo de cigarros com infecção genital pelo HPV e com lesões cervicais de alto grau. Esses achados relevam a importância do controle da exposição ao fumo em medidas de prevenção do câncer de colo uterino.

## ABSTRACT

The infection of the cervix by oncogenic HPV is the main cause for developing low grade cervical lesions (LSIL), high grade cervical lesions (HSIL) and invasive cancer. However, considering that a large number of women infected with oncogenic HPVs do not develop cervical cancer, it is necessary to examine the role of other potential risk factors, such as cigarette smoking, in the development of this type of cancer.

This case-control study aims to investigate the association of exposure to active smoking and genital infection with human papillomavirus and the degree of lesions in the cervix. To this end, a sample of 306 women was used. The case group comprised 84 women with genital HPV infection and with abnormal histopathology of the cervix. The control group consists of 222 HPV-DNA negative women with no alterations in the cytological examination of the uterine cervix. The HPV detection and genotyping were performed by PCR, using primers GP5 + / GP6 + and specific primers for HPV 16, 18 and 31. Multiple logistic regression was used to verify the association of variables with the outcomes (i) genital HPV infection and (ii) degree of cervical lesions. Variables independently associated with HPV infection were age <35 years old (OR 4.83; 95% CI 2.28-10.2) and cigarette smoking (OR 2.8; 95%CI 1.55-5.08). Smoking also was associated with the degree of cervical lesions - HSIL (OR 14.5; 95% CI 3.07-66.7;  $p=0.001$ ). Low education level ( $p=0.06$ ) and STIs history ( $p=0.07$ ) showed borderline association with this outcome.

The results suggest an association between cigarette smoking and genital HPV infection and high-grade cervical lesions. These findings emphasize the

importance of controlling exposure to cigarette smoking on measures to prevent cervical cancer.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

'	Minuto(s)
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
°C	Grau(s) Celsius
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASC-H</b>	<i>Atypical Squamous Cells – cannot exclude High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
<b>ASC-US</b>	<i>Atypical Squamous Cells – unknown significance</i>
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CDK</b>	<i>Cyclin dependent kinase</i>
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DST</b>	Doença Sexualmente Transmissível
<b>E2, E5-E7</b>	Proteínas produzidas na fase precoce ( <i>early</i> ) de replicação do Papilomavirus Humano
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EGFR</b>	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GHC</b>	Grupo Hospitalar Conceição
<b>HGSIL</b>	<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>

<b>HPV</b>	<i>Human Papillomavirus</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>L1</b>	Região produtora da proteína capsídica principal de fase tardia (late) L1 do genoma do HPV
<b>LACEN/RS</b>	Laboratório Central do Estado – Rio Grande do Sul
<b>LGSIL</b>	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
<b>MI</b>	Mililitro(s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Ng</b>	Nanograma(s)
<b>NIC</b>	Neoplasia Intraepitelial Cervical
<b>p53</b>	Proteína produzida pelo gene de supressão tumoral p53
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerse Chain Reaction</i>
<b>pRB</b>	Proteína inibidora da proliferação celular produzida pelo gene RB
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>VLP</b>	<i>Virus Like Particles</i>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### Tabelas:

#### **Dissertação**

Tabela 1: Funções atribuídas aos produtos dos diferentes genes do HPV.....23

#### **Artigo em português**

Tabela 1: Características da população estudada.....66

Tabela 2: *Odds Ratios* (OR) brutos e ajustados para a associação das variáveis estudadas com infecção genital por HPV.....67

#### **Artigo em inglês**

Table 1. Characteristics of the study population.....87

Table 2. Crude and adjusted Odds Ratio (OR) for the association of the studied variables with HPV genital infection.....88

### Figuras:

#### **Dissertação**

Figura 1: História natural do câncer cervical.....19

#### **Artigo em português**

Figura 1: Distribuição de fumantes de acordo com a infecção genital por HPV...68

Figura 2: Distribuição de fumantes de acordo com o grau de lesão cervical.....68

#### **Artigo em inglês**

Figure 1. Distribution of smokers according to genital HPV infection.....89

Figure 2. Distribution of smokers according to the cervical lesion grade.....89

## 1.INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino é a segunda forma de câncer que mais acomete as mulheres no mundo. (Lewis, 2004) Para o Brasil, foi estimado o surgimento de 19 mil casos no ano de 2008, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres brasileiras. (Ministério da Saúde, 2007)

A infecção persistente pelos tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano é a causa essencial, mas não isolada, para o desenvolvimento do câncer do colo uterino.(Bosch & de Sanjosé, 2002; Bosch & de Sanjosé, 2003); Ministério da Saúde, 2007) Além do carcinoma cervical, o HPV também está associado ao desenvolvimento de lesões malignas anogenitais, do trato aéreo e do trato digestório.(Scheurer *et al*, 2005; Perez, 2001)

Alguns mecanismos são descritos sobre o potencial oncogênico do HPV, destacando-se a sua capacidade de transformar e imortalizar a célula infectada após integrar o seu genoma ao genoma da célula hospedeira.(zur Hausen, 2000) Algumas proteínas virais interferem nos produtos gênicos do gene pRB e p53, importantes supressores tumorais, o que acarreta a perda de função de reparo do dano celular e controle de indução da apoptose, propiciando a formação de tumores.(zur Hausen, 2000; Janicek & Averette, 2001)

Após infectar uma célula, o HPV pode ativar sua maquinaria de replicação e/ou transformação celular, porém, muitas vezes, o vírus permanece na sua forma latente, na qual não há integração do seu genoma a cromossomos da célula hospedeira, devido ao seu DNA permanecer na forma epissomal e ao nível de expressão das proteínas virais manter-se baixo.(Wright, 2006)

A maioria das mulheres infectadas por tipos oncogênicos de HPV

oncogênicos não desenvolverá lesões de alto grau (HSIL), (Moscicki *et al*, 1998) e, as que o fazem, geralmente levam vários anos. Isso sugere a necessidade de outros fatores, além da infecção pelo HPV, para que ocorra uma transformação maligna. (Moscicki *et al*, 1998; Evander *et al*, 1995) Alguns fatores de risco epidemiológico, além do HPV, vêm sendo apontados para a gênese da neoplasia cervical, como história prévia de múltiplos parceiros sexuais, sexarca em idade precoce, multiparidade, uso de anticoncepcional oral por longo período e tabagismo. (Ministério da Saúde, 2007; Pinto *et al*, 2002)

O fumo tem sido apontado como co-fator para a carcinogênese cervical (Muñoz *et al*, 1993 ; Pinto *et al*, 2002) devido, principalmente, à sua associação a NIC 3 e à observação de derivados de nicotina no muco cervical. (Kapeu *et al*, 2009)

Elevados níveis de nicotina também foram encontrados em amostras de lavado cervical de não-fumantes, principalmente em mulheres com exposição domiciliar à fumaça do cigarro. Isso sugere que a exposição ao tabaco por meio do fumo passivo também possa representar um fator de risco para as lesões da cérvix uterina. (Jones *et al*, 1991)

Plummer e cols, em estudo multicêntrico de caso-controle, observaram que o fumo representa um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (*in situ* e invasor) em mulheres com infecção por HPV. (Plummer *et al*, 2003)

O presente estudo tem como objetivo verificar a associação da exposição ao fumo com a infecção genital pelo HPV e com as lesões de colo uterino, especificamente com o grau dessas lesões.

## 2.REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Epidemiologia do câncer cervical

O câncer de colo uterino é a segunda forma de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo, sendo que a primeira é o câncer de mama. (Lewis, 2004) É responsável por cerca de 500 mil casos novos/ano e pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres anualmente no mundo. (Ministério da Saúde, 2007) Quase 80% dos casos novos ocorrem nos países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, apresenta-se como o câncer mais comum entre as mulheres. (Lewis, 2004; Ministério da Saúde, 2007)

A incidência do câncer de colo uterino no Brasil torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos, atingindo seu pico na faixa de 45 a 49 anos de idade. Estimativas do INCA para o ano de 2008 apontaram o surgimento de, aproximadamente, 19 mil casos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres, sendo o terceiro tipo de câncer mais incidente na população feminina brasileira, considerando-se os tumores de pele não-melanoma. Para o Rio Grande do sul, foram estimados 1.610 casos novos, relativos ao ano 2008. (Ministério da Saúde, 2007)

Desconsiderando-se os tumores de pele não-melanoma, o câncer cervical é o mais incidente na região Norte (22/100.000). Nas regiões Sul (24/100.000), Centro-Oeste (19/100.000) e Nordeste (18/100.000), esse tipo de câncer ocupa a segunda posição mais frequente e, no Sudeste (18/100.000), a quarta posição. (Ministério da Saúde, 2007)

Desde o surgimento do exame citopatológico de Papanicolaou, dada sua

capacidade de detectar alterações na ecto e endocérvice, tornou-se possível a prevenção de muitos casos de câncer pela detecção precoce (Ministério da Saúde, 2002; Traut & Papanicolaou, 1943), porém sem capacidade de prevenir a infecção pelo HPV. Atribuídas ao exame de Papanicolaou, a incidência e a mortalidade devidas ao câncer cervical tiveram uma expressiva redução nos últimos 50 anos na América do Norte. (Franco *et al*, 2001)

Após o surgimento das vacinas contra a infecção genital por determinados tipos de HPV, espera-se que mais casos de câncer cervical sejam evitados, porém o real impacto da vacinação ainda necessita de mais tempo para ser avaliado.

## 2.2. Etiologia e patogenia do câncer cervical

Achados em estudos de caso-controle e de coorte, associados a evidências laboratoriais da expressão oncogênica, estabeleceram que a infecção persistente pelos tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano é a causa essencial, mas não isolada, para o desenvolvimento do câncer do colo uterino, (Bosch & de Sanjosé, 2001; Bosch & de Sanjosé, 2003; Moscicki *et al*, 1998) além de ser responsável por uma pequena fração de casos de câncer vaginal, vulvar, peniano e anal. (Franco *et al*, 1999) Estudos multicêntricos mostraram, através do diagnóstico molecular, a presença do HPV em 99,7% das amostras de câncer cervical oriundas de diferentes regiões do mundo, sendo o tipo oncogênico HPV16 o de maior prevalência, seguido pelo HPV18. (Walboomers *et al*, 1999; Lewis, 2004)

As relações entre os genótipos do HPV podem ser expressas por meio

de árvores filogenéticas, tendo como base a homologia entre proteínas e a sequência do DNA viral. Isso serve como ferramenta para a classificação do HPV e para o entendimento de seu comportamento, como a capacidade oncogênica apresentada por alguns tipos. (Schiffman *et al*, 2005)

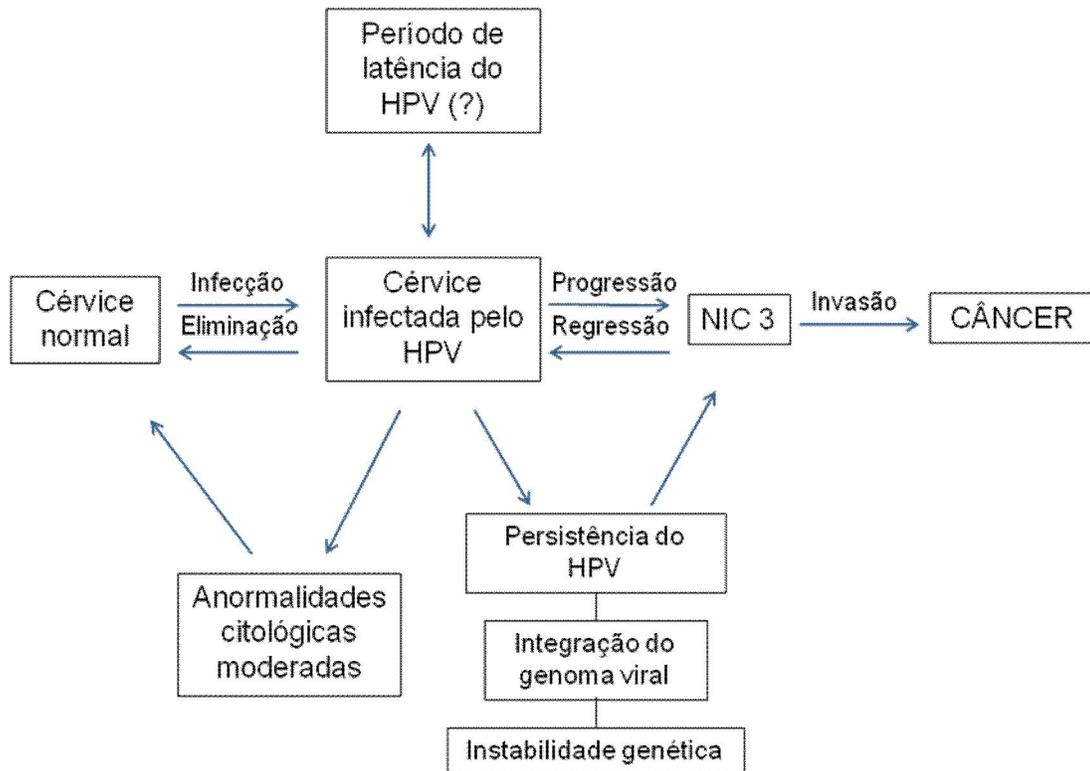
Cerca de 40 tipos de HPV são transmitidos pelo contato sexual, todavia, apenas 15 desses estão associados ao desenvolvimento de câncer cervical, sendo os tipos de alto risco HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e HPV82, enquanto o restante é considerado como de baixo risco (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108). (Muñoz *et al*, 2003)

Dos tipos de HPV que infectam o trato anogenital, o HPV 16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer do colo uterino e das lesões de alto grau. (Bosch & de Sanjosé, 2003)

A infecção anogenital pelo HPV pode ser transmitida por meio de qualquer contato pele a pele ou mucosa (Burchell *et al*, 2006; Roberts *et al*, 2007), sendo que o contato sexual sem penetração é considerado uma rota plausível de transmissão, contudo o mais comum é o contágio durante a penetração na relação sexual vaginal e/ou anal.(Winer *et al*, 2003) Evidências que corroboram a transmissão sexual do vírus apontam que mulheres cujos parceiros apresentaram câncer no pênis tem risco aumentado para o desenvolvimento de câncer cervical. (Graham *et al*,1979)

