

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS (CLASSES IgG e IgM)
CONTRA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM UMA
POPULAÇÃO DE ALTO RISCO PARA O CÂNCER
CERVICAL**

PATRICIA THOMANN

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a.
LUISA LINA VILLA

São Paulo
2000



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa

Hospital do Câncer A.C. Camargo

Thomann, Patricia

Prevalência de anticorpos (classes IgG e IgM) contra o papilomavírus humano em uma população de alto risco para o câncer cervical / Patricia

Thomann. -- São Paulo, 2000.

p. 167

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luisa Lina Villa.

Descritores: 1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO/fatores de risco. 2. CÂNCER DE ÚTERO. 3. ANTICORPOS/prevalência. 4. SOROLOGIA/técnica.

Histórico Escolar

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente - Área: Oncologia

Dados do Aluno:

PATRICIA THOMANN

Nível: MESTRADO

Orientador LUISA LINA VILLA

Data de ingresso 01/08/1997 Data de Conclusão 07/07/2000 Total Geral de Créditos: 35

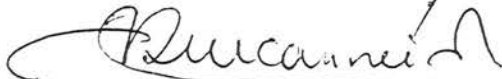
Título do Trabalho: Prevalência de Anticorpos (classes IgG e IgM) Contra Papilomavírus Humano em uma População de Alto Risco para Câncer Cervical

Disciplina		Período		Carga Horária	Freq.	Créditos	Situação	Conc.
		Início	Término					
HCCC00005	ESTATÍSTICA APLICADA À PESQUISA CLÍNICA	24/08/1997	05/09/1997	60	92%	5	Aprovado	A
HCCC00003	CONCEITOS BÁSICOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	02/09/1997	08/10/1997	72	83%	6	Aprovado	A
HCCC00010	VÍRUS E CÂNCER	02/06/1998	03/07/1998	96	100%	8	Aprovado	A
HCCC00007	IMUNOLOGIA DOS TUMORES	01/09/1998	15/10/1998	72	83%	6	Aprovado	A
HCCL00018	FISIOPATOLOGIA DA DISSEMINAÇÃO TUMORAL	05/10/1998	07/12/1998	48	88%	4	Aprovado	A
HCCL00020	GENOMICS E GENOMA	08/11/1999	03/12/1999	72	83%	6	Aprovado	A

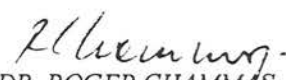
São Paulo, 07 de julho de 2000

A Comissão Julgadora considerou o candidato aprovado.


DRA. LUISA LINA VILLA


DRA. CELIA REGINA WHITAKER CARNEIRO


DRA. MARIA SÍLVIA VICCARI GATTI


DR. ROGER CHAMMAS


Prof. Dr. LUIZ FERNANDO LIMA REIS
Diretor da Graduação

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

Conceito:

A - Excelente; B - Bom; C - Regular; D - Reprovado; E - Excluído

Um (1) Crédito equivale a Doze (12) horas de atividades programadas

Mantido pela **Fundação Antonio Prudente** - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - Liberdade

São Paulo - SP - CEP 01509-900 - Fone/Fax: 3272-5113

Internet: www.hcanc.org.br - e-mail: posgrad@hcanc.org.br

Ó Deus, dai-me uma visão sem nuvens e livrai-me da pressa.

Dai-me a coragem de opor-me a toda vaidade e de perseguir,
como puder e até o fim, cada uma de minhas tarefas.

Dai-me a vontade de não aceitar nunca o repouso ou a
homenagem antes de ter podido verificar se meus
resultados correspondem a meus cálculos ou de
poder descobrir e consertar os meus erros.

("Oração do Homem da Ciência" - Sinclair Lewis, *Arrowsmith*)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a duas pessoas extremamente importantes em minha vida, que são as responsáveis absolutas pela pessoa em que eu me tornei:

A minha mãe, **Irene** (*in memoriam*) que, com sua força, determinação e justiça, me ensinou desde muito pequena que eu sou importante, devendo fazer o que me agrada com responsabilidade, assumindo as conseqüências dos meus atos e procurando sempre ver o lado melhor de todas as pessoas. Mãe, sem a sua dedicação e amor, eu jamais conseguiria chegar aonde estou hoje. Você sempre foi mais do que minha mãe, foi minha melhor amiga! Se eu me tornar, algum dia, apenas uma fração da mãe que você foi para mim, saberei que posso me considerar motivo de orgulho para você.

Ao meu pai, **Werner** (*in memoriam*) que, com sua retidão de caráter, honestidade e responsabilidade, me exemplificou como a dedicação integral ao trabalho sempre rende frutos mais saborosos do que a ociosidade, e que o maior tesouro de um indivíduo é poder viver dignamente e em paz, sem deixar de ser querido por todos aqueles que cruzarem o seu caminho. Pai, se não fosse a sua idéia de que a maior

herança que um pai pode deixar aos filhos é a educação e a cultura, eu não teria sido capaz de vencer mais essa etapa. Você foi o melhor exemplo de que não é o meio que faz o homem e teve a grandeza de conseguir construir uma família que o ama e respeita, apesar da sua infância dolorosa. Tomara que eu tenha herdado apenas um décimo da sua coragem para seguir adiante.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Karin e Beto, à minha cunhada Márcia e à minha sobrinha Renata, pelo apoio, preocupação e vontade de ajudar constantes e pelo convívio diário. Apesar das perdas recentes e dolorosas, e dos eventuais desentendimentos por que passamos, eu sei que vocês ainda são as pessoas com as quais eu mais posso contar.

Ao Rogério, meu namorado, por todo o apoio, carinho e amor que tem me dado nessa fase difícil de defesa de tese, nunca permitindo que eu esmorecesse ou desistisse. Isso sem falar de toda a ajuda que você me deu para formatar tabelas e figuras e imprimir a tese. A sua compreensão e abnegação ilimitadas fazem de você uma das pessoas mais sensíveis que eu já encontrei. Saiba que eu me considero uma pessoa de muita sorte por ter você.