O Papilomavírus Humano tem como característica o tropismo pelas células basais de epitélio escamoso da cérvix uterina, atingindo essa camada através de microabrasões epiteliais (adquiridas principalmente durante o ato sexual). Após a infecção, o HPV é capaz de manter-se assintomático (durante o período latente) ou de induzir o desenvolvimento de diversos tipos de lesões na

pele ou mucosas (Figura 1). (Carvalho & Oyakawa, 2000; Chang, 1990; Münger *et al*, 2004)



**Figura 1:** História natural do câncer cervical. (Fonte: adaptada de Berek, 2003)

Na maioria das vezes, a infecção viral apresenta-se na forma latente (Wright, 2006) e, portanto, o diagnóstico do vírus não consegue ser obtido pelos métodos indiretos, fazendo-se necessário o uso de testes moleculares (métodos de detecção direta, como PCR e Captura Híbrida) que possibilitam definir a presença do vírus, a carga viral e a classificação em alto ou baixo risco para o potencial oncogênico. (Schmitt, 2005)

### 2.2.1. Mecanismos da oncogenicidade induzida pelo HPV

Alguns mecanismos são descritos sobre o potencial oncogênico do vírus HPV na célula hospedeira, porém, destaca-se a capacidade de transformação e imortalização celular induzida pelas proteínas de fase precoce (*early*) do ciclo viral E5, E6 e E7 dos tipos de HPV de alto risco (Tabela 1) após a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira. (zur Hausen, 2000)

A oncoproteína E5, é expressa na fase produtiva do vírus e está relacionada à expansão clonal das células infectadas. Ela insere-se na membrana da célula hospedeira e, associando-se aos receptores do fator de crescimento epitelial (EGFR), mimetiza a ação desse fator estimulando a proliferação celular. (zur Hausen, 2000)

Em sinergia com a oncoproteína viral E2, as oncoproteínas E6 e E7 ligam-se a importantes supressores tumorais inativando-os. A oncoproteína E6 interage com a proteína celular p53 marcando sua degradação pelo sistema celular mediado pela ubiquitina. (zur Hausen, 2000; Janicek & Averette, 2001; Furumoto & Irahara, 2002)

A proteína p53 atua nos pontos de controle do ciclo celular antes da replicação do DNA, em G1/S (Intérfase/Síntese), e antes da mitose, em G2/M (Síntese Proteica/Mitose) levando a uma parada nesses pontos e permitindo o reparo de danos no DNA, evitando que ele seja replicado com mutações. A parada no ciclo celular em G1, após a ativação da p53, envolve a transcrição do gene *waf1*, codificante da proteína p21<sup>Waf1</sup>. A p21<sup>Waf1</sup> associa-se às proteínas cinases dependentes de ciclina (CDKs) bloqueando o complexo CDK-cinase, com isso, inibe a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Esse

mecanismo de inibição da atividade das cinases específicas para a progressão de G1 mantém o gene do retinoblastoma hipofosforilado que, por sua vez, reprime a transcrição dos genes E2F (codificadores do fator transcricional E2F), necessários para a entrada na fase S. (Albrechtsen *et al*, 1999) Porém, se a célula avançar para a fase S, a p21<sup>Waf1</sup> é capaz de bloquear a elongação da nova fita de DNA mutado, pela inativação da DNA polimerase, durante seu processo de replicação. (Waga *et al*, 1994)

No momento em que a p53 é degradada pela função da proteína viral E6, todo o mecanismo supracitado de parada do ciclo celular em G1 é perdido e a célula segue com a síntese de um DNA mutado, quando deveria parar para correção ou para apoptose.

Além dos efeitos sobre a p53, a proteína oncogênica E6 também tem a capacidade de ativar a telomerase, enzima responsável pela replicação dos telômeros, porções finais dos cromossomos. (Boulet *et al*, 2007) A E6 ativa a telomerase por meio da transcrição do gene da transcriptase reversa da telomerase (hTert). (Fehrmann & Laimins, 2003) Em células somáticas com atividade normal, a telomerase está inibida, com isso leva a uma contínua redução do tamanho do cromossomo por não replicar os telômeros, o que resulta na morte celular, por outro lado, sua ativação leva à imortalização celular. (Parsons, 2003)

Storey *et al* (1998) apontaram que um polimorfismo no gene da p53, que acarreta a variação dos aminoácidos arginina/prolina na posição 72 da proteína p53, poderia aumentar a susceptibilidade à degradação da p53 pela proteína viral E6 dos tipos de HPV de alto risco, como o HPV16 e 18. Nesse estudo, foi observado que indivíduos homocigotos para arginina eram mais susceptíveis ao

desenvolvimento de câncer associado ao HPV do que indivíduos com pelo menos um alelo para prolina. Contudo, não existem dados suficientes que comprovem esse resultado, dado que outros autores observaram associação limítrofe ou nenhuma relação entre o genótipo do códon 72 da p53 e a pré-disposição para neoplasias cervicais associadas ao HPV. (Yamashita *et al*, 1999; Klug *et al*, 2009) Em recente publicação, Klug e cols (2009) interpretam que o risco atribuído ao polimorfismo p53-Arg72 apontados por diversos estudos devem-se muito mais a erros metodológicos do que a fatores biológicos ou clínicos.

Outro importante mecanismo de transformação celular é a inativação da proteína do retinoblastoma (pRB), que ocorre mediada pela ligação com a oncoproteína viral E7, estimulando a síntese de DNA pela célula hospedeira e ativando as células quiescentes para o ciclo celular. (zur Hausen, 2000)

Como efeito da interação das oncoproteínas virais E6 e E7 com as proteínas celulares p53 e pRB, a célula hospedeira perde a sua função de reparo do defeito genético e controle de indução da apoptose, propiciando a formação de tumores, decorrente da interferência na regulação do ciclo celular da célula. (zur Hausen, 2000; Janicek & Averette, 2001; Furumoto & Irahara, 2002)

A expressão das oncoproteínas virais é de suma importância para a modificação genética da célula hospedeira, como visto anteriormente. No entanto, a interação das oncoproteínas com fatores químicos e físicos de capacidade mutagênica podem contribuir para o desenvolvimento das modificações celulares que induzem o câncer. (zur Hausen, 2000)

**Tabela 1:** Funções atribuídas aos produtos dos diferentes genes do HPV.

Produto Gênico	Descrição
E1	Função helicase; essencial para a replicação viral e controle da transcrição gênica.
E2	Fator de transcrição viral; essencial para a replicação viral e controle da transcrição gênica.
E4	Interação com proteínas do citoesqueleto; montagem do vírus.
E5	Estimulação do crescimento pela interação com receptores para o fator de crescimento; <i>downregulation</i> das moléculas de superfície do HLA de classe I.
E6	Imortalização celular; degradação da p53; ativação da telomerase; efeito anti-apoptótico; indução da instabilidade genômica.
E7	Imortalização celular; interação com pRB e suas proteínas associadas; transativação dos promotores E2F dependentes; indução da instabilidade genômica.
L1	Proteína maior do capsídeo.
L2	Proteína menor do capsídeo; recruta o genoma viral para ser encapsulado; envolvida no transporte nuclear do DNA viral.

Fonte: Adaptado de Boulet *et al*, 2007.

### 2.3. Papilomavírus Humano e lesões cervicais

Entre as doenças virais sexualmente transmissíveis, a infecção genital pelo Papilomavírus Humano é a mais prevalente na população mundial sexualmente ativa. (Carvalho & Oyakawa, 2000) Na população geral, a prevalência de infecção por HPV em mulheres assintomáticas varia de 2% a

44%, (Steben & Duarte-Franco, 2007) tendo seu maior valor (44,8%) reportado em mulheres na faixa etária de 20-24 anos. (Dunne *et al*, 2007) Dunne e cols (2007) observaram uma prevalência de 26,8% de infecção por HPV em uma amostra de mulheres dos Estados Unidos pertencentes a uma faixa etária de 14 a 59 anos.

Nos Estados Unidos estima-se a existência de, pelo menos, 20 milhões de pessoas infectadas pelo HPV - sendo que quase a metade dessas pessoas está na faixa etária de 15 a 24 anos - e que, a cada ano, 6,2 milhões de pessoas sejam infectadas por esse vírus. (Weinstock, Berman & Cates, 2000)

Apesar de ser uma infecção bastante comum, estudos de coorte sugerem que, aproximadamente, 70% das infecções pelo HPV sejam eliminadas dentro de 2 anos, sendo que as infecções pelos tipos de baixo risco regridem mais facilmente (em torno de 90%). (Moscicki *et al*, 1998)

As lesões mais frequentes estão associadas à infecção pelos tipos de HPV de baixo risco, sendo representadas pela verruga comum (papiloma) e pela verruga genital ou condiloma. Aproximadamente 90% das verrugas genitais são causadas pelos HPV 6 e 11. (von Krogh, 2001) Essas lesões têm crescimento limitado e com frequência regridem espontaneamente. O período de incubação é muito variável e pouco se sabe sobre a latência ou persistência desse vírus no organismo. (Oriel, 1971)

Em 1956, Reagan e Hamonic classificaram como displasia as lesões precursoras do câncer cervical, diferenciando-as em lesões leves, moderadas e severas, baseando-se no grau de comprometimento do epitélio cervical. (Reagan & Hamonic, 1956) Richart, em 1973, propôs uma nova classificação para essas lesões, sendo que as lesões correspondentes à displasia leve foram

denominadas Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1 (NIC 1), as lesões correspondentes à displasia moderada foram denominadas NIC 2 e as lesões correspondentes à displasia acentuada ou carcinoma *in situ* foram agrupadas na classificação NIC 3. (Richart, 1973)

O sistema Bethesda, originalmente desenvolvido em 1989 e revisado em 1991, com intuito de simplificar a classificação anterior, dividiu em duas formas os resultados anormais do exame citopatológico: LGSIL (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) para as lesões de baixo grau (correspondendo a NIC 1) e HGSIL (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) para as lesões de alto grau (abrangendo NIC 2 e 3). A categorização mais utilizada atualmente no mundo foi proposta em 2001 pelo Sistema Bethesda, na qual as lesões escamosas com potencial para malignização do epitélio cervical foram divididas em 3 categorias: (Berek, 2003)

- ASC (do inglês, Atypical Squamous Cells) subdividida em:
  - ASC-US: atipia escamosa de significado indeterminado;
  - ASC-H: atipia escamosa que não permite excluir lesão de alto grau;
- LGSIL;
- HGSIL.

Os tipos de HPV de alto risco ou oncogênicos estão relacionados às alterações pré-neoplásicas classificadas como lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HGSIL) ou neoplasias intraepiteliais de grau 2 e 3 (NIC 2 e NIC 3). Essa lesão é caracterizada por diversas figuras mitóticas na metade superior do epitélio, núcleo celular irregular e hipercromático, perda da estratificação, células

basais imaturas com aumento na proporção núcleo/citoplasma entre outras. (Wright, 2006)

O carcinoma *in situ* ou NIC 3, principal lesão provocada pelo HPV na cérvix uterina, quando não diagnosticado e tratado, pode evoluir para carcinoma invasivo, responsável pela morte de muitas mulheres mundialmente. (Lewis, 2004; Bosch, Qiao & Castellsagué, 2006) Os tipos oncogênicos mais frequentemente associados a esse tipo de lesão são o HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 e HPV45, sendo o HPV16 o de maior prevalência nos cânceres cervicais. (Scheurer *et al*, 2005; Sanclemente & Gill, 2002; Oliveira *et al*, 2003)

#### 2.3.1. Prevenção da infecção genital pelo HPV e do câncer cervical: vacinas

Com o recente surgimento das vacinas Gardasil (Merck Sharp & Dohme) e Cervarix (GlaxoSmithKline), espera-se que sejam evitados muitos casos de infecção pelo HPV, bem como de casos de câncer e de lesões cervicais.

A Gardasil é uma vacina recombinante quadrivalente (HPV16, 18, 6 e 11) preparada com partículas L1 altamente purificadas semelhantes ao vírus (VLP), porém desprovidas de seu DNA. (Saslow *et al*, 2007) Os quatro tipos de HPV utilizados são bastante conhecidos da literatura pela associação às lesões genitais de alto e baixo grau. (Muñoz *et al*, 2003) Em 2006, a vacina Gardasil recebeu aprovação pelo FDA nos Estados Unidos e, no mesmo ano, pela ANVISA no Brasil.

Em estudo multicêntrico randomizado duplo-cego, utilizando a vacina L1 VLP - *virus-like particles* quadrivalente (Merck Research Laboratories), foi

constatada uma redução de 90% na incidência da infecção ou doença (lesões) pelos tipos de HPV 6, 11, 16 e 18. (Villa *et al*, 2005) Isso indica uma importante redução na aquisição do vírus e suas manifestações clínicas proporcionadas pela vacinação contra os tipos mais comuns.

Em análise de imunização apenas contra o HPV 16 (Merck Sharp & Dohme), foi constatada 100% de eficácia da vacina (L1 VLP) contra a aquisição da infecção e 94% de eficácia contra a persistência da infecção pelo HPV 16, condição necessária para a evolução de lesões tipo NIC 2 e 3. (Mao *et al*, 2006)

A vacina bivalente Cervarix (GlaxoSmithKline), também recombinante VLP-L1, confere proteção contra os tipos oncogênicos HPV16 e 18. Essa vacina bivalente apresentou-se eficaz na prevenção de lesões precursoras do câncer do colo uterino causadas pelos tipos HPV16 e 18 (Harper *et al*, 2004), entretanto não é efetiva na proteção contra as verrugas genitais, causadas por HPVs de baixo risco. Com base em estudos de fase II, a Cervarix induz altos títulos de anticorpos anti-HPV16 e 18 capazes de serem mantidos por, aproximadamente, 5,5 anos. (Harper, 2008) Em janeiro de 2008, a ANVISA concedeu aprovação a Cervarix, produzida pela GlaxoSmithKline (GSK).

Mesmo que existam diversas evidências sustentando a vacinação contra o HPV, ainda existem algumas questões que necessitam ser elucidadas, como qual a duração da imunidade proporcionada pelas diferentes vacinas, a possível imunização cruzada para outros tipos de HPV, o aumento na transmissão de outras DSTs e a possibilidade da vacinação masculina, entre outras.

#### 2.4. Co-fatores da carcinogênese cervical

A infecção pelos tipos de HPV oncogênicos foi estabelecida como causa necessária para o desenvolvimento de câncer cervical (Bosch & de Sanjosé, 2002; Walboomers *et al*, 1999; Furumoto & Irahara, 2002; Franco *et al*, 2001; McGlennen, 2000), porém o estudo de alguns co-fatores vem ganhando destaque para o entendimento dos mecanismos que aumentam o risco para o desenvolvimento desse tipo câncer. (Franco *et al*, 2001; Pinto, Tulio & Cruz, 2002)

Estudos epidemiológicos têm demonstrado, durante os 30 últimos anos, que o risco para aquisição do vírus HPV é fortemente influenciado por medidas da atividade sexual, ou seja, pelo número de parceiros sexuais, idade da primeira relação sexual e o comportamento sexual dos parceiros. (Schiffman & Brinton, 1995)

Dentre os fatores vinculados à infecção pelo HPV encontram-se: tabagismo, resposta imune, início precoce da atividade sexual, uso prolongado de contraceptivos orais, co-infecção com outras doenças sexualmente transmissíveis e multiplicidade de parceiros sexuais. (Franco *et al*, 2001; Pinto, Tulio & Cruz, 2002; Ministério da Saúde, 2007)

O elevado número de parceiros sexuais durante a vida representa um importante fator para a aquisição do vírus HPV (Burk *et al*, 1996; Scheurer *et al*, 2005). Alguns estudos mostraram uma forte associação entre o número de parceiros sexuais e a infecção viral (Bauer *et al*, 1991; Burk *et al*, 1996; de Sanjosé *et al*, 2003), enquanto outros estudos encontraram associação

moderada, fraca ou nula (Rohan *et al*, 1991; Lazcano-Ponce *et al*, 2001; Silins *et al*, 2004).

O papel das co-infecções por outras doenças de transmissão sexual ainda não está elucidado. Entretanto, é plausível aceitar que a resposta inflamatória e o dano tecidual causado por outros patógenos possam contribuir no desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical. (Castle *et al*, 2002; Rosa *et al*, 2009). Essa proposta é fortalecida pela associação observada por Castle *et al* (2002) entre cervicites e lesão intra-epitelial de alto grau.

A resposta imune do hospedeiro também é um fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. A maioria das infecções cervicais por HPV (com anormalidade citológica ou não) é eliminada ou suprimida pela imunidade mediada por células dentro de 1 a 2 anos após a exposição. (Stanley, 2006)

A prevalência da infecção pelo HPV, bem como a progressão para as displasias cervicais ou mesmo o câncer, é mais frequente em mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana – HIV, quando comparado a mulheres imunocompetentes, mostrando o papel fundamental da imunidade do hospedeiro frente ao processo neoplásico. (Nappi *et al*, 2004)

O fato de que a maioria (até 90%, em alguns estudos) das mulheres infectadas por tipos de HPV oncogênicos não desenvolverá lesões de alto grau (Moscicki *et al*, 1998) e, as que o fazem, geralmente levam vários anos, sugere que outros fatores sejam necessários, além da infecção pelo HPV, para que ocorra uma transformação maligna no epitélio do colo uterino. (Moscicki *et al*, 1998; Evander *et al*, 1995)

#### 2.4.1. O fumo como co-fator na carcinogênese cervical

O fumo de cigarros vem sendo apontado como co-fator para a carcinogênese da cérvix uterina (IARC, 2002; Muñoz *et al*, 1993; Pinto *et al*, 2002). Os principais achados que sugerem essa atuação como co-fator devem-se à associação do fumo com lesões cervicais de alto grau (Coker *et al*, 2002; Plummer *et al*, 2003), bem como à observação de derivados de nicotina no muco cervical (Kapeu *et al*, 2009).

Uma importante observação a ser feita é o grande potencial de intervenção e redução desse co-fator por meio das campanhas anti-fumo. (Kapeu *et al*, 2009)

Elevados níveis de nicotina também foram encontrados em amostras de lavado cervical de não-fumantes, principalmente em mulheres com exposição domiciliar à fumaça do cigarro. Isso sugere que a exposição ao tabaco por meio do fumo passivo também possa representar um fator de risco para as lesões da cérvix uterina. (Jones *et al*, 1991)

Plummer e cols, em estudo multicêntrico de caso-controle, observaram que o fumo representa um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (*in situ* e invasor) em mulheres com infecção por HPV (OR=2,17; IC 95%: 1,46-3,22), contudo, não houve evidências entre o aumento do risco com o tempo de fumo, número de cigarros por dia ou a idade de iniciação do tabagismo. Nesse estudo, foi observado OR=3,19 (IC 95%: 1,35-9,54) para associação entre fumo e câncer cervical *in situ*, e OR=2,4 (IC 95%: 1,32-3,14) para associação entre fumo e câncer cervical invasivo. (Plummer *et al*, 2003)

Uma reanálise de 23 estudos epidemiológicos, envolvendo 13 mil

mulheres com carcinoma cervical e 23 mil mulheres sem a doença, estimou um risco relativo de 1,6 (IC 95% 1,48–1,73;  $p < 0,001$ ) para fumantes desenvolverem o câncer do colo uterino quando comparadas a mulheres que nunca fumaram. Também foi observado um risco aumentado para ex-fumantes desenvolverem câncer cervical (RR=1,12; IC 95% 1,01–1,25). (*International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2006*)

Estudos apontam que o fumo tenha diferente comportamento em relação à origem epitelial do câncer do colo do útero, não apresentando associação com adenocarcinoma, apenas com carcinoma de células escamosas. (Plummer *et al*, 2003; IARC, 2002; *International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2006*) Essa diferença também é observada em tumores da cavidade nasal e esôfago, nos quais o fumo está fortemente associado ao carcinoma de células escamosas. (IARC, 2002)

Entre os diferentes tipos de cigarro, o cigarro de tabaco é o mais comum. (IARC, 2002) Um dos componentes altamente mutagênicos e cancerígenos do tabaco, o benzopireno, um hidrocarboneto aromático policíclico, apresentou-se como modulador do ciclo do HPV em um trabalho realizado por Alam e cols (2008). Esse achado torna-se importante, pois a modulação provocada pelos benzopirenos pode ser um fator para a persistência da infecção viral (Alam *et al*, 2008), potencializando a integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro, o que aumenta a instabilidade celular e o subsequente processo de carcinogênese da cérvix uterina. (McGlennen, 2000)

Além do efeito mutagênico sobre as células (Alam *et al*, 2008; McGlennen, 2000), sugere-se que o fumo seja responsável pela redução da imunidade local. Em análise imunohistoquímica, Poppe e cols observaram que a

elevada concentração dos derivados do tabaco estaria relacionada à redução numérica das células de Langerhans e de linfócitos T<sub>helper</sub> no epitélio escamoso de transformação da cérvix uterina. (Poppe *et al*, 1995)

A redução provocada nessas células, importantes mediadores da imunidade celular e humoral, poderia influenciar no processo de aquisição e persistência da infecção pelo HPV. (Alam *et al*, 2008; Poppe *et al*, 1995) Contudo, além da contagem celular, é necessário considerar as interações de algumas citocinas na resposta imune local contra a infecção pelo HPV e contra a neoplasia cervical. (Szarewski *et al*, 2001)

Embora existam diversos trabalhos relacionando fumo e câncer cervical (Coker *et al*, 2002; Jones *et al*, 1991; Muñoz *et al*, 1993; Plummer *et al*, 2003; *International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer*, 2006), ainda não são claros os mecanismos que levam à contribuição do fumo de cigarros na carcinogênese cervical, bem como se há diferença quanto a sua utilização, como número de cigarros/dia, idade de início e duração do tabagismo.

Vários países estão vivenciando um importante problema de saúde pública: o aumento na prevalência de fumantes, especialmente entre mulheres jovens (Dobson *et al*, 1998; Ernster *et al*, 2000). Esse aumento pode gerar um grave impacto sobre a incidência de câncer do colo uterino, enfatizando a necessidade de intensificar esforços sobre a prevenção do fumo e do tabagismo passivo, principalmente em países em desenvolvimento (Ernster *et al*, 2000), os quais detêm elevadas taxas de mortalidade por câncer cervical (Lewis, 2004; Ministério da Saúde, 2007).

### **3.OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo Geral

- Verificar a associação da exposição ao fumo (de cigarros) com a infecção genital pelo Papilomavírus humano e com a presença de lesões em colo uterino e, especificamente, com o grau da lesão cervical.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a associação da exposição ativa ao fumo (de cigarros) com a presença de lesões de colo uterino na população estudada;

- Verificar a associação da exposição ativa ao fumo (de cigarros) com a presença de infecção genital por HPV em geral e, especificamente pelos tipos oncogênicos 16, 18 e 31.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam S, Conway MJ, Chen HS, Meyers C. The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol*. 2008 Jan; 82(2):1053-1058.

Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L, Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*. 1999 Dec 13; 18(53):7706-17.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*. 1991;265(4):472-7.

Berek JS. Simplification of the new Bethesda 2001 classification system. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Mar; 188(3 Suppl):S2-5; discussion S6-7.

Bosch FX, Qiao YL, Castellsagué X. Chapter 2: The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Int J Gynecol Obstet*. (2006) 94 (Suppl 1):S8-S21.

Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep*. 2002; 4:175-183.

Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31):3-13.

- Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(11):2006-11.
- Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24 (suppl 3): S52–61.
- Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis.* 1996;174(4):679-89.
- Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural 2000.
- Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, *et al.* A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1406-14.
- Chang F. Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol.* 1990; 43:269-276.
- Coker AL, Bond SM, Williams A, Gerasimova T, Pirisi L. Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev.* 2002;26(2):121-8.
- de Sanjosé S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N, *et al.* Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis.* 2003; 30(10):788-93.

- Dobson AJ, Kuulasmaa K, Moltchanov V, Evans A, Fortmann SP, Jamrozik K, *et al.* Changes in cigarette smoking among adults in 35 populations in the mid-1980s. WHO MONICA Project. *Tob Control*. 1998 Spring; 7(1):14-21.
- Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, *et al.* Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007 Feb; 297(8):813-819.
- Ernster V, Kaufman N, Nichter M, Samet J, Yoon SY. Women and tobacco: moving from policy to action. *Bull World Health Organ*. 2000; 78(7):891-901.
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G, *et al.* Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171:1026-30.
- Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003 Aug 11; 22(33):5201-5207.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999 Nov; 180(5):1415-1423.
- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001; 164(7):1017-1025.
- Furumoto H, Irahara M. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *J Med*

- Invest. 2002 Aug; 49(3-4):124-133.
- Graham S, Priore R, Graham M, Browne R, Burnett W, West D. Genital cancer in wives of penile cancer patients. *Cancer*. 1979 Nov; 44(5):1870-4.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. *Lancet* 2004; 364:1757–65.
- Harper DM. Prophylactic human papillomavirus vaccines to prevent cervical cancer: review of the Phase II and III trials. *Therapy* 2008; 5:313-24.
- IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol.83. Lyon, France: IARC, 2002.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15; 118(6):1481-95.
- Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin*. 2001 Mar-Apr; 51(2):92-114.
- Jones CJ, Schiffman MH, Kurman R, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Elevated nicotine levels in cervical lavages from passive smokers. *Am J Public Health*. 1991

- Mar; 81(3):378-379.
- Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, *et al.* Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive cervical cancer? A nested Case-Control Study within Nordic Biobanks. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 480–488.
- Klug SJ, Rensing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SM, *et al.* TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol.* 2009 Aug;10(8):772-784.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, *et al.* Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 2001; 91(3):412-20.
- Lewis MJ. A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Washington, D.C.: Pan American Health Organization - PAHO. 2004.
- Mao C, Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DA, Wiley DJ, *et al.* Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2006; 107:18–27.
- McGlennen, R.C. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med.* 2000; 20(2):383-406.
- Ministério da Saúde. Prevenção do Câncer do Colo do Útero: Manual Técnico – Profissionais da Saúde. 2002.

- Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. 2007.
- Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, *et al.* The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *JPediatr.* 1998 Feb; 132(2):277-284.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, *et al.* Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol.* 2004 Nov; 78 (21):11451-11460.
- Muñoz N, Bosch FX , de Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Muñoz MT, *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993; 2:423–431.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, *et al.* Epidemiologic Classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6):518-527.
- Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Aug 1; 121(2):226-32. Epub 2005 Jan 18.
- Oliveira LHS, Rodrigues EVM, Lopes APTAS, Fernandez AP, Cavalcanti SMB. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *Sao Paulo Med J.* 2003; 121(2):67-71.

- Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis.* 1971 Feb; 47(1):1-13.
- Parsons HA. Telômeros, telomerase e câncer. *Rev Fac Cien Med Sorocaba.* 2003; 5(1): 54-59.
- Perez LA. Genital HPV: Links to cervical Cancer, Treatment, and Prevention. *Clin Lab Sci.* 2001 Summer; 14(3):183-186.
- Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(1):73-78.
- Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX, *et al.* Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control.* 2003; 14: 805-814.
- Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 39(1):34-8.
- Reagan JW, Hamonic MJ. Dysplasia of the uterine cervix. *Ann N Y Acad Sci.* 1956 Mar 30;63(6):1236-44.
- Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. [Review] *Pathol Annu.* 1973; 8:301-328.
- Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, *et al.* Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007 Jul; 13(7):857-61. Epub 2007 Jul 1.

- Rohan T, Mann V, McLaughlin J, Harnish DG, Yu H, Smith D, *et al.* PCR-detected genital papillomavirus infection: prevalence and association with risk factors for cervical cancer. *Int J Cancer*. 1991; 49(6):856-60.
- Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzetti MC, Silva FR, Silva BR. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2009 maio; 25(5):953-964.
- Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002 May; 16(3):231-240.
- Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG, *et al.* American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. *CA Cancer J Clin*. 2007; 57:7-28.
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Sep-Oct; 15(5):727-746.
- Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*. 1995 Nov 15;76(10 Suppl):1888-1901.
- Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, *et al.* The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005 Jun 20; 337(1):76-84.
- Schmitt VM. Papilomavírus Humano. *Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, v.1, p.135-147.