A Dra. Luisa Lina Villa, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, confiando no meu potencial e investido em mim. Dra., a senhora nos ensina não só a sermos melhores cientistas, mas mais do que isso, a sermos melhores pessoas. É um exemplo de competência profissional, aliada a generosidade e calor humano, a ser seguido por todos nós. Sob a sua orientação segura, espero me tornar um ser humano melhor, e não só no sentido profissional.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e do Hospital do Câncer, por permitir que eu utilizasse as dependências desses dois locais para me aprimorar profissionalmente.

Ao Dr. Eduardo L. Franco, cujo vasto conhecimento em muito contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, minha primeira orientadora de iniciação científica e amiga querida, cuja intermediação foi vital não só para vir a conhecer a dra. Luisa, mas também para me assegurar que eu realmente tinha potencial para enveredar pelos caminhos da pesquisa, bem como para lapidar a gema bruta. Muito do que eu sou agora, eu devo a você.

Ao João Candeias, por ter me auxiliado no domínio das técnicas imunológicas dessa tese com toda a sua gentileza, calma e paciência; por ter me recebido tão bem quando aqui cheguei e por ter me aceito no seu círculo de amigos.

Ao Paulinho (Paulo César Maciag), pela ajuda inestimável na execução de todas as análises estatísticas da parte de IgM dessa tese, pelas discussões extremamente profícuas sobre a resposta imune do HPV, e pela excelente convivência no laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig: Andréa, Lara, Laura, Jane, Katiana, Enrique, Patrícia Sávio, Joãozinho, Neide, Zé Carlos e Rômulo pelas divertidas horas passadas no laboratório e pelos diversos tipos de ajuda, tanto no sentido profissional quanto no pessoal.

À Stella que, com sua calma e eficiência, sempre resolve as confusões em que nos envolvemos com bolsas, reservas técnicas e burocracias em geral, com um sorriso no rosto e uma palavra gentil no coração.

Às enfermeiras Isa, Lenice e Mônica, pela simpatia e eficiência no tato com as pacientes e na coleta e organização das preciosas amostras biológicas, sem as quais nenhum dos resultados do estudo teria sido possível de alcançar. Mas, principalmente, pela gentileza sempre demonstrada tanto dentro quanto fora do ambiente de trabalho.

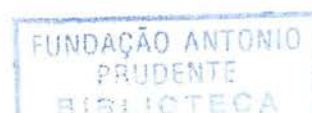
A todos do Instituto Ludwig, que de uma forma ou de outra contribuíram no cotidiano para a finalização deste trabalho. Em especial, para o pessoal dos outros laboratórios pela boa-vontade perene em responder perguntas, ensinar técnicas novas e mostrar o funcionamento de equipamentos.

À Ana Maria, coordenadora, e à Márcia, da Secretaria de Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, pela paciência em responder mil vezes às mesmas perguntas, em resolver as nossas confusões com a burocracia e, enfim, pelo apoio fundamental.

À bibliotecária Suely Francisco, pelo inestimável auxílio na formatação das referências bibliográficas aqui presentes, à Rose e a todos os que trabalham na Biblioteca da Fundação Antonio Prudente pela paciência e boa-vontade na localização dos livros e periódicos solicitados.

À FAPESP, pelo suporte fundamental para esta pesquisa.

Ao NIH pelo auxílio financeiro.



RESUMO

Thomann, P. **Prevalência de anticorpos (classes IgG e IgM) contra o papilomavírus humano em uma população de alto risco para o câncer cervical.** São Paulo; 2000.

[Tese de Mestrado - Fundação Antonio Prudente]

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus epiteliotrópicos responsáveis pela etiologia tanto de lesões intraepiteliais escamosas (SIL) quanto de carcinomas cervicais invasivos. O interesse mundial no desenvolvimento de vacinas contra esses vírus, com o intuito de impedir o surgimento posterior do carcinoma em indivíduos infectados e de auxiliar na erradicação de lesões já estabelecidas, adveio do estudo do comportamento da resposta imunológica dos indivíduos infectados com HPV. Anticorpos contra *virus-like particles* (VLP) de HPV-16, em especial, vêm sendo associados à presença de SIL e de carcinomas invasivos, bem como a infecções virais persistentes. Neste estudo, a soroprevalência de anticorpos da classe IgG contra HPV-16 foram associados com a detecção de tipos de HPV alto risco, com infecções persistentes e com o desenvolvimento posterior de lesões cervicais, em especial de alto grau. A detecção dessa classe de anticorpos em amostras coletadas ao início do estudo prospectivo foi capaz de prever esses eventos. Além disso, demonstrou-se que diversas variáveis epidemiológicas, tais como idade, DST prévia, número de parceiros sexuais e gravidezes, escolaridade, tabagismo e idade ao primeiro coito associam-se significativamente com a detecção dessa classe de anticorpos gerados contra HPV-16. A soroprevalência de IgM, por sua vez, tendeu a associar-se mais fortemente com

infecções por tipos de HPV de baixo risco e com a detecção de baixa carga viral nas amostras, mas a relevância desses dados ainda deve ser melhor investigada.

SUMMARY

Thomann, P. **Prevalência de anticorpos (classes IgG e IgM) contra o papilomavírus humano em uma população de alto risco para o câncer cervical.** [Prevalence of IgG and IgM antibodies against human papillomaviruses in a high risk population for cervical carcinoma]. São Paulo (BR); 2000. [Tese de Mestrado - Fundação Antonio Prudente].

Human papillomaviruses (HPV) are epitheliotropic virus etiologically linked to squamous intraepithelial lesions (SILs) as well as of invasive cervical carcinomas. The worldwide effort on vaccines development against these viruses ultimately aiming to avoid cervical carcinoma development in infected subjects led to the intensification of studies on the immunological features of HPV infection. Antibodies against virus-like particles (VLPs) of HPV-16 have been associated with the presence of SIL and of cervical carcinomas, as well as with persistent viral infections. In the present study, the seroprevalence of class IgG antibodies against HPV-16 has been associated with the detection of oncogenic HPV types, with persistent infections and to the development of cervical lesions, specially high grade lesions. Detection of these antibodies in samples collected at enrollment was shown to predict occurrence of these events. Besides, it has been demonstrated that several epidemiological variables, including age, previous report of DST, number of sexual partners, pregnancies, smoking, scholarship and age at first sexual intercourse were strongly associated with the detection of high levels of IgG

against HPV-16. IgM seropositivity, on the other hand, was associated markedly with low risk HPV types infections and with low viral load, but the relevance of these data awaits further research.