- Silins I, Wang X, Tadesse A, Jansen KU, Schiller JT, Avall-Lundqvist E, et al. A population-based study of cervical carcinoma and HPV infection in Latvia. *Gynecol Oncol*. 2004; 93(2):484-92.
- Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar 30; 24 Suppl 1:S16-22.
- Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology [Review]. *Gynecol Oncol*. 2007 Nov; 107(2):S2-5.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998 May 21; 393(6682):229-234.
- Szarewski A, Maddox P, Royston P, Jarvis M, Anderson M, Guillebaud J, Cuzick J. The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. *BJOG*. 2001 Mar; 108(3):295-303.
- Traut HF, Papanicolaou GN. Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Cal West Med*. 1943 Aug; 59(2):121-122.
- Villa L, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*. 2005 May; 6:271-278.
- von Krogh G. Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *Eur J*

- Dermatol. 2001; 11:598–604.
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994 Jun 16; 369(6481):574-8.
- 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; 189:12-19.
- Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod health*. 2004; 36 (1):6-10.
- Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*. 2003 Feb 1; 157(3):218-26. Errata em: *Am J Epidemiol*. 2003 May 1; 157(9):858.
- Wright TC Jr. Chapter 3: Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. *Int J Gynecol Obstet*. 2006; 94:S22-S31.
- Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, *et al.* Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis*. 1999 Sep; 20(9):1733-1736.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in

early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May; 92(9):690–698.

## **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

### **“A exposição ao fumo de cigarros em lesões do colo uterino: um estudo de casos e controles”**

Viviane Kubiszewski dos Santos<sup>1</sup>, Mary Clarisse Bozzetti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Social - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

## RESUMO

**Objetivos:** Verificar a associação da exposição ativa ao tabagismo com a infecção genital pelo Papilomavírus humano e com o grau de lesões em colo uterino.

**Materias e métodos:** Trata-se de um estudo de caso-controle envolvendo 306 mulheres. Os casos são 84 mulheres com infecção genital pelo HPV e com exame histopatológico alterado do colo uterino. Os controles correspondem a 222 mulheres HPV-DNA negativas e sem alteração ao exame citopatológico da cérvix uterina. A detecção e a genotipagem do HPV foram feitas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* GP5+/GP6+ e *primers* específicos para HPV 16, 18 e 31. Regressão logística múltipla foi o método utilizado para verificar a associação das variáveis estudadas com os desfechos de interesse (infecção genital pelo HPV e grau de lesões cervicais).

**Resultados:** As variáveis independentemente associadas à infecção pelo HPV foram grupo etário (OR 4,83; IC95% 2,28-10,20) e fumo (OR 2,80; IC95% 1,55-5,08). A exposição ao fumo também apresentou associação com o grau de lesão cervical - HSIL (OR 14,5; IC95% 3,07-66,7;  $p=0,001$ ). Baixa escolaridade ( $p=0,06$ ) e histórico de DSIs ( $p=0,07$ ) apresentaram associação limítrofe com este desfecho.

**Conclusão:** Os resultados sugerem uma associação entre fumo de cigarros e infecção genital pelo HPV, bem como com lesões cervicais de alto grau. Esses achados enfatizam a importância da prevenção do câncer cervical em relação às mulheres expostas ao fumo do cigarro.

**Palavras-Chave:** Lesões cervicais, HPV, fumo, caso-controle.

## INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino é a segunda forma de câncer que mais acomete as mulheres no mundo<sup>[1]</sup>, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres brasileiras.<sup>[2]</sup> É responsável por cerca de 500 mil casos novos/ano e pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres anualmente no mundo. Estimativas do INCA apontam o surgimento de, aproximadamente, 19 mil casos de câncer do colo do útero no Brasil no ano de 2008.<sup>[2]</sup>

A infecção persistente pelos tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano é a causa essencial, mas não isolada, para o desenvolvimento do câncer do colo uterino.<sup>[2,3,4]</sup>

Alguns mecanismos são descritos sobre o potencial oncogênico do HPV, destacando-se a sua capacidade de transformar e imortalizar a célula infectada após integrar o seu genoma ao genoma da célula hospedeira.<sup>[5]</sup> Determinadas proteínas virais interferem nos produtos gênicos do gene pRB e p53, importantes supressores tumorais, o que acarreta a perda de função de reparo do dano celular e controle de indução da apoptose, propiciando a formação de tumores.<sup>[5,6]</sup>

Após infectar uma célula, o HPV pode ativar sua maquinaria de replicação e/ou transformação celular. Muitas vezes, porém, o vírus permanece na sua forma latente, na qual não há integração do seu genoma a cromossomos da célula hospedeira, devido ao seu DNA permanecer na forma epissomal e ao nível de expressão das proteínas virais manter-se baixo.<sup>[7]</sup>

A maioria das mulheres infectadas por tipos oncogênicos de HPV oncogênicos não desenvolverá lesões de alto grau (HSIL),<sup>[8]</sup> e, as que o fazem,

geralmente levam vários anos. Isso sugere a necessidade de outros fatores, além da infecção pelo HPV, para que ocorra uma transformação maligna.<sup>[8,9]</sup>

Alguns fatores de risco epidemiológicos, além do HPV, vêm sendo apontados para a gênese da neoplasia cervical, como histórico de múltiplos parceiros sexuais, sexarca precoce, multiparidade, uso de anticoncepcional oral por longo período e tabagismo.<sup>[2,10]</sup>

O fumo vem sendo apontado como co-fator para a carcinogênese cervical<sup>[10,11]</sup> devido, principalmente, à sua associação com HSIL e à observação de derivados de nicotina no muco cervical.<sup>[12]</sup> Alguns estudos descrevem o fumo como importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (*in situ* e invasor) em mulheres com infecção por HPV.<sup>[13-15]</sup>

O presente estudo tem como objetivo verificar a associação da exposição ao fumo com a infecção genital pelo HPV e o com grau de lesões cervicais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Delineamento do Estudo***

Trata-se de um estudo de caso-controle, tendo como desfechos: (i) a infecção genital pelo HPV; e (ii) o grau de lesões cervicais. A população analisada faz parte de um estudo de coorte, realizado no período de Fevereiro de 2003 a Dezembro de 2006<sup>[16]</sup>, em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, Brasil. Essa população é composta por mulheres que procuraram atendimento na Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, pertencente ao Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS) com o intuito de

realizar rastreamento de câncer de colo uterino. Os critérios de entrada no estudo já foram descritos em publicação prévia <sup>[16]</sup>.

### ***Aspectos éticos***

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP – GHC), protocolo nº 112/2002 (Anexo 1). Todas as participantes assinaram um Termo de Consentimento Informado (Anexo 2).

### ***Amostra e Amostragem***

Após terem sido arroladas, as participantes responderam a um questionário epidemiológico (Anexo 3) no qual foram coletadas informações sobre características demográficas, morbidades pregressas, história de vida reprodutiva, comportamento sexual, fumo de cigarros, entre outras informações. Todas as mulheres foram submetidas a exame ginecológico para coleta de material para análise citopatológica e para pesquisa de DNA-HPV.

***Definição de Casos:*** foram considerados casos todas as mulheres da base de dados que apresentaram infecção genital pelo HPV, detectada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e que apresentaram resultado histopatológico alterado. O número de mulheres que preencheu este critério foi 84.

***Definição de Controles:*** foram considerados potenciais controles as mulheres HPV negativas e com resultado citológico sem alterações. A seleção dessas mulheres ocorreu de forma consecutiva, sendo que as mesmas foram

selecionadas e emparelhadas aos casos de acordo com o mês de entrada no estudo. Um total de 222 mulheres foi selecionado seguindo esse critério.

A amostra totalizou 84 casos e 222 controles (aproximadamente uma proporção de 3 controles para cada caso - 3:1), conferindo um poder ao estudo de 80%.

### **Coleta do material**

Foram utilizadas amostras obtidas da ecto e endocérvice, coletadas através de uma escova citológica (*cytobrush*) para exame citopatológico e para a pesquisa de DNA viral e humano. As amostras foram transportadas sob condições de baixa temperatura e armazenadas a -20°C até o momento da extração de DNA. O protocolo de extração de DNA utilizado foi descrito por Bauer<sup>[17]</sup> e Coutlée<sup>[18]</sup>. Todas as amostras foram avaliadas quanto à presença do DNA viral e genotipadas para os HPV's oncogênicos 16, 18 e 31. Foi realizada amplificação de sequência do gene da  $\beta$ -globina para indicar se havia DNA suficiente na amostra.

As informações sobre as participantes, os dados clínicos e laboratoriais (citopatológico, colposcopia e anatomopatológico) foram extraídos da base de dados existente para o estudo de coorte<sup>[16]</sup>.

### **Detecção do DNA-HPV**

As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm durante 10', ressuspendidas e digeridas utilizando solução de proteinase K (200  $\mu$ g/mL de proteinase K 'DNase/RNase free', 2% Tween 20, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,5). Após banho-maria por 18 horas a 37°C para desproteinização, as amostras foram

submetidas à inativação térmica da enzima proteinase (94°C por 10') e, então, 5 µL de amostra desproteinizada foram utilizados para amplificação pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

O DNA extraído foi amplificado através da reação de PCR contendo os *primers* biotinilados GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') para detecção da região L1 do genoma do Papilomavírus Humano, gerando amplicons de 150pb.

As reações de PCR foram realizadas com um volume total de 25µL para cada amostra, contendo 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase, *primers* na concentração de 0,5ng/µL, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, Tampão de reação (Tris-HCl 20mM pH 8,4, KCl 50mM), dNTPs 0,4mM, água q.s.p e 2µL de DNA.

Para controle da eficiência da reação de PCR, as amostras foram submetidas à amplificação do gene da proteína humana β-globina utilizando-se os *primers* biotinilados GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'), produzindo amplicons de 268pb.

Como controle positivo da reação de PCR para o HPV e β-globina, foi utilizado DNA proveniente da linhagem celular humana SiHa, positiva para DNA-HPV 16. Para controle negativo, foi utilizada água q.s.p.

As reações foram feitas em termociclador, sob as seguintes condições (conforme protocolo publicado por de Roda Husman e cols <sup>[19]</sup>, com algumas modificações): desnaturação inicial a 95°C durante 5' seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1', anelamento a 52°C por 1' e extensão a 72°C por 1'. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10', ao final da reação os amplicons foram conservados a 4°C.

As amostras positivas para DNA-HPV foram genotipadas com *primers*

específicos para HPV 16, 18 e 31.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA, pH 8.2) contendo 0,5µL/mL de brometo de etídio. A visualização pós-eletroforese foi feita sob luz ultravioleta (UV). A análise dos amplicons foi feita tomando-se como parâmetro o controle positivo de PCR e o uso de marcador de peso molecular 100pb DNA ladder.

### **Diagnóstico histopatológico das amostras do colo uterino**

O diagnóstico histopatológico foi categorizado em dois grupos considerando a gravidade da lesão.<sup>[20]</sup>

- Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – LSIL: ASCUS e NIC I);

- Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – HSIL: NIC II, NIC III e câncer cervical).

Exame colposcópico foi realizado nas pacientes que apresentaram citopatológico alterado e/ou um resultado positivo na PCR para DNA-HPV. A biópsia foi realizada apenas em pacientes que apresentaram alteração na colposcopia.

### **Análise Estatística**

Para a comparação das variáveis categóricas com a presença ou ausência dos desfechos: (i) infecção genital pelo HPV e (ii) grau de lesões

cervicais foi utilizado o teste qui-quadrado ou Exato de Fisher quando indicado. O teste *t de student* ou Mann-Whitney foi utilizado para variáveis contínuas.

*Odds Ratios* (OR) e seus correspondentes Intervalos de Confiança (IC) de 95% foram estimados para as associações das variáveis estudadas com os desfechos. Os resultados com valor de  $p < 0,20$  na análise univariada e/ou com relevância clínico-epidemiológica para os desfechos estudados foram selecionadas para o modelo de regressão logística múltipla. Foram considerados significativos os resultados com valores de  $p \leq 0,05$ .

As análises foram realizadas com uso do *software* SPSS® (versão 17.0).

## RESULTADOS

Um total de 306 mulheres foi analisado, sendo 84 casos e 222 controles.

As características da população estudada são apresentadas na tabela 1. Os casos eram mais jovens ( $p < 0,001$ ), tinham menor paridade ( $p = 0,01$ ), maior frequência de tabagistas ( $p < 0,001$ ) e maior escolaridade ( $p = 0,006$ ). Foi observada significância limítrofe para as variáveis idade de início de atividade sexual ( $p = 0,06$ ) e número de parceiros sexuais ao longo da vida ( $p = 0,07$ ).

Entre os casos, 30 (35,7%) apresentaram positividade para os HPVs de alto risco 16, 18 e 31, enquanto 54 (64,3%) apresentaram outros tipos de HPV.

Não houve diferença entre a distribuição de fumantes e não-fumantes para os casos infectados por HPV de alto risco (HPV 16, 18 e 31) ou por outros tipos de HPV. No entanto, entre as mulheres HPV negativas houve predominância de não-fumantes ( $p < 0,001$ ). (Figura 1)

Lesões de alto grau (HSIL) foram observadas em 26,2% dos casos. A maioria das pacientes com HSIL era fumante ( $p < 0,001$ ), sendo o oposto observado em mulheres com lesão de baixo grau (LSIL) ( $p = 0,002$ ). (Figura 2)

Na tabela 2, estão descritos os valores de OR brutos e ajustados, com os correspondentes IC de 95%, para a associação entre as variáveis estudadas e o desfecho infecção genital por HPV. Observou-se que a idade menor que 35 anos (OR 4,83; IC95% 2,28-10,20) e a exposição ativa ao fumo (OR 2,80; IC95% 1,55-5,08) mostraram-se independentemente associadas à infecção genital pelo HPV.

Em análise multivariada utilizando o desfecho grau de lesões cervicais, observou-se que o fumo esteve independentemente associado com HSIL (OR 14,5; IC95% 3,07-66,7;  $p = 0,001$ ). A baixa escolaridade (OR 10,0; IC95% 0,95-111,0;  $p = 0,06$ ) e história de doenças sexualmente infecciosas - DSIs (OR 4,17; IC95% 0,88-20,0;  $p = 0,07$ ) mostraram associação limítrofe com esse desfecho. A presença ou não de HPV oncogênico não se mostrou independentemente associada ao grau de lesões cervicais.

## **DISCUSSÃO**

No presente estudo observou-se que a exposição ao fumo de cigarros esteve independentemente associada tanto à infecção genital pelo HPV como ao grau da lesão do colo uterino.

Alguns fatores de risco epidemiológico vêm sendo descritos na gênese da neoplasia cervical, como histórico de múltiplos parceiros sexuais, início precoce de atividade sexual, multiparidade, uso de anticoncepcional oral por longo período e a exposição ao fumo.<sup>[2,10]</sup>

Desde a década de 60, o tabagismo vem sendo investigado como potencial fator de risco para o câncer cervical<sup>[21]</sup>. Contudo, essa associação sempre foi vista com desconfiança em decorrência da possibilidade de confusão entre fumo e atividade sexual.<sup>[22]</sup>

No presente estudo, controlando para variáveis como início da atividade sexual e número de parceiros sexuais ao longo da vida, o fumo mostrou-se independentemente associado à infecção genital pelo HPV e a HSIL. Observou-se que a maioria das pacientes com HSIL era fumante ( $p < 0,001$ ), enquanto que a presença de mulheres não-fumantes mostrou-se significativamente mais frequente ( $p = 0,002$ ) entre as com lesão de baixo grau – LSIL. Esses dados estão em concordância com achados de outros estudos<sup>[10,11]</sup>, que apontam a exposição ao fumo como co-fator para a carcinogênese cervical. Em especial, esses resultados parecem ser justificados quanto à sua associação com HSIL e à observação de derivados de nicotina no muco cervical.<sup>[12]</sup>

Diversos autores descrevem o fumo como importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (*in situ* e invasor) em mulheres infectadas pelo HPV.<sup>[13-15]</sup> Um estudo de coorte publicado por Collins *et al*<sup>[15]</sup> relata que o fumo é um fator de risco para incidência de lesões cervicais de alto grau em mulheres jovens assim que elas se tornam sexualmente ativas.

Além disso, um dos componentes altamente mutagênicos e cancerígenos do tabaco, o benzopireno, apresentou-se como modulador do ciclo do HPV em um trabalho realizado por Alam e cols<sup>[23]</sup>. Esse achado torna-se importante, pois a modulação provocada pelos benzopirenos pode ser um fator para a persistência da infecção viral<sup>[23]</sup>, potencializando a integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro, o que aumenta a instabilidade celular e o

subsequente processo de carcinogênese da cérvix uterina.<sup>[24]</sup> Syrjänen *et al*<sup>[25]</sup>, em estudo de coorte de aproximadamente 2 anos, mostraram que o fumo ativo seria um fator independente para a persistência da infecção por HPV oncogênicos (OR 1,69; IC95% 1,11-2,57;  $p=0,0014$ ), corroborando o mecanismo já descrito por outros autores<sup>[23,24]</sup>.

Coker *et al*<sup>[26]</sup> observaram que as mulheres com HSIL e LSIL (casos) eram em média mais jovens e tinham idade precoce de iniciação sexual em comparação com os controles (sem lesão). O presente estudo corrobora esses dados, pois observou-se que os casos eram mais jovens ( $p<0,001$ ) e também iniciavam a vida sexual mais precocemente ( $p=0,06$ ).

Observamos uma chance 5 vezes maior de se encontrar mulheres mais jovens (idade inferior a 35 anos) com infecção genital por HPV (OR= 4,83; IC95% 2,28-10,20). Nossos achados concordam com os dados da literatura, que apontam uma maior frequência de HPV em mulheres jovens, tendo seu maior valor na faixa etária de 20-24 anos e com tendência a declinar com o avanço da idade.<sup>[11,27-30]</sup>

Analisando uma amostra de mais de 12.000 mulheres, Sarian *et al*<sup>[31]</sup> observaram uma maior prevalência de fumantes entre as pacientes infectadas por HPV de alto risco ( $p<0,01$ ). Essa diferença não foi observada em nosso estudo, e uma possível explicação seria o fato de termos genotipado apenas os HPV 16, 18 e 31, conferindo uma pequena amostra ( $n=30$ ) de pacientes infectadas por HPV de alto risco. Em uma coorte envolvendo mais de 3 mil mulheres, Syrjänen *et al*<sup>[32]</sup> observaram que o risco para aquisição de HPV oncogênicos estava aumentado em mulheres fumantes, sugerindo que o risco atribuído ao fumo deve-

se a sua associação com a aquisição de HPV oncogênico, não com as lesões de alto grau.

Nosso estudo observou associação com significância limítrofe entre histórico de DSIs e HSIL ( $p=0,07$ ). Ainda não é claro o papel das DSIs no desenvolvimento de lesões precursoras e do câncer cervical. O mecanismo mais provável é a indução da inflamação da cérvix uterina, levando a dano por metabólitos oxidativos e diminuindo a imunidade celular.<sup>[33]</sup> Castle *et al* <sup>[34]</sup>, em estudo prospectivo, demonstraram a associação entre cervicites e lesão intra-epitelial de alto grau, sugerindo relação entre processo inflamatório e câncer cervical.

Uma limitação a ser considerada ao examinarmos os resultados do presente estudo é o pequeno número de mulheres (casos) com lesões graves. Isso pode ter contribuído para o amplo intervalo de confiança observado entre a associação de HSIL e fumo, bem como para a não observação de outras associações.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo sugerem uma associação entre a exposição ao fumo tanto para infecção genital pelo HPV, como para lesões cervicais de alto grau. Esses achados enfatizam a importância da prevenção do câncer cervical em relação às mulheres expostas ao fumo do cigarro.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Este trabalho não possui conflitos de interesse.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewis MJ. A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Washington, D.C.: Pan American Health Organization - PAHO. 2004.
2. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. 2007.
3. Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep.* 2002; 4:175-183.
4. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31):3-13.
5. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May; 92(9):690–698.
6. Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin.* 2001 Mar-Apr; 51(2):92-114.
7. Wright TC Jr. Chapter 3: Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. *Int J Gynecol Obstet.* 2006; 94:S22-S31.
8. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, *et al.* The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated

- DNA testing in adolescent and young women. *JPediatr.* 1998 Feb; 132(2):277-284.
9. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G, *et al.* Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171:1026-1030.
  10. Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(1):73-78
  11. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Muñoz MT, *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993; 2:423–431.
  12. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, *et al.* Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive cervical cancer? A nested Case-Control Study within Nordic Biobanks. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 480–488.
  13. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX, *et al.* Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control.* 2003; 14: 805–814.
  14. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, *et al.* Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix

- and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15; 118(6):1481-95.
15. Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman CB. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *Eur J Cancer*. 2009 Oct 9. doi:10.1016/j.ejca.2009.09.015
  16. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec; 199(6):617.e1-7. Epub 2008 Sep 16.
  17. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-278.
  18. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, *et al*. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiology*. 2002; 40(3): 902-907.
  19. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76:1057-1062.
  20. Woodhouse SL, Stastny JF, Styer PE, Kennedy M, Praestgaard AH, Davey DD. Interobserver variability in subclassification of squamous intraepithelial

- lesions: Results of the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Nov; 123(11):1079-84.
21. Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer—current status: a review. *Am J Epidemiol.* 1990; 131:945–57.
  22. Franco EL, Spence AR. Commentary: Smoking and human papillomavirus infection: the pursuit of credibility for an epidemiologic association. *Int J Epidemiol.* 2008 Jun; 37(3):547-8. Epub 2008 Mar 26.
  23. Alam S, Conway MJ, Chen HS, Meyers C. The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol.* 2008 Jan; 82(2):1053-1058.
  24. McGlennen, R.C. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med.* 2000; 20(2):383-406.
  25. Syrjänen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, *et al.* Factors predicting persistence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in women prospectively followed-up in three New Independent States (NIS) of the former Soviet Union. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005; 26(5):491-8
  26. Coker AL, Bond SM, Williams A, Gerasimova T, Pirisi L. Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev.* 2002;26(2):121-8.
  27. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, *et al.*

- Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007 Feb; 297(8):813-819.
28. Trottier H, Franco EL. The Epidemiology of genital Human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 1: S1-S15.
29. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of Human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S16-S24.
30. Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, DeHovitz JA, *et al.* Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*. 1996; 23:333-41.
31. Sarian LO, Hammes LS, Longatto-Filho A, Guarisi R, Derchain SF, Roteli-Martins C, *et al.* Increased risk of oncogenic human papillomavirus infections and incident high-grade cervical intraepithelial neoplasia among smokers: experience from the Latin American screening study. *Sex Transm Dis* 2009 Apr; 36(4):241-8.
32. Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, *et al.* Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. *Eur J Epidemiol*. 2007;22(10):723-35. Epub 2007 Sep 8.
33. Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzetti MC, Silva FR, Silva BR. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2009 maio; 25(5):953-964.

34. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, *et al.*  
A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1406-14.

**Tabela 1: Características da população estudada.**

<b>Variáveis</b>	<b>Casos n=84</b>	<b>Controles n=222</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Idade</b>			
<35 anos	43 (51%)	40 (18%)	
35 anos ou mais	41 (49%)	182 (82%)	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Cor da pele</b>			
Branca	65 (77,4%)	187 (84,2%)	
Não-branca	19 (22,6%)	35 (15,8%)	0,18*
<b>Escolaridade</b>			
Até 1º grau incompleto	20 (23,8%)	67 (30,2%)	
1º grau completo a 2º grau incompleto	52 (61,9%)	146 (65,8%)	<b>0,006*</b>
2º grau completo ou mais	12 (14,3%)	9 (4,1%)	
<b>Fumo</b>			
Sim	41 (48,4%)	52 (23,4%)	
Não	43 (51,2%)	170 (76,6%)	<b>&lt;0,001*</b>
<b>DSI prévia</b>			
Sim	50 (59,5%)	143 (64,4%)	
Não	34 (40,5%)	79 (35,6%)	0,5*
<b>Uso de Anticoncepcional oral</b>			
Sim	83 (99,8%)	213 (96%)	
Não	1	9 (4%)	0,12**
<b>Sexarca (Média ± DP)</b>	18,4 ±4,1	19,41 ±4,27	0,06***
<b>Parceiros sexuais na vida (Média ± DP)</b>	6 ±13,14	3,32 ±3,88	0,07***
<b>Paridade (Média ± DP)</b>	1,92 ±1,9	2,5 ±1,8	<b>0,01***</b>

\*  $\chi^2$  de Pearson; \*\* Teste Exato de Fisher; \*\*\* Teste *t-student*.

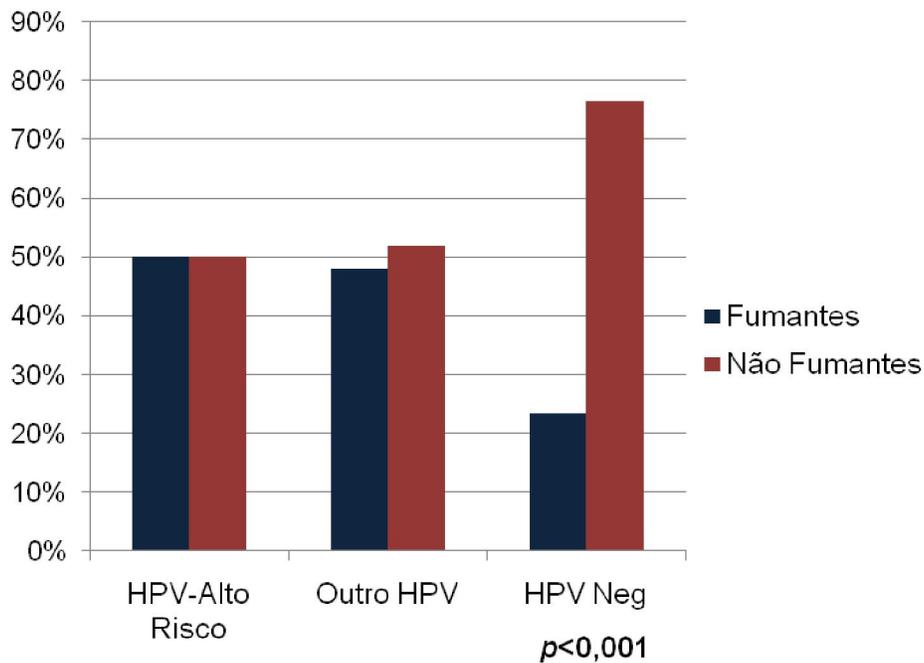
DP= desvio padrão; DSI= Doença Sexualmente Infecciosa

**Tabela 2: Odds Ratios (OR) brutos e ajustados para a associação das variáveis estudadas com infecção genital por HPV.**

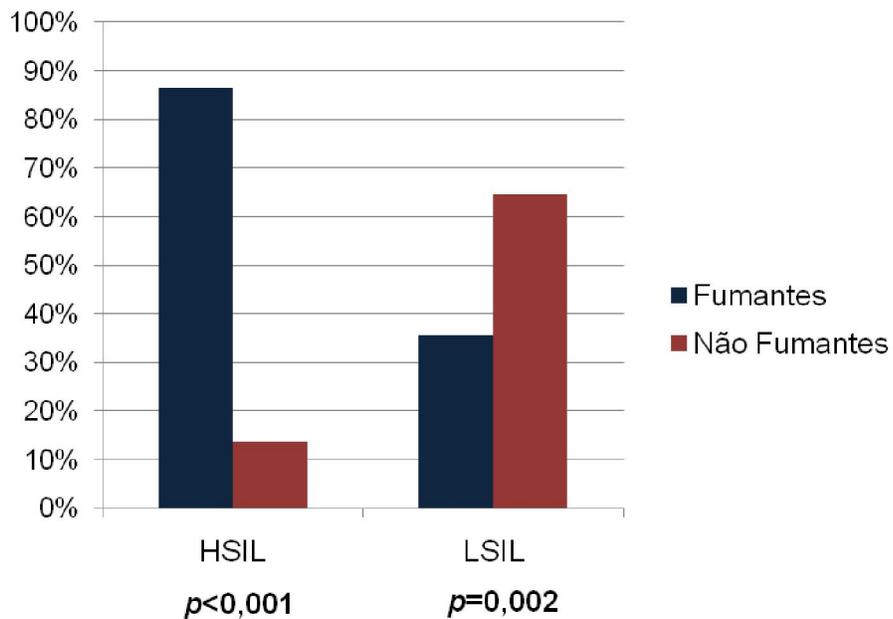
<b>Variáveis</b>	<b>OR<sub>bruto</sub> (IC 95%)*</b>	<b>OR<sub>ajustado</sub> (IC 95%)*</b>
<b>Idade</b>		
<35 anos	4,8 (2,80-8,20)	<b>4,83 (2,28-10,20)</b>
35 anos ou mais (ref.)	1,0	1,0
<b>Cor da pele</b>		
Branca (ref.)	1,0	1,0
Não-branca	0,64 (0,34-1,20)	1,85 (0,90-3,79)
<b>Escolaridade</b>		
Até 1º grau incompleto	4,47 (4,65-12,12)	3,08 (0,96-9,89)
1º grau completo a 2º grau incompleto	3,74 (1,49-9,40)	2,31 (0,82-6,52)
2º grau completo ou mais (ref.)	1,0	1,0
<b>Fumo</b>		
Sim	3,12 (1,84-5,29)	<b>2,80 (1,55-5,08)</b>
Não (ref.)	1,0	1,0
<b>DSI prévia</b>		
Sim	0,81 (0,48-1,36)	1,38 (0,75-2,53)
Não (ref.)	1,0	1,0
<b>Uso de Anticoncepcional oral</b>		
Sim	3,51 (0,44-28,11)	2,07 (0,23-18,20)
Não (ref.)	1,0	1,0
<b>Sexarca</b>		
17 anos ou mais	1,50 (0,64-3,51)	2,17 (0,76-6,17)
18 a 24 anos	1,18 (0,50-2,74)	1,84 (0,72-4,74)
25 ou mais (ref.)	1,0	1,0
<b>Parceiros sexuais na vida</b>		
6 ou mais	1,55 (0,71-3,40)	1,32 (0,39-1,46)
> 1 a 5	1,44 (0,81-2,56)	1,0 (0,39-2,53)
1 (ref.)	1,0	1,0
<b>Paridade</b>	1,21 (1,04-1,41)	1,07 (0,78-1,12)