ÍNDICE

Resumo

1. Introdução e justificativas.....	01
1.1. Epidemiologia do Carcinoma Cervical.....	01
1.2. Fatores de Risco do Carcinoma Cervical.....	03
1.3. Biologia dos Papilomavírus.....	06
1.4. Caracterização Funcional dos Papilomavírus Humanos.....	09
1.5. Potencial Oncogênico dos Papilomavírus Humanos.....	11
1.6. História Natural das Infecções por Papilomavírus Humanos.....	14
1.7. Detecção dos Papilomavírus Humanos.....	16
1.7.1. Diagnóstico Citológico e Histológico.....	16
1.7.2. Detecção e Tipagem do DNA Viral.....	20
1.7.3. Detecção Sorológica.....	22
1.7.3.1. Estudo sobre a Prevalência de IgG contra VLP de HPV.....	26
1.7.3.2. Estudo sobre a Prevalência de IgM contra VLP de HPV.....	34
2. Objetivos.....	37
3. Material e Métodos.....	38
3.1. Coleta das Amostras de Soro.....	38
3.1.1. Soros de Mulheres Assintomáticas Participantes do Estudo Prospectivo Ludwig/McGill.....	38
3.1.2. Soros Controles BR.....	39

3.1.3. Seleção de Soros para Determinação da Prevalência	
de Anticorpos da Classe IgG contra VLP de HPV-16.....	41
3.1.4. Seleção de Soros para Determinação da Prevalência	
de Anticorpos da Classe IgM contra VLP de HPV-16.....	42
3.2. Exame Citológico das Amostras.....	43
3.3. Avaliação da Presença de DNA de HPV nas Amostras.....	44
3.3.1. Extração de DNA de HPV.....	45
3.3.2. Detecção e Tipagem do DNA de HPV.....	46
3.4. ELISA para Detecção de IgG e IgM contra HPV-16.....	47
3.4.1. Antígeno: VLP de HPV-16.....	47
3.4.2. Etapa de Adsorção do Antígeno a Microplaca.....	48
3.4.3. Etapa de Bloqueio.....	48
3.4.4. Etapa de Adição dos Soros Pesquisados.....	49
3.4.5. Etapa de Adição do Conjugado.....	50
3.4.6. Etapa de Adição do Substrato.....	50
3.5. Análises Estatísticas.....	51
3.5.1. Controle da Variação dos Resultados na Reação	
Imunoenzimática.....	51
3.5.2. Comparação entre as Medidas de Reatividade	
Sorológica.....	53
3.5.3. Definição da Positividade Sorológica.....	54
3.5.4. Associação entre Positividade Sorológica e Risco de	
Infecção pelo HPV e Lesões Cervicais.....	56

3.5.5. Fatores Preditores da Resposta Sorológica.....	57
4. Resultados.....	60
4.1. Determinação de Anticorpos da Classe IgG contra	
VLP de HPV-16.....	60
4.1.1. Variáveis Epidemiológicas Associadas a	
Soropositividade para IgG contra HPV-16.....	78
4.2. Determinação de Anticorpos da Classe IgM contra	
VLP de HPV-16.....	85
5. Discussão.....	101
6. Conclusões.....	139
7. Referências Bibliográficas.....	141
Anexo 1	
Anexo 2	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das Taxas Brutas de Mortalidade e Incidência do Carcinoma Cervical, conforme as Regiões do Brasil.....	03
Tabela 2 : Classificação Histológica e Citológica de Alterações da Cérvix Uterina.....	18
Tabela 3 : Sumário de Características das Principais Fontes de Antígenos de HPV Utilizadas em Ensaio Imunológicos	24
Tabela 4: Coeficientes de Determinação (r^2) para as Correlações entre Respostas Sorológicas em Amostras Coletadas à Admissão e Após Quatro Meses de Seguimento do Estudo usando Diferentes Diluições (1:10 e 1:50) e Expressões de Reatividade (NAR e NAD).....	62
Tabela 5: Distribuição das Medidas de Reatividade Sorológica em Amostras do Grupo Negativo.....	65
Tabela 6: Reatividade Sorológica Média em Amostras Coletadas à Admissão, segundo Grupos de Positividade para Infecção por HPV de Diferentes Riscos de Oncogenicidade durante um Ano após o Seguimento.....	69

Tabela 7: Reatividade Sorológica Média em Amostras Coletadas à Admissão, segundo Grupos de Positividade para Infecção Transiente ou Persistente pelo HPV durante um Ano após o Seguimento.....	70
Tabela 8: Reatividade Sorológica Média em Amostras Coletadas à Admissão, segundo Risco Cumulativo de Lesões Cervicais durante um Ano de Seguimento do Estudo.....	71
Tabela 9: Riscos Relativos (RR) de Lesão Cervical (SIL) segundo a Resposta Sorológica ao Início do Estudo: Lesões Diagnosticadas durante um ano de Seguimento do Estudo.....	72
Tabela 10: Riscos Relativos (RR) de Lesão Cervical (SIL) Diagnosticadas a Partir do Quarto Mês de Seguimento do Estudo até Três Anos de Seguimento, segundo a Resposta Sorológica de amostras durante a admissão e após quatro meses de seguimento na coorte.....	75
Tabela 11: Riscos Relativos (RR) de Infecção por HPV de Alto e Baixo Risco de acordo com a definição da resposta sorológica de amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo.....	76
Tabela 12: Riscos Relativos (RR) de Infecção Transiente ou Persistente pelo HPV de acordo com a definição da resposta sorológica de amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo.....	77

Tabela 13: Correlação Bruta e Ajustada entre Diferentes Variáveis Sócio

Demográficas e Tabagismo e a Reatividade Sorológica anti-HPV-16
Combinada nas Visitas de Admissão e Primeiro Retorno Medida pela
Fórmula NAR81

Tabela 14: Correlação Bruta e Ajustada entre Diferentes Variáveis de Higiene e

Doenças Sexualmente Transmissíveis e a Reatividade Sorológica anti-HPV-
16 Combinada nas Visitas de Admissão e Primeiro Retorno Medida
pela Fórmula NAR82

Tabela 15: Correlação Bruta e Ajustada entre Diferentes Variáveis de

Comportamento Sexual e a Reatividade Sorológica anti-HPV-16
Combinada nas Visitas de Admissão e Primeiro Retorno Medida pela
Fórmula NAR.....83

Tabela 16: Correlação Bruta e Ajustada entre Diferentes Variáveis de Saúde

Reprodutiva e a Reatividade Sorológica anti-HPV-16 Combinada nas Visitas
de Admissão e Primeiro Retorno Medida pela Fórmula NAR.....84

Tabela 17: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Presença de HPV de Alto e

Baixo Risco e IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos à Admissão ao
Estudo.....89

Tabela 18: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Presença de HPV de Alto e Baixo Risco e IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos Após um Ano de Seguimento do Estudo.....	89
Tabela 19: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Presença de Infecções Persistentes ou Transientes por HPV e IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos à Admissão ao Estudo.....	92
Tabela 20: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Presença de Infecções Persistentes ou Transientes por HPV e IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos Após um Ano de Seguimento do Estudo.....	92
Tabela 21: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Determinação da Carga Viral nos Esfregaços Cervicais e IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos à Admissão ao Estudo.....	94
Tabela 22: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Determinação da Carga Viral nos Esfregaços Cervicais e IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos Após um Ano de Seguimento do Estudo.....	94
Tabela 23: Riscos Relativos (RR) da Associação entre a Determinação da Carga Viral nos Esfregaços Cervicais e IgG contra HPV-16 em Soros Obtidos à Admissão ao Estudo.....	95

Tabela 24: Riscos Relativos (RR) da Associação da Detecção de Carga Viral nos Esfregaços Cervicais de Acordo com a Definição da Resposta Sorológica para IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos à Admissão ao Estudo.....	97
---	----

Tabela 25: Riscos Relativos (RR) da Associação da Detecção de Carga Viral nos Esfregaços Cervicais de Acordo com a Definição da Resposta Sorológica para IgM contra HPV-16 em Soros Obtidos Após um Ano de Seguimento do Estudo.....	98
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa Físico do Genoma do HPV 16, com a Região Precoce (E), a Região Tardia (L); os Pontos de Término dessas Regiões (A_E e A_L), o Promotor P_{97} e a LCR, que Corresponde à Região Regulatória.....08
- Figura 2:** Esquema Utilizado para Definição de Positividade e Negatividade Sorológica para Amostras Testadas para Análise de Prevalência de Duas Classes de Imunoglobulinas (IgG e IgM).....63
- Figura 3:** Correlação entre a proporção de mulheres infectadas por tipos de HPV de alto (vermelho) e baixo (azul) risco em esfregaços cervicais e a soropositividade para anticorpos da classe IgM detectados contra VLP de HPV-16, definida através de quartis da distribuição dos dados expressos em NAR, em amostras séricas coletadas ao início do estudo prospectivo e diluídas a 1:10.....90
- Figura 4:** Correlação entre a proporção de indivíduos portadores de alta (azul) ou baixa (vermelho) carga viral em esfregaços cervicais e a soropositividade para anticorpos da classe IgM detectados contra VLP de HPV-16, definida através de quartis da distribuição dos dados expressos em NAR, em amostras séricas coletadas ao início do estudo prospectivo e diluídas a 1:10.....99

ABREVIATURAS

ASCUS - *atypical squamous cells of undetermined significance* - células atípicas de significado indeterminado.

BSA - *bovine serum albumine* - albumina sérica bovina.

DNA - ácido desoxirribonucleico

DST - doenças sexualmente transmissíveis

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio imunoenzimático ligado a enzimas

HPV - *human papillomavirus* - papilomavírus humano

HSIL - *high grade squamous intraepithelial lesion* - lesão intraepitelial escamosa de alto grau

IC - intervalo de confiança

IgA - imunoglobulina da classe A

IgG - imunoglobulina da classe G

IgM - imunoglobulina da classe M

LCR - *long control region* - região longa de controle

LSIL - *low grade squamous intraepithelial lesion* - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

NIC - neoplasia intraepitelial cervical

OPD - ortofenilenodiamina

OR - *Odds Ration* - Razão de Chances

ORF - *Open Reading Frame* - Fase aberta de leitura

NAD - *Normalized Absorbance Difference* - Diferença de Absorbâncias Normalizadas.

NAR - *Normalized Absorbance Ratio* - Razão de Absorbâncias Normalizadas

PBS - *phosphate buffered saline* - salina fosfato tamponada

PCR - *polymerase chain reaction* - reação de polimerização em cadeia

RNA - ácido ribonucléico

RR - *Relative Risk* - Risco Relativo

SDS - *sodium dodecyl sulphate* - dodecil sulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

SIL - *squamous intraepithelial lesion* - lesão intraepitelial escamosa

VLP - *virus-like particles* - partículas semelhantes a vírus.

1. - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

1.1. - Epidemiologia do Carcinoma Cervical

O carcinoma cervical ocupa o quinto lugar dentre as estimativas de incidências dos principais tipos de câncer que acometem a população mundial – logo após as neoplasias de pulmão, estômago, mama e cólon - segundo análises do IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (IARC, 1995). Entretanto, apresenta-se como a segunda neoplasia feminina mais importante, depois do carcinoma de mama, e é responsável por cerca de 440.000 novos casos e por cerca de 200.000 mortes a cada ano em todo o mundo (BOSCH *et al.*, 1997).