\* IC 95% = Intervalo de confiança de 95%. DSI= Doença Sexualmente Infecciosa

**Figura 1: Distribuição de fumantes de acordo com a infecção genital por HPV.**



**Figura 2: Distribuição de fumantes de acordo com o grau de lesão cervical.**



**ARTIGO EM INGLÊS**

*This paper will be submitted to Gynecologic Oncology journal (ISSN 0090-8258).*

**CIGARETTE SMOKING AND CERVICAL CANCER: A CASE-CONTROL STUDY  
IN SOUTHERN BRAZIL**

Viviane Kubiszewski dos Santos<sup>1</sup>, Mary Clarisse Bozzetti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding Author:**

Viviane Kubiszewski dos Santos

Address: Av. Benjamin Constant, 582/14. Bairro São João, Porto Alegre, RS – Brazil

CEP: 90550-000

Phone: + 51 82273945

E-mail: [vivibiomed@yahoo.com.br](mailto:vivibiomed@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

**Objectives:** To verify the association between cigarette smoking exposure and Human Papillomavirus (HPV) genital infection and also with cervical lesion grades.

**Methods:** A case-control study was conducted involving 306 women. Cases corresponded to 84 women with genital HPV infection and cervical lesions confirmed by histopathological exam. The control group was formed by 222 women who were HPV-DNA negative and also had a normal Pap smear. HPV detection and genotyping were performed through Polymerase Chain Reaction (PCR) using *primers* GP5+/GP6+ and specific *primers* for HPV 16, 18 and 31. Multiple logistic regression was used to verify the association of variables with the studied outcomes (genital HPV infection and grade of cervical lesions).

**Results:** Age (OR=4.83; 95%CI: 2.28-10.20) and cigarette smoking (OR=2.80; 95%CI: 1.55-5.08) were independently associated with HPV infection. The variable cigarette smoking was also associated with grade of cervical lesions - HSIL (OR=14.5; 95%CI: 3.07-66.7;  $p=0.001$ ). Low educational level ( $p=0.06$ ) and previous STIs ( $p=0.07$ ) showed borderline association with the later outcome.

**Conclusion:** The results suggest an association between cigarette smoking and HPV genital infection as well as high grade cervical lesions. These findings emphasize the importance of cervical cancer prevention regarding women exposed to cigarette smoking.

**Key words:** cervical lesions, HPV, cigarette smoking, case-control study.

## INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common form of cancer to affect women in the world<sup>[1]</sup>, and third among Brazilian women.<sup>[2]</sup> It is responsible for about 500.000 new cases per year and death of approximately 230 thousand women worldwide annually. INCA estimates for the year of 2008 indicated approximately 19 thousand new cases of cervical cancer in Brazil.<sup>[2]</sup>

Persistent infection by oncogenic types of human papillomavirus is the essential cause, but not the single one, for the development of cervical cancer.<sup>[2-4]</sup>

Some mechanisms are described about the oncogenic potential of HPV, especially its ability to transform and immortalize the infected cell after integrating its genome into the genome of the host cell.<sup>[5]</sup> Certain viral proteins interfere with gene products of the gene pRB and p53, important tumor suppressors, which leads to loss of cellular damage repair and control of apoptosis induction, leading to tumor formation.<sup>[5,6]</sup>

After infecting a cell, HPV is capable of activating its machinery of replication and/or cell transformation. However frequently the virus remains in its latent status, in which there is no integration of its genome to the host cell's chromosomes due to their DNA remaining in episomal form and due to the level of viral expression proteins remaining low.<sup>[7]</sup>

Most women infected with oncogenic HPV types will not develop high-grade lesions (HSIL)<sup>[8]</sup>, and those that do, usually take several years. This suggests the need for other factors in addition to HPV infection for a malignant transformation.<sup>[8,9]</sup>

Some epidemiological risk factors, in addition to HPV, have been implicated in the genesis of cervical neoplasia, like history of multiple sexual

partners, early first sexual intercourse, multiparity, use of oral contraceptives for long periods and tobacco smoking.<sup>[2,10]</sup>

Tobacco smoking has been appointed as a co-factor in cervical carcinogenesis,<sup>[10,11]</sup> mainly due to its association with HSIL and to the presence of nicotine derivatives in cervical mucus.<sup>[12]</sup> Some studies describe smoking as an important risk factor for the development of cervical cancer (invasive and *in situ*) in women with HPV infection.<sup>[13-15]</sup>

This study aims to verify the association between exposure to tobacco smoking with genital HPV infection and with grade of cervical lesions.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Study Design***

A case-control study was developed with the outcomes: (i) genital HPV infection, and (ii) cervical lesion grade. The study sample is part of a cohort study, conducted from February 2003 to December 2006<sup>[16]</sup>, in southern Brazil. This population consisted of women who attending primary care units for cervical cancer screening. The inclusion criteria have been described in a previous publication<sup>[16]</sup>.

### ***Study Sample***

After being enrolled, the participants answered an epidemiological questionnaire on demographic characteristics, previous morbidities, reproductive history, sexual behavior, smoking history and other relevant information (Appendix

3). All women underwent a gynecological examination for collection of cervical smears for cytological analysis and detection of HPV-DNA.

**Case Definition:** all women in the database who had genital HPV infection detected by Polymerase Chain Reaction technique (PCR) that presented abnormal histopathological results, were considered cases. The number of women who met this criterion was 84.

**Control Definition:** HPV-negative women and with normal cytology results were considered as potential controls. The selection of these women occurred consecutively and they were matched to cases according to the month of study entry. A total of 222 women were selected based on this criterion.

The final sample included 84 cases and 222 controls (approximately a ratio of 3 controls for each case - 3:1), giving the study a power of 80%.

### **Sample collection**

Samples obtained from the ecto and endocervix were collected by a cytobrush for Pap smear and for the detection of viral and human DNA. DNA samples were transported under low temperature conditions and stored at -20 °C until extraction. The protocol of DNA extraction used was described by Bauer<sup>[17]</sup> and Coutlée<sup>[18]</sup>. All samples were evaluated for the presence of viral DNA and genotyped for HPV types 16, 18 and 31. PCR amplification for  $\beta$ -globin DNA sequences was conducted to indicate whether sufficient cervical DNA was present in the sample.

Information about the participants, clinical data and laboratory tests (cytopathological, colposcopy and anatomopathological) were extracted from the existing database for the cohort study<sup>[16]</sup>.

### **HPV-DNA detection**

The samples were centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes, resuspended, and digested in proteinase K solution (200 µg/mL of proteinase K 'DNase/RNase free', 2% Tween 20, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,5) for 18 hours at 37°C. It was then heated at 94°C for 10 minutes and used as a template in PCR amplification.

The conserved region L1 of the HPV gene was amplified by PCR using a general *primer* biotinylated GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') producing amplicons of 150pb.

The reactions were performed in a thermocycler according to the protocol published by de Roda Husman and cols<sup>[19]</sup> with some modifications.

To control the functionality of PCR reactions, primers of β-globin gene GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') were tested simultaneously in all samples producing amplicons of 268pb.

HPV genotyping was done with specific primers designed to detect HPV types 16, 18, and 31.

## **Histopathological diagnosis of cervical samples**

The histopathologic diagnosis was categorized into two groups considering the lesion severity:<sup>[20]</sup>

- *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – LSIL: ASCUS, CIN I);
- *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – HSIL: CIN II, CIN III and cervical cancer).

All women with an abnormal Pap smear and/or positive HPV-DNA were immediately referred to a colposcopy examination. Biopsy was performed only in patients with cervical lesions observed by colposcopy.

## **Statistical analysis**

For comparison of categorical variables with the presence or absence of the outcomes: (i) genital HPV infection and (ii) cervical lesions grade, the chi-square test (or Fisher's exact, if indicated) were applied. The Student t test or Mann-Whitney test was used for continuous variables.

Odds Ratios (OR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were estimated for the associations of variables with the outcomes. All results with  $p < 0.20$  in univariate analysis and/or clinical/epidemiological relevance for study were selected for the model of logistic regression. Results with  $p$  values  $\leq 0.05$  were considered significant.

The analysis was performed using SPSS software (version 17.0).

## RESULTS

A total sample of 306 women were analyzed, including 84 cases and 222 controls.

Characteristics of the studied population are presented in Table 1. Cases were younger ( $p<0.001$ ), had lower parity ( $p=0.01$ ), higher frequency of smokers ( $p<0.001$ ) and higher education level ( $p=0.006$ ). The variables age at first intercourse ( $p=0.06$ ) and number of lifetime sexual partners ( $p=0.07$ ) presented a borderline significance.

Among cases, 30 (35.7%) were positive for high-risk HPVs (16, 18 and 31), while 54 (64.3%) had other types of HPV.

There was no statistically significant difference between the distribution of smokers and nonsmokers among cases infected by high-risk HPV (HPV 16, 18 and 31) or other types of HPV. However, among HPV negative women it was observed a higher frequency of non-smokers ( $p<0.001$ ). (Figure 1)

High-grade lesions (HSIL) were observed in 26.2% of the cases. The majority of women with HSIL were smokers ( $p<0.001$ ) and, the opposite was observed among women with low-grade lesions (LSIL) ( $p=0.002$ ). (Figure 2)

Table 2 describes the crude and adjusted OR, with the corresponding 95% CI for the association between the studied variables and the outcome genital HPV infection. It was observed that age (OR 4.83; 95%CI 2.28-10.20) and cigarette smoking (OR 2.80; 95%CI 1.55-5.08) were independently associated with genital HPV infection.

In the multivariate analysis using the outcome cervical lesion grades, it was observed that smoking was independently associated variable with HSIL

(OR=14.5; 95%CI: 3.07-66.7;  $p=0.001$ ). Low educational level (OR=10.0; 95%CI: 0.95-111.0;  $p=0.06$ ) and history of Sexually Transmitted Infections - STIs (OR=4.17; 95%CI: 0.88-20.0;  $p=0.07$ ) showed a borderline association with this outcome. Presence or absence of infection by an oncogenic HPV was not associated with cervical lesions' grade.

## DISCUSSION

In the present study it was observed that cigarette smoking was independently associated with both genital HPV infection and cervical lesion grade.

Some epidemiological risk factors have been implicated in the development of cervical neoplasia, such as history of multiple sexual partners, early onset of sexual activity, multiparity, long time use of oral contraceptives and cigarette smoking.<sup>[2,10]</sup>

Since the 60's, smoking has been investigated as a potential risk factor for cervical cancer <sup>[21]</sup>. However, this association has always been viewed with suspicion due to the possibility of confusion between smoking and sexual activity.

[22]

In this study, controlling for variables such as onset of sexual activity and number of sexual partners during life, smoking was independently associated with genital HPV infection and HSIL. It was observed that most patients who had HSIL were smokers ( $p<0.001$ ), while the presence of non-smokers was significantly more common ( $p=0.002$ ) among those with low-grade lesion - LSIL. These data are consistent with findings from other studies <sup>[10,11]</sup>, which supports exposure to

smoking as a cofactor for cervical carcinogenesis. In particular, these results seem to be justified as to its association with HSIL and monitoring of derivatives of nicotine in cervical mucus.<sup>[12]</sup>

Several authors describe smoking as an important risk factor for the development of cervical cancer (*in situ* and invasive) in women infected with HPV.<sup>[13-15]</sup> A cohort study published by Collins *et al*<sup>[15]</sup> reported that smoking is a risk factor for the incidence of high grade cervical lesions in young women as soon as they become sexually active.

Besides this, a highly mutagenic and carcinogenic component of tobacco, benzopyrene, presented itself as a modulator of the HPV cycle in a study conducted by Alam *et al*<sup>[23]</sup>. This finding is important because the modulation caused by benzopyrenes may be a factor in the persistence of viral infection<sup>[23]</sup>, enhancing the integration of HPV genome in the host genome, which increases the instability and subsequent cell carcinogenesis process of the uterine cervix.<sup>[24]</sup> Syrjänen *et al*<sup>[25]</sup> in a cohort of approximately 2 years, showed that active smoking was an independent factor for the persistence of oncogenic HPV infection (OR 1.69; 95%CI 1.11-2.57;  $p=0.0014$ ), confirming the mechanism already described by other authors<sup>[23,24]</sup>.

Coker *et al*<sup>[26]</sup> observed that women with HSIL and LSIL (cases) were on average younger and had earlier sexual intercourse compared with controls (no lesion). The present study corroborates these data, since it was observed that cases were younger ( $p<0.001$ ) and also initiated sexual life earlier ( $p=0.06$ ).

We observed a 5-fold chance of finding younger women (under 35 years) with genital HPV infection (OR=4.83; 95%CI 2.28-10.20). Our findings agree with literature reports, which suggest a higher frequency of HPV among young women,

with its peak at the age group 20-24 years and with a tendency to decline with advancing age. [11,27-30]

In a sample of more than 12 thousand women, Sarian *et al*<sup>[31]</sup> observed a higher prevalence of smokers among patients infected by high risk HPV ( $p<0.01$ ). This finding was not observed in the present study, and a possible explanation is the fact that we genotyped only HPV 16, 18 and 31. Also the number of women infected by high-risk HPV was small. In a cohort study involving more than 3 thousand women, Syrjänen *et al*<sup>[32]</sup> observed that the risk of acquiring oncogenic HPV was increased among female smokers, suggesting that the risk attributed to smoking was due to its association with the acquisition of oncogenic HPV, not with high-grade lesions.