A associação entre elevada incidência de carcinoma cervical e regiões em desenvolvimento, tais como a África e a América do Sul, ao contrário do que ocorre em regiões desenvolvidas, está ligada a uma combinação de fatores como as elevadas taxas de paridade e gravidezes e a desnutrição dessa população, associada a uma prevenção de lesões precursoras pouco abrangente (FRANCO, 1997). Os países desenvolvidos, por outro lado, apresentam taxas de incidência de carcinoma cervical extremamente baixas, pois vêm empregando uma política de saúde estável, fundamentada em extensos programas de detecção de lesões precursoras cervicais, difundida para toda a população.

Entretanto, a associação de baixas taxas de incidência de carcinoma cervical com um comportamento sexual “conservador” em países economicamente divergentes, tais como Espanha, Irlanda, Kwait e Israel, sugerem que o desenvolvimento econômico não

é o único fator determinante da variação geográfica da incidência do carcinoma cervical (BOSCH *et al.*, 1997).

As neoplasias constituem-se na terceira causa de morte por doença da população brasileira e mundial, seguindo imediatamente às doenças cardio-vasculares e às causas externas (violência, por exemplo). Dentre as neoplasias que afetam a população feminina no Brasil, o carcinoma do colo uterino ocupa o segundo lugar em mortalidade e incidência, com cerca de 3.625 mortes (taxa bruta de mortalidade: 4,25/100.000 mulheres) e de 17.251 novos casos esperados (taxa bruta de incidência: 20,48/100.000 mulheres), respectivamente, perdendo apenas para o câncer de mama. (INCa, 2000).

As taxas de mortalidade do carcinoma cervical no Brasil são bastante elevadas e têm-se mantido estáveis desde 1985. As taxas de incidência, por sua vez, variam bastante de uma região para outra do país. Por exemplo, nota-se na Tabela 1, que as taxas de incidência desta neoplasia nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país aproximam-se muito, podendo superar, por vezes, à taxa de incidência bruta geral para o carcinoma cervical do Brasil (INCa, 2000).

Tabela 1: Distribuição das taxas brutas de mortalidade e incidência do carcinoma cervical, conforme as regiões do Brasil

Região Brasileira	Mortalidade /100.000 mulheres	Incidência /100.000 mulheres
Norte	4,14	15,52
Nordeste	3,12	19,62
Centro-Oeste	4,81	17,75
Sudeste	4,27	22,16
Sul	6,04	20,35
Geral	4,25	20,48

(INCa, 2000)

1.2. - Fatores de Risco do Carcinoma Cervical

Estudos epidemiológicos iniciais indicaram claramente que o desenvolvimento do carcinoma cervical era fortemente influenciado pelas medidas de atividade sexual, seja das próprias mulheres ou de seus parceiros (VILLA, 1997). O fato de que os principais fatores de risco predisponentes a essa neoplasia definidos até o momento, tais como a idade precoce da mulher no primeiro coito, a elevada paridade da paciente e o elevado número de parceiros sexuais durante toda a vida da paciente (MUÑOZ e BOSCH, 1996), estarem tão associados ao comportamento sexual dos indivíduos afetados, permitiu que se concluísse que o comportamento epidemiológico do carcinoma

cervical assemelhava-se ao de uma doença sexualmente transmissível ou DST (ZUR HAUSEN, 1996a).

Partiu-se, então, para a tentativa de isolar um agente infeccioso sexualmente transmissível que fosse o responsável pelo posterior desenvolvimento do carcinoma cervical (STERN, 1996). No final da década de 60, foi relatada a existência de um padrão soropidemiológico sugestivo do papel do vírus *herpes simplex* tipo 2 (HSV-2) na etiologia dessa doença. Entretanto, as evidências laboratoriais existentes não foram suficientes para comprovar a participação do HSV-2 na etiologia do carcinoma cervical. (KRCMÁR *et al.*, 1986; VILLA, 1997).

A associação causal de papilomavírus com verrugas benignas, ou papilomas, em alguns animais, tais como bovinos e coelhos, por outro lado, já era conhecida há algum tempo (MAGALHÃES, 1920; SHOPE, 1933). Assim, na década de 70, zur Hausen apontou a similaridade dos padrões epidemiológicos das verrugas genitais e do carcinoma cervical humano, sugerindo um envolvimento dos agentes causadores das primeiras no desenvolvimento dos últimos (ZUR HAUSEN, 1977). Mesmo assim, os diversos estudos epidemiológicos que estabeleceram a importância do papel das infecções pelo HPV na neoplasia cervical dependeram, ainda, da disponibilidade de métodos moleculares para a detecção de DNA de HPV (STERN, 1996) e do acúmulo suficiente de dados experimentais para indicar que os papilomavírus humanos (HPV) são os verdadeiros agentes etiológicos do carcinoma cervical (MUÑOZ e BOSCH, 1996; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Outros fatores de risco, tais como o tabagismo e o uso de contraceptivos orais a longo termo, embora tenham sido fracamente associados em diversos estudos publicados (MUÑOZ e BOSCH, 1996; VILLA e FRANCO, 1989), tiveram seus papéis como cofatores da carcinogênese HPV-induzida comprovados em estudos mais recentes (ROUSSEAU *et al.*, 2000; YLITALO *et al.*, 1999). Além disso, existe uma tendência em relacionar os fatores de risco predominantes para a infecção genital por HPV e, potencialmente, para o desenvolvimento da neoplasia cervical a longo prazo, não somente ao comportamento sexual das mulheres afetadas, mas também ao comportamento sexual de seus parceiros sexuais (BRINTON *et al.*, 1989; BURK *et al.*, 1996; CASTELLSAGUÉ *et al.*, 1997).