This study observed a borderline significant association between previous STIs and HSIL ( $p=0.07$ ). The role of STIs is still unclear in the development of premalignant lesions and cervical cancer. The most likely mechanism is the induction of uterine cervix inflammation, causing damage by oxidative metabolites and reducing cellular immunity.<sup>[33]</sup> Castle *et al*<sup>[34]</sup> in a prospective study demonstrated the association between cervicitis and intraepithelial high grade lesion, suggesting a relationship between inflammation and cervical cancer.

A limitation to be considered when examining the results of the present study is the small number of women (cases) with high grade lesions. This may have contributed to the wide confidence interval observed between the association of HSIL and cigarette smoking, as well as for lack of other associations.

## **CONCLUSION**

The results of this study suggest an association between cigarette smoking and HPV genital infection as well as high grade cervical lesions. These findings emphasize the importance of cervical cancer prevention regarding women exposed to cigarette smoking.

## **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

There were no conflicts of interest.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was funded by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq).

## REFERENCES

1. Lewis MJ. A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Washington, D.C.: Pan American Health Organization - PAHO. 2004.
2. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. 2007.
3. Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep.* 2002; 4:175-183.
4. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31):3-13.
5. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May; 92(9):690–698.
6. Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin.* 2001 Mar-Apr; 51(2):92-114.
7. Wright TC Jr. Chapter 3: Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. *Int J Gynecol Obstet.* 2006; 94:S22-S31.
8. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, *et al.* The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated

DNA testing in adolescent and young women. *JPediatr.* 1998 Feb; 132(2):277-284.

9. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G, *et al.* Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171:1026-1030.
10. Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(1):73-78
11. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Muñoz MT, *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993; 2:423–431.
12. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, *et al.* Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive cervical cancer? A nested Case-Control Study within Nordic Biobanks. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 480–488.
13. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX, *et al.* Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control.* 2003; 14: 805–814.
14. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, *et al.* Carcinoma of the cervix and tobacco smoking:

collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15; 118(6):1481-95.

15. Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman CB. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *Eur J Cancer*. 2009 Oct 9. doi:10.1016/j.ejca.2009.09.015
16. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec; 199(6):617.e1-7. Epub 2008 Sep 16.
17. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-278.
18. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, *et al*. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiology*. 2002; 40(3): 902-907.
19. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76:1057-1062.

20. Woodhouse SL, Stastny JF, Styer PE, Kennedy M, Praestgaard AH, Davey DD. Interobserver variability in subclassification of squamous intraepithelial lesions: Results of the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Nov; 123(11):1079-84.
21. Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer—current status: a review. *Am J Epidemiol.* 1990; 131:945–57.
22. Franco EL, Spence AR. Commentary: Smoking and human papillomavirus infection: the pursuit of credibility for an epidemiologic association. *Int J Epidemiol.* 2008 Jun; 37(3):547-8. Epub 2008 Mar 26.
23. Alam S, Conway MJ, Chen HS, Meyers C. The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol.* 2008 Jan; 82(2):1053-1058.
24. McGlennen, R.C. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med.* 2000; 20(2):383-406.
25. Syrjänen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, *et al.* Factors predicting persistence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in women prospectively followed-up in three New Independent States (NIS) of the former Soviet Union. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005; 26(5):491-8

26. Coker AL, Bond SM, Williams A, Gerasimova T, Pirisi L. Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev.* 2002;26(2):121-8.
27. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, *et al.* Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007 Feb; 297(8):813-819.
28. Trottier H, Franco EL. The Epidemiology of genital Human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 1: S1-S15.
29. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of Human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S16-S24.
30. Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, DeHovitz JA, *et al.* Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 1996; 23:333-41.
31. Sarian LO, Hammes LS, Longatto-Filho A, Guarisi R, Derchain SF, Roteli-Martins C, *et al.* Increased risk of oncogenic human papillomavirus infections and incident high-grade cervical intraepithelial neoplasia among smokers: experience from the Latin American screening study. *Sex Transm Dis* 2009 Apr; 36(4):241-8.

32. Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, *et al.* Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(10):723-35. Epub 2007 Sep 8.
33. Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzetti MC, Silva FR, Silva BR. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2009 maio; 25(5):953-964.
34. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, *et al.* A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1406-14.

**Table 1. Characteristics of the study population.**

Variables	Cases n=84	Controls n=222	p-value
<b>Age</b>			
<35 years	43 (51%)	40 (18%)	
35 years or more	41 (49%)	182 (82%)	<b>&lt;0.001*</b>
<b>Race</b>			
White	65 (77.4%)	187 (84.2%)	
Non-white	19 (22.6%)	35 (15.8%)	0.18*
<b>Educational Level</b>			
Primary School (Incomplete)	20 (23.8%)	67 (30.2%)	
Primary School Complete and Secondary School (Incomplete)	52 (61.9%)	146 (65.8%)	<b>0.006*</b>
High Secondary School or more	12 (14.3%)	9 (4.1%)	
<b>Cigarette smoking</b>			
Yes	41 (48.4%)	52 (23.4%)	
No	43 (51.2%)	170 (76.6%)	<b>&lt;0.001*</b>
<b>Previous STIs</b>			
Yes	50 (59.5%)	143 (64.4%)	
No	34 (40.5%)	79 (35.6%)	0.5*
<b>Oral contraceptive use</b>			
Yes	83 (98.8%)	213 (96%)	
No	1 (1.2%)	9 (4%)	0.12**
<b>Age at first intercourse (Average ± SD)</b>	18.4 ±4.1	19.41 ±4.27	0.06***
<b>Lifetime Sexual Partners (Average ± SD)</b>	6 ±13.14	3.32 ±3.88	0.07***
<b>Parity (Average ± SD)</b>	1.92 ±1.9	2.5 ±1.8	<b>0.01***</b>

\* Pearson  $\chi^2$ ; \*\* Fisher Exact Test; \*\*\* Student t test.

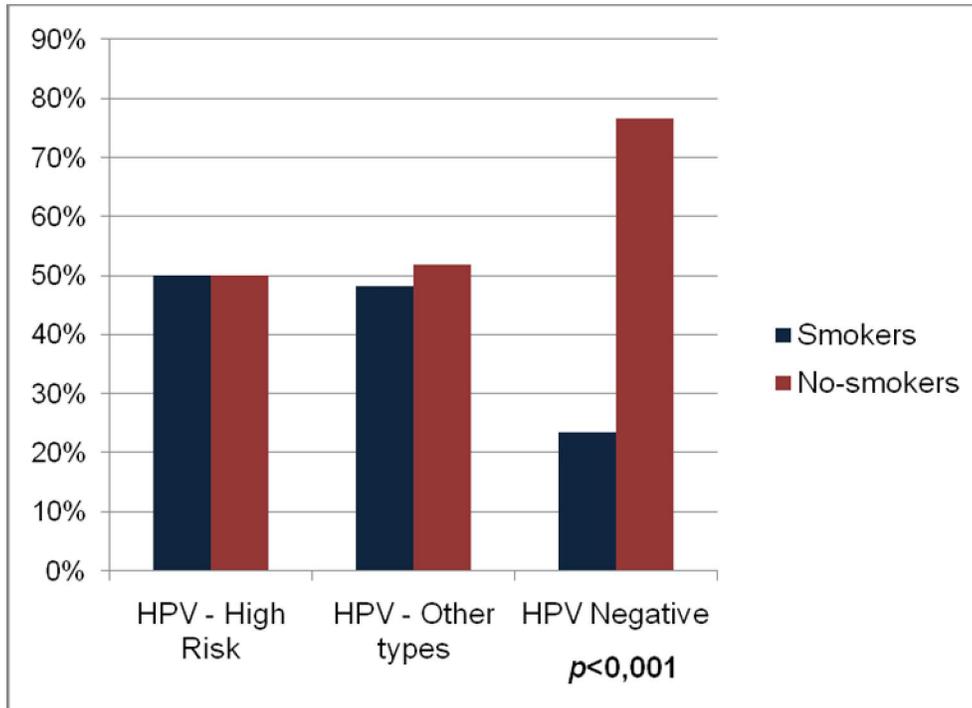
SD= standart deviation; STI= Sexually Transmitted Infections

**Table 2. Crude and adjusted Odds Ratio (OR) for the association of the studied variables with HPV genital infection.**

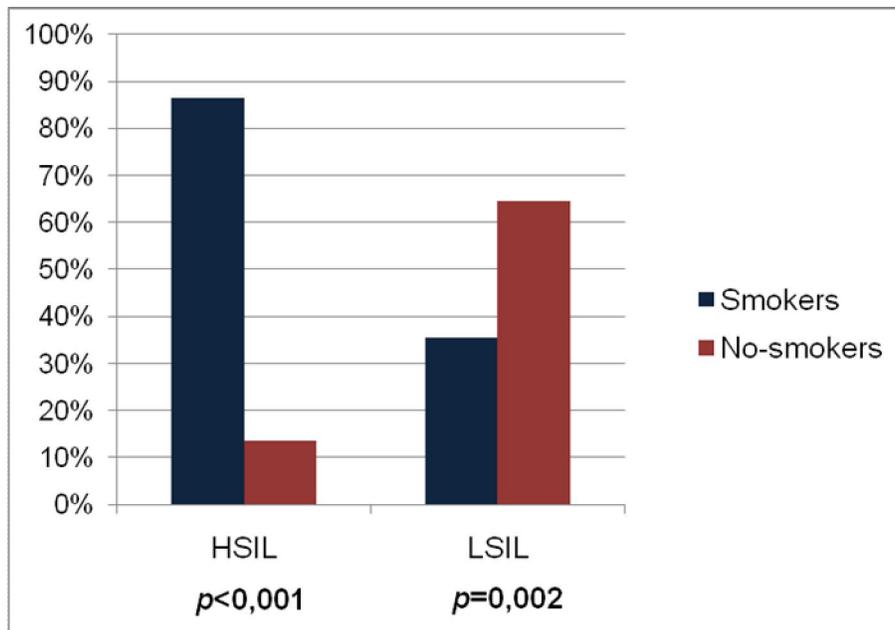
Variables	OR <sub>crude</sub> (IC 95%)*	OR <sub>adjusted</sub> (IC 95%)*
<b>Age</b>		
<35 years	4.8 (2.80-8.20)	<b>4.83 (2.28-10.20)</b>
35 years or more (ref.)	1.0	1.0
<b>Race</b>		
White (ref.)	1.0	1.0
Non-white	0.64 (0.34-1.20)	1.85 (0.90-3.79)
<b>Educational Level</b>		
Primary School (Incomplete)	4.47 (4.65-12.12)	3.08 (0.96-9.89)
Primary School Complete and Secondary School (Incomplete)	3.74 (1.49-9.40)	2.31 (0.82-6.52)
High Secondary School or more (ref.)	1.0	1.0
<b>Cigarette smoking</b>		
Yes	3.12 (1.84-5.29)	<b>2.80 (1.55-5.08)</b>
No (ref.)	1.0	1.0
<b>Previous STIs**</b>		
Yes	0.81 (0.48-1.36)	1.38 (0.75-2.53)
No (ref.)	1.0	1.0
<b>Oral contraceptive use</b>		
Yes	3.51 (0.44-28.11)	2.07 (0.23-18.20)
No (ref.)	1.0	1.0
<b>Age at first intercourse (years)</b>		
≤ 17	1.50 (0.64-3.51)	2.17 (0.76-6.17)
18 - 24	1.18 (0.50-2.74)	1.84 (0.72-4.74)
≥ 25 (ref.)	1.0	1.0
<b>Lifetime Sexual Partners</b>		
≥ 6	1.55 (0.71-3.40)	1.32 (0.39-1.46)
> 1 - 5	1.44 (0.81-2.56)	1.0 (0.39-2.53)
1 (ref.)	1.0	1.0
<b>Parity</b>	1.21 (1.04-1.41)	1.07 (0.78-1.12)

\* 95% CI = 95% Confidence Interval. \*\*STI= Sexually Transmitted Infections

**Figure 1. Distribution of smokers according to genital HPV infection.**



**Figure 2. Distribution of smokers according to the cervical lesion grade.**



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer do colo do útero é um importante problema de saúde pública. Ele é responsável pela morte de, aproximadamente, 230.000 mulheres no mundo a cada ano, acometendo principalmente a população feminina de países em desenvolvimento.

Desde o surgimento dos trabalhos de Harald zur Hausen (ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 2008) demonstrando a associação causal do Papilomavírus Humano com o câncer cervical, pesquisadores de todo o mundo vêm trabalhando para elucidar o processo de carcinogênese cervical, bem como seus fatores.

A infecção pelos tipos oncogênicos de HPV é a principal causa para o câncer do colo uterino. Entretanto, a presença de alguns fatores de risco epidemiológico vêm sendo apontados como predisponentes tanto para a aquisição do vírus como para a progressão para o câncer cervical *in situ* e invasivo.

No presente trabalho, um estudo de caso-controle, foram avaliados alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, em especial o fumo de cigarros. Observamos que entre os casos (n=84) havia maior frequência de fumantes. Eles também eram mais jovens, tinham menor paridade, maior número de parceiros sexuais ao longo da vida e iniciaram atividade sexual mais precocemente do que os controles.

Em torno de 36% dos casos tinha infecção pelos HPV's oncogênicos 16, 18 e 31, não havendo diferença na distribuição de fumantes e não-fumantes entre

essas pacientes. No entanto, entre as mulheres HPV negativas houve predominância de não-fumantes ( $p < 0,001$ ).

Lesões de alto grau (HSIL) foram observadas em 26,2% dos casos, sendo que a maioria das pacientes com HSIL era fumante ( $p < 0,001$ ). A presença de mulheres não-fumantes mostrou-se significativamente maior ( $p = 0,002$ ) entre as com lesão de baixo grau.

Observamos uma associação independente de idade (OR 4,83; IC95% 2,28-10,20) e fumo de cigarros (OR 2,80; IC95% 1,55-5,08) com a infecção pelo HPV. O fumo também esteve independentemente associado com HSIL (OR 14,5; IC95% 3,07-66,7;  $p = 0,001$ ).