Logo, o carcinoma cervical é considerado uma consequência do processo iniciado com a infecção pelo HPV de queratinócitos, presentes na junção escamo-colunar da cérvix uterina. A potencial carcinogênese causada por esse vírus é caracterizada pela necessidade da ocorrência de múltiplos eventos nos indivíduos afetados e por uma longa duração (VILLA, 1997). De fato, um estudo multicêntrico efetuado pelo IARC, em 1995, resultou na detecção do DNA do HPV em 93% dos tumores através do uso de um ensaio de detecção baseado em PCR (*polymerase-chain-reaction*) de um segmento de 450 pares de bases da ORF L1 capaz de detectar mais de 25 tipos de HPV (BOSCH *et al.*, 1995). A nova análise de amostras que resultaram negativas nesse estudo através da realização de reações de PCR específicas para outras ORFs de HPV, tais como E7 e E1 permitiu que a taxa de prevalência do DNA de HPV em tumores fosse recalculada atingindo 99,7 por cento. (WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Recentemente, outros fatores predisponentes ao carcinoma cervical têm sido averiguados, como a associação entre determinados genótipos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de pacientes com o risco para aquisição ou progressão de tumores anogenitais HPV-induzidos (MACIAG e VILLA, 1999) e a presença de polimorfismos genéticos para o códon 72 da proteína p53 (STOREY *et al.*, 1998).

1.3. - Biologia dos Papilomavírus

Os papilomavírus são um grupo de vírus hospedeiro-específicos, pertencentes à Família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 1999), que se encontram disseminados pelos epitélios dos mais diversos *taxa* e são responsáveis pela formação de lesões verrucosas ou chatas sem provocar inflamação local (FRAZER, 1996). Estas lesões podem, eventualmente, evoluir para neoplasias benignas ou malignas. Um dos eventos aparentemente necessários para a progressão das lesões verrucosas precursoras para neoplasias é a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (DURST *et al.*, 1985), que ocorre muito cedo no desenvolvimento do carcinoma cervical (LEHN *et al.*, 1988).

O papilomavírus humano (HPV), agente etiológico do carcinoma cervical uterino, é um vírus de diâmetro compreendido entre 55 e 60 nm, que se apresenta sob a forma de partículas icosaédricas não envelopadas de simetria pentagonal, constituídas por 72 unidades denominadas de capsômeros (ZHOU e FRAZER, 1996). O genoma do HPV é composto por DNA dupla fita circular com aproximadamente 7.200 a 8.000 pares

de bases e apresenta-se sempre complexado com proteínas semelhantes à histonas, retiradas das células hospedeiras (VILLA, 1997; ZUR HAUSEN, 1996b).

O genoma do HPV é composto por três segmentos de tamanhos desiguais: uma região não codificadora ou *non-coding region (NCR)*, mais comumente denominada de região longa de controle ou *long control region (LCR)*, que é responsável pelo controle da replicação/transcrição do genoma viral, constituindo somente 10% do genoma (HOWLEY, 1996); uma região precoce, caracterizada por seis genes (E6, E7, E1, E2, E4 e E5), cujas proteínas são responsáveis por funções regulatórias variadas tais como persistência do genoma viral, replicação do DNA viral e ativação do ciclo produtivo, e está representada por cerca de 50% do genoma; e, finalmente, por uma região tardia, caracterizada por dois genes (L1 e L2), cujas proteínas estruturais são responsáveis pela formação do capsídio viral, e que constituem cerca de 40% do genoma viral (IARC, 1995; ZUR HAUSEN, 1996b) (Figura 1).

A organização genômica de todos os papilomavírus sequenciados até hoje, sejam animais ou humanos, é muito semelhante. Como existe apenas uma fita transcricionalmente ativa, constituída por até dez ORFs (*open reading frames*) traducionais, a transcrição do genoma viral ocorre em apenas um sentido e a localização das ORFs apresenta um alto grau de correspondência dentre todos os papilomavírus conhecidos (CHEN *et al.*, 1982; SCHWARZ *et al.*, 1983) (Figura 1).

1.4. - Caracterização Funcional dos Papilomavírus Humanos

As LCRs dos diversos HPV genitais variam entre 800 e 900pb em extensão e apresentam os elementos cis-responsivos, responsáveis pela ligação dos fatores de transcrição protéicos, celulares e virais que controlam a maioria dos eventos regulatórios da expressão gênica dos HPV, organizados de maneira muito similar (IARC, 1995).

A ausência de uma proteína E2 funcional, devido à deleção de partes do gene no momento da integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, aparentemente permite que a expressão excessiva das proteínas transformantes E6 e E7, aliada a outros fatores ainda desconhecidos, promova a transição para lesões malignas mais severas (SCHWARZ *et al.*, 1985).

Além de seu papel como regulador transcricional, a proteína E2 também interage com a proteína E1 no sentido de estimular a replicação viral. Aparentemente, a formação deste complexo E2-E1 facilita e direciona a ligação da proteína E1 à origem de replicação no genoma viral (CHIANG *et al.*, 1992). Além disso, as proteínas E1 de HPV-11 aparentemente requerem condições sutilmente diferentes para ligar-se com o DNA da origem de replicação viral do que outros tipos de HPV, o que poderia estar apontando para diferenças de mecanismos entre os sistemas de replicação do DNA dos vários tipos de HPV, que não prejudicariam a replicação viral como um todo. (DIXON *et al.*, 2000).

A proteína E5 não parece ser necessária para a manutenção do fenótipo maligno, visto que o seu gene encontra-se freqüentemente deletado em casos de carcinomas cervicais. Contudo, a detecção de elevadas quantidades de RNAm e de proteínas virais em lesões intraepiteliais de menor grau, parece sustentar a hipótese de que a proteína E5 possa atuar nos passos iniciais da infecção de HPV (KELL *et al.*, 1994), auxiliando na expansão precoce de clones celulares infectados. Apesar da já conhecida capacidade da proteína E5 em formar complexos com receptores de diversos hormônios envolvidos com a ativação da proliferação celular, a sua contribuição para o estabelecimento natural de infecções pelo HPV ainda é pobremente compreendida (ZUR HAUSEN, 2000).

A localização exclusiva da proteína E4 dentro da camada celular em diferenciação do epitélio infectado tem sustentado a hipótese de que talvez essa proteína tenha um papel ativo na infecção viral produtiva, através da interrupção da diferenciação normal ou do estabelecimento de condições favoráveis para a maturação do HPV (DOORBAR *et al.*, 1986). Além disso, sugeriu-se o papel dessa proteína no auxílio da egressão do vírus da célula (DOORBAR *et al.*, 1991).

As proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco são também responsáveis por estímulos para proliferação celular. A proteína E6 induz a degradação da proteína supressora de tumor celular p53 (SCHEFFNER *et al.*, 1993; WERNESS *et al.*, 1990) enquanto que a proteína E7 atua na inativação de outra proteína supressora de tumor, a proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma, pRB (DYSON *et al.*, 1989; DYSON *et al.*, 1992).

A proteína L1 é a principal constituinte do capsídio do papilomavírus e a proteína viral mais abundante, constituindo cerca de 80% da proteína viral total (HOWLEY, 1996). Essa proteína parece abrigar epítomos tipo-específicos e ser altamente imunogênica (ZUR HAUSEN, 1996b). Além disso, assim como outras proteínas do HPV, tais como E4 e L2, as proteínas L1 são expressas exclusivamente em queratinócitos diferenciados. Apresentam, também, a capacidade *in vitro* de se auto-associarem em capsídios vazios, denominados de “*virus-like particles*” ou VLP, quando expressas como proteínas recombinantes em células intactas. (ZHOU e FRAZER, 1996)

A proteína L2 é considerada a proteína viral menos abundante e, embora seja um componente estrutural adicional do capsídio viral, associada a L1, parece ter um papel importante na incorporação do DNA viral dentro do vírion, através da adição gradual de proteínas do capsídio ao redor do genoma do papilomavírus. Essa hipótese foi levantada devido as habilidades dessa proteína em interagir tanto com DNA viral quanto com a proteína estrutural principal L1 e em direcionar proteínas L1 associadas para localizações específicas dentro do núcleo da célula hospedeira, bem como em auxiliar no transporte da proteína L1 para dentro do núcleo celular. (ZHOU e FRAZER, 1996).

1.5. - Potencial Oncogênico dos Papilomavírus Humanos

A síntese contínua das proteínas precoces E6 e E7 do HPV parece ser uma etapa essencial para o desenvolvimento de tumores malignos, visto que ocorre sempre durante a gênese dos tumores anogenitais associados a esse vírus (ZUR HAUSEN, 1996b). A

continuidade da síntese destas oncoproteínas advém do evento de integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, que ocorre durante a progressão de uma lesão pré-maligna para um carcinoma *in situ*. Esse evento não ocorre em lugares específicos dos cromossomos celulares, mas sempre interrompe o segmento genômico viral correspondente aos genes precoces E2 e E1, resultando na perda de função do gene E2 (SCHWARZ *et al.*, 1985). Os produtos desse gene são os responsáveis pelo controle da transcrição viral, em especial pela repressão da transcrição do promotor principal, localizado no início da região precoce e responsável pelo controle transcricional dos genes E6 e E7. Assim, depreende-se que, ao ocorrer a integração, passa-se a sintetizar as proteínas precoces, como E6 e E7, de forma descontrolada (ROMANCZUK e HOWLEY, 1992). Além disso, esse evento confere também um aumento da estabilização dos transcritos virais, através da formação de moléculas do mRNA de E6/E7 flanqueadas por sequências celulares que inativam um elemento desestabilizador localizado na região 3' do mRNA viral (SCHWARZ *et al.*, 1985).

A função da proteína E6, especialmente de HPV de alto risco, diz respeito à sua complexação com a proteína celular p53, promovendo a sua degradação mediada pelo sistema de proteólise celular via ubiquitina (WERNESS *et al.*, 1990; SCHEFFNER *et al.*, 1990). A importância desse evento reside no fato de que a proteína p53 age como um ativador transcricional de genes envolvidos na manutenção do ciclo celular, através da sua ligação em sequências específicas do DNA (KERN *et al.*, 1991).

A proteína p53 interrompe a proliferação celular e impede a mudança da fase G1 para a fase S em caso da presença de danos ao DNA celular, pois age como um guardião

(*gate keeper*), do ponto de checagem entre as fases G1 e S (síntese de DNA) do ciclo celular (LIN *et al.*, 1992; BRENTANI, 1998). Assim, células que apresentam uma p53 não funcional, ou que apresentam uma taxa de degradação desta proteína aumentada devido a ação das proteínas E6 de HPV de alto risco, não são apropriadamente mantidas na fase G1, quando apresentam o seu DNA celular danificado, e passam a apresentar instabilidade genômica (LIVINGSTONE *et al.*, 1992). A degradação da p53 induzida pela proteína E6 de HPV de alto risco, é, dessa forma, um dos principais fatores de risco na progressão de lesões pré-malignas (ZUR HAUSEN, 1996b).

A ligação da proteína E7 com o produto do gene do retinoblastoma ou pRB libera o fator de transcrição celular E2F dos complexos com E2F/pRB, que é responsável pela ativação da transcrição de genes regulatórios necessários para a proliferação celular, tais como *c-myc* e ciclinas A, além de genes necessários para a síntese do DNA (PHELPS *et al.*, 1989; VILLA, 1998). Além disso, como a própria proteína pRB, em sua forma hipofosforilada, também atua como um inibidor da progressão do ciclo celular no ponto de checagem definido entre as fases G1 e S, a ligação preferencial de E7 com essa forma de pRb resulta na inativação funcional dessa última, impedindo a inibição do ciclo realizada por essa proteína. Consequentemente, a célula portadora de HPV burla o seu controle de proliferação endógeno e progride para a fase S do ciclo celular (HOWLEY, 1996).

Assim, a eliminação do controle de proliferação e do reparo do DNA, exercido por estas duas proteínas celulares, p53 e pRB, causa o acúmulo de mutações nas células que expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco, resultando no fenótipo

transformado. Além disso, outros fatores que podem contribuir para a progressão maligna são a ativação de oncogenes celulares no momento da integração viral e a modificação de outros genes supressores de tumor, através de eventos de perda de heterozigosidade (ZUR HAUSEN, 1996b).

1.6. - História Natural das Infecções por Papilomavírus Humanos

A história natural das infecções por HPV não é bem compreendida até o presente. Aparentemente, a maioria dessas infecções não leva ao desenvolvimento de sintomas incômodos ou lesões macroscopicamente visíveis. Se há o estabelecimento efetivo de quaisquer sinais clínicos, entretanto, estes tendem a desaparecer dentro de poucos anos, concomitantemente a outros sinais microscópicos e moleculares da infecção (IARC, 1995).