Embora tenhamos a limitação do baixo número de pacientes com lesão de alto grau, nossos resultados sugerem a necessidade de intensificar esforços na prevenção do câncer cervical entre mulheres fumantes. Sugere-se que esse grupo de mulheres possa ser mais vulnerável à aquisição do HPV bem como ao desenvolvimento das lesões cervicais. Esses achados tornam-se relevantes frente ao crescente número de fumantes entre as mulheres jovens.

## ANEXO 1



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO CEP - GHC RESOLUÇÃO

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.

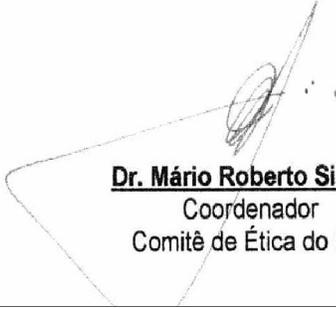
O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

**Nº 112/2002**

**Título:** A distribuição de papilomavirus humanos oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical.

**Pesquisador (es):** Mary Clarisse Bozzetti

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento livre e Esclarecido, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer **APROVADO**. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.



**Dr. Mário Roberto Silveira**  
Coordenador  
Comitê de Ética do GHC

## **ANEXO 2**

### **TERMO DE CONSETIMENTO INFORMADO**

Título do Projeto: A Distribuição de Papilomavírus Oncogênicos e Sua Associação Com Lesões do Colo Uterino

Protocolo nº: \_\_\_\_\_

Financiamento: CAPES-PROF (UFRGS); FIPE/HCPA; FAPERGS; LACEN/RS

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. É causada pelo vírus conhecido como Papilomavírus Humano ou HPV. Este vírus é o principal agente causador do câncer de colo de útero. Pelo fato deste ser um câncer bastante comum entre as mulheres em nosso meio e, embora possa ser diagnosticado precocemente e as mulheres curadas, ele ainda é responsável por um grande número de mortes entre as mulheres em nosso meio. Por isso, a busca de métodos para um diagnóstico mais precoce e mais acessível à toda população têm sido tema de muitas pesquisas.

Nós planejamos um estudo que tem como principal enfoque a identificação e o acompanhamento de mulheres portadoras do HPV bem como de outras lesões associadas presentes no colo uterino. Por isso estamos convidando-a a fazer parte deste estudo, cujos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios estão descritos a seguir.

### Objetivos do estudo:

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

### Procedimentos:

As mulheres que concordarem em participar do estudo serão inicialmente entrevistadas para responder algumas questões relacionadas à sua saúde, após será realizado um exame ginecológico no qual será coletado, através do uso de uma escova especial para este exame, material da parte externa e do canal do colo uterino. Deste material será realizado exame citológico, (preventivo do câncer de colo de útero) e material para investigar a presença do HPV.

As mulheres que tiverem o exame citológico alterado e/ou que tiverem a presença do HPV ao exame serão encaminhadas para a realização de uma colposcopia, que um exame semelhante ao exame ginecológico, onde se observa o colo do útero com lente de aumento. Se neste exame for constatada a presença de alguma lesão no colo do útero, será realizada uma biópsia desta lesão, que significa retirar um pequeno fragmento da lesão e encaminhar para um exame mais minucioso, chamado exame histopatológico e também, neste mesmo fragmento será estudado se existe alguma alteração na proteína P16.

Também será coletado nas mulheres que concordarem em participar do estudo, 20 ml de sangue. Deste sangue será isolado o soro, que será congelado e posteriormente será feita a verificação da presença do HPV.

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas

poderá ser no mínimo semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

#### Riscos e Desconfortos:

Os riscos e desconfortos às participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima, ou seja, a coleta de material para o exame citológico e para o HPV poderá de modo pouco freqüente, causar um pequeno sangramento local, que cessará espontaneamente. Para as mulheres que necessitarem a realização de biópsia, poderá também ocorrer um pequeno sangramento com melhora espontânea e eventualmente poderá haver um pouco de dor local, também passageira. A coleta de sangue é de uma quantidade pequena (20 ml) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos às participantes do estudo.

#### Benefícios:

Os benefícios diretos do estudo às participantes serão: estas terão a oportunidade de serem identificadas com lesões pré-cancerosas do colo de útero e tratadas antes da evolução destas lesões; aquelas que forem positivas a algum tipo de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino e que não tiverem lesões aparentes serão acompanhadas com uma freqüência maior visando acompanhar e tratar as possíveis lesões que se desenvolverem.

Como benefício indireto estas mulheres estarão contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução (prognóstico) para o conhecimento científico, já que está é uma doença altamente prevenível e curável se detectada precocemente e que, no entanto ainda está entre as causas de morte por câncer mais comum entre as mulheres, especialmente em nosso meio.

### Compensação financeira:

Não haverá nenhum pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo, bem como as participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

### Confidencialidade:

Toda a informação que será fornecida pelas participantes do estudo e os resultados advindos dos procedimentos realizados serão considerados confidenciais e será somente conhecida da equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo que será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

### Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas serão esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Mary Clarisse Bozzetti em qualquer momento do estudo pelo telefone 3333 8779.

### Em caso de danos:

Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo ou se tem alguma pergunta sobre os cuidados médicos que necessita esta deverá contatar a coordenadora do estudo Dra. Mary Clarisse Bozzetti pelo seguinte telefone: 33338779.

Se houver algum dano à sua saúde resultante de sua participação, receberá os cuidados médicos necessários sem custos adicionais. Não haverá, no entanto, compensação financeira, apenas atendimento médico e hospitalar quando indicado.

Participação voluntária:

A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

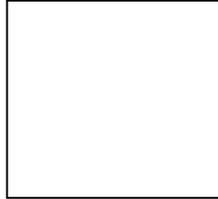
Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia durante o decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

O Significado de Sua Assinatura:

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo.

**VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO**

Carimbo do estudo



---

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

---

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data:

---

\_\_\_\_\_  
Assinatura do coordenador do estudo Data:

Coordenadora  
Dr<sup>a</sup> Mary Clarisse Bozzetti  
Rua Ramiro Barcelos 2600, 4<sup>o</sup> andar Sala 417 D  
Bairro Santana, Porto Alegre CEP 90035-003  
Fone: 51-33301380

## ANEXO 3

### FICHA DE COLETA DE DADOS – QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

#### PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

##### I. QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST \_ \_ \_ \_ \_

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
3. Telefone de contato: \_\_\_\_\_
4. Data de nascimento? \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa) DNASC: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_
5. Data da entrevista? \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa) DENT: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_
6. Idade: \_\_ (em anos) IDADE: \_\_\_
7. Estado marital: ESTMARIT: \_\_\_  
(1) Casada ou com companheiro fixo há pelo menos 1 ano  
(2) Com companheiro há menos de 1 ano (3) Solteira  
(4) Divorciada/desquitada (5) Separada  
(6) Viúva
8. Ocupação: \_\_\_\_\_ OCUP: \_\_\_
9. Cor da pele: COR: \_\_\_  
(1) branca (2) negra (3) mulata (4) amarela
10. Escolaridade: ESCOLAR: \_\_\_  
( 1 ) analfabeta ( 2 ) primeiro grau incompleto  
( 3 ) primeiro grau completo ( 4 ) segundo grau incompleto  
( 5 ) segundo grau completo ( 6 ) terceiro grau incompleto  
( 7 ) terceiro grau completo ( 9 ) ignorado
11. Número de pessoas que residem na casa: \_\_ PCASA: \_\_\_
12. Renda da família (anotar a renda em reais) \_\_\_\_\_ RENDA: \_\_\_
13. Você fuma? (1) Sim (2) Não FUMO: \_\_\_

**SE A RESPOSTA À QUESTÃO 13 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 16**

14. Se sim, há quanto tempo? \_\_ (em anos) TFUMO: \_\_  
15. Se sim, quantos cigarros fuma por dia? \_\_ CIGDIA: \_\_  
16. Idade da primeira menstruação: \_\_ MENARCA: \_\_  
17. Seus ciclos menstruais são regulares? \_\_\_\_\_(intervalo) CMENST: \_\_  
18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não MENOP1: \_\_

**SE A RESPOSTA À QUESTÃO 18 FOR “SIM” PULE PARA A QUESTÃO 22**

19. Se não, há quanto tempo? \_\_ (em anos) MENOP2: \_\_  
20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal? MENOP3: \_\_  
(1) Sim (2) Não  
21. Se sim, por quanto tempo? \_\_ (em anos) MENOP4: \_\_  
22. Qual a idade da primeira relação sexual: \_\_ SEXARCA: \_\_  
23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: \_\_ PARSEX1: \_\_  
24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: \_\_ PARSEX2: \_\_  
25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional? ACO1: \_\_  
(1) Sim (2) Não  
26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou? ACO2: \_\_  
(1) Anticoncepcional oral; (2) Anticoncepcional injetável;  
(2) Condon (camisinha); (4) Diagrama;  
(5) “Camisinha” feminina; (6) DIU/Mirena;  
(7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;  
(10) Não se aplica; (11) Outro: \_\_\_\_\_  
27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não GESTA1: \_\_

**SE A RESPOSTA À QUESTÃO 27 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 33**

28. Se sim, quantas vezes? \_\_ GESTA2: \_\_  
29. Que idade tinha na primeira gestação? GESTA3: \_\_  
30. Quantos filhos nasceram vivos? FVIVOS: \_\_  
31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não ABO1: \_\_  
32. Se sim, quantos? \_\_ ABO2: \_\_  
33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças?  
(1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe  
Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): \_ COND: \_\_  
AIDS/ HIV positiva: \_ HIV: \_\_  
Sífilis: \_ SIFILIS: \_\_  
Gonorréia: \_ GONO: \_\_  
Candidíase genital: \_ CANDIDA: \_\_  
Clamídia genital: \_ CLAMIDIA: \_\_  
Herpes genital: \_ HERPES: \_\_  
Outra, qual?: \_\_\_\_\_ OUTDST: \_\_

34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? TRAT1: \_\_
35. Se sim, qual? \_\_\_\_\_ TRAT2: \_\_
36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe
- Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): \_ CONDM: \_\_
- AIDS/ HIV positivo: \_ HIVM: \_\_
- Sífilis: \_ SIFILISM: \_\_
- Gonorréia: \_ GONOM: \_\_
- Candidíase genital: \_ CANDIDAM: \_\_
- Clamídia genital: \_ CLAMIDIAM: \_\_
- Herpes genital: \_ HERPESM: \_\_
- Outra, qual?: \_\_\_\_\_ OUTDSTM: \_\_
37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? TRATM1: \_\_
38. Se sim, qual? \_\_\_\_\_ TRATM2: \_\_
39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de CP1: \_
- colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe
40. Se sim, qual a data do último exame? \_\_\_ / \_\_\_ (mm/aaaa) DATCP: \_\_/ \_\_
41. Você costuma realizar auto-exame de mamas? MAMA1: \_\_
- (1) Sim (2) Não
42. Se sim, com que frequência? MAMA2: \_\_
- (1) diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: \_\_\_\_\_
43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde?
- (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
- Doença cardiovascular (HAS, DIC): \_ HDCV: \_\_
- Lesões pré-invasivas de colo de útero: \_ HLPCU: \_\_
- Doença endócrino-metabólica (diabetes): \_ HDEM: \_\_
- Doença Respiratória (asma, dpoc): \_ HDR: \_\_
- Doença psiquiátrica (depressão): \_ HDP: \_\_
- Câncer ginecológico: \_ HCAG: \_\_
- Outro tipo de câncer: \_ HC: \_\_
44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o TRATPS1: \_\_
- seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não
45. Se sim, qual o tratamento? \_\_\_\_\_
- TRATPS2: \_\_
- 
46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou teve algum dos seguintes problemas de saúde?
- (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
- Doença cardiovascular (HAS, DIC): \_ HFDCV: \_\_
- Lesões pré-invasivas de colo de útero: \_ HFLPCU: \_\_
- Doença endócrino-metabólica (diabetes): \_ HFDEM: \_\_
- Doença Respiratória (asma, dpoc): \_ HFDR: \_\_
- Doença psiquiátrica (depressão): \_ HFDP: \_\_
- Câncer ginecológico: \_ HFCAG: \_\_
- Outro tipo de câncer: \_ HFC: \_\_
- AIDS(HIV positivo): \_ HFAIDS: \_\_
47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o TRATPSF1: \_\_
- este problema de saúde? (1) Sim (2) Não

48. Se sim, qual o tratamento? \_\_\_\_\_  
TRATPSF2: \_\_

49. História de óbito na família nos últimos cinco anos?  
(1) Sim (2) Não (3) Não sabe

ÓBITOF: \_\_  
OBFIDAD: \_\_  
CAUSAOBF: \_\_

50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: \_\_ (anos)  
51. Se sim, qual a causa da morte? \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR:**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## II. QUESTIONÁRIO DE DADOS DO EXAME E COLETA DE MATERIAL

### PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST \_ \_ \_ \_ \_

1. Nome: \_\_\_\_\_

2. Foram realizados os seguintes exames na participante do estudo:

Coleta para exame citopatológico da cérvix uterina (CP):

(1) Sim (2) Não, por quê? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultado do CP?

CP: \_\_

(1) Normal; (2) AGUS; (3) ASCUS

(4) NIC 1; (5) NIC 2; (6) NIC 3;

(7) Ca in situ; (8) Ca invasivo; (9) Outro: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Coleta de material para PCR (PCR):

(1) Sim (2) Não, por quê? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultado da PCR (HPV-DNA)?

HPVDNA: \_\_

(1) Positiva (2) Negativa

Se positiva, qual o tipo de HPV identificado? \_\_\_\_\_ THPV: \_\_

Coleta de sangue para a sorologia p/HPV(SORO):

(1) Sim (2) Não, por quê? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? \_\_\_\_\_

Resultado da sorologia para o HPV?

SOROHPV: \_\_

(1) Positiva (2) Negativa

Foi indicado colposcopia?

(1) Sim (data: \_\_\_\_\_) (2) Não

Foi realizada colposcopia?

(1) Sim (data: \_\_\_\_\_) (2) Não, por quê?

Resultados da colposcopia?

COLPO: \_\_

Anormal com realização de biópsia;

Anormal sem realização de biópsia (por quê? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_)

Normal

Se biópsia realizada, qual o resultado do exame histopatológico?

HISTO: \_\_

(1) Normal (2) NIC 1 (3) NIC 2 (4) NIC 3

(5) Ca in situ (6) Ca invasor (7) Outro: \_\_\_\_\_

## ANEXO 4

### Fluxograma de seguimento das participantes do estudo