A existência de fatores inerentes a alguns indivíduos infectados pelo HPV, tais como a demora na criação de respostas imunológicas efetivas ou a geração de padrões menos eficientes de respostas imunológicas celulares ou a presença de co-fatores (tabagismo, uso constante de anticoncepcionais, etc.), por outro lado, parece permitir a replicação do vírus em larga escala e aumentar a probabilidade do desenvolvimento de lesões novas ou recorrentes. Apesar disso, somente uma pequena porcentagem de indivíduos infectados por tipos oncogênicos de HPV efetivamente desenvolvem o carcinoma cervical (IARC, 1995).

A detecção recorrente do DNA de HPV dos seguintes tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68 em lesões pré-neoplásicas e em lesões neoplásicas permitiu a divisão dos mais de 100 tipos de HPV conhecidos em dois grandes grupos: o grupo de HPV de alto risco, acima exemplificado, e o grupo de HPV de baixo risco que incluem, por exemplo, os HPV tipo 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73 entre outros, responsáveis pelas verrugas genitais e o *condyloma acuminatum* (LÖRINCZ *et al.*, 1992).

Além disso, essa classificação permitiu evidenciar o fato de que a infecção do trato ano-genital por HPV de alto risco predisporia os indivíduos afetados a um risco mais elevado de desenvolver lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (VILLA, 1997) e, potencialmente, aumentando o risco desses pacientes de virem a desenvolver o carcinoma cervical.

Há uma variedade de fatores, tanto exógenos quanto inerentes aos vírus e hospedeiros, que podem influenciar o curso de uma infecção pelo HPV. Os tipos ou variantes do vírus, o sítio anatômico da infecção, e a resposta imunológica do hospedeiro definem se uma dada infecção genital pelo HPV será auto-limitada e escapará da detecção, produzirá uma lesão proliferativa benigna clinicamente evidente, ou lentamente, durante o curso de vários anos, induzirá a transformação maligna das células infectadas (IARC, 1995).

1.7. - Detecção dos Papilomavírus Humanos

1.7.1. - Diagnóstico Citológico e Histológico

MEISELS, FORTIN e ROY (1977) foram os primeiros pesquisadores a correlacionar as lesões ditas aceto-brancas ou condilomas planos, identificadas através da colposcopia da cérvix uterina, com o padrão de infecção de queratinócitos cervicais pelo HPV caracterizado pela observação de sinais de coilocitose, associados à infecção viral produtiva, apresentados pelas células provenientes de esfregaços ou biópsias .

Contudo, a abordagem citológica não é totalmente confiável para ser utilizada como forma única de diagnóstico da infecção, visto que, não raras vezes, ocorrem casos em que indivíduos positivos para o DNA de HPV em ensaios laboratoriais baseados em técnicas de biologia molecular simplesmente não apresentam nenhuma evidência citológica ou histológica detectável de coilocitose nos exames anátomo-patológicos.

A princípio, consideravam-se apenas os epitélios que continham células atípicas através de toda a sua espessura (carcinoma *in situ*) como precursores do carcinoma cervical. Com a introdução da citologia exfoliativa, entretanto, notou-se a existência de um amplo espectro de alterações citológicas secundárias, associadas a alterações histológicas, que poderia ser considerado como potencial precursor do carcinoma cervical, embora não apresentasse o padrão de desdiferenciação típico descrito para o carcinoma *in situ*. Esse fato tornou importante não só definir melhor essas atipias pouco

indiferenciadas, como compreender sua biologia mais completamente e estabelecer uma terminologia mais abrangente para identificá-las corretamente (IARC, 1995).

Assim, REAGAN e HARMONIC (1956) introduziram o termo “displasia” para designar esses epitélios, que posteriormente foi segmentado em graus leve, moderado e severo, dependendo da sua diferenciação (Tabela 2). Entretanto, a prática demonstrou que não era possível distinguir eficientemente os epitélios portadores de displasia severa daqueles portadores de carcinoma *in situ*, e que as displasias moderadas e severas tendiam a convergir imperceptivelmente para lesões de alto grau (RICHART, 1973).

Essas observações levaram a introdução do termo “neoplasia intraepitelial cervical” (NIC) para designar o espectro de doenças cervicais presente na carcinogênese cervical. Essa terminologia implicava na existência de um *continuum* de alterações citológicas que iniciava-se na displasia leve (NIC I), transitava progressivamente através dos estágios intermediários de doenças intraepiteliais (NIC II e III) e terminava no carcinoma invasivo (RICHART, 1973). Após o acúmulo de dados moleculares, entretanto, tornou-se aparente que o espectro de alterações histológicas atípicas cervicais relacionadas ao HPV poderia ser melhor segmentado em dois grupos do que em três e a classificação de NIC foi modificada. As lesões supostamente resultantes de uma infecção viral aguda, referidas como displasias leves, condilomas planos ou NIC I passaram a ser designadas como NIC de baixo grau. As lesões supostamente consideradas como precursores potenciais do carcinoma invasivo, exigindo tratamento, que continham atipias citológicas mais severas, passaram a ser designadas como NIC de alto grau. (Tabela 2) (RICHART, 1990).

Tabela 2: Classificação histológica e citológica de alterações da cérvix uterina (retirada de IARC, 1995).

TERMOS HISTOLÓGICOS		Normal	Resposta Inflamatória relacionada ao HPV	Displasia leve (coilocitose, atipia coilocitótica, condiloma)	Displasia Moderada	Displasia Severa	Carcinoma <i>in Situ</i>	Câncer Invasivo
		Normal	Resposta Inflamatória relacionada ao HPV	NIC de grau I	NIC de grau II	NIC de grau III		Câncer Invasivo
		Normal	Resposta Inflamatória relacionada ao HPV	NIC de baixo grau		NIC de alto grau		Câncer Invasivo
TERMOS CITOLÓGICOS	Sistema Bethesda	Dentro dos Limites Normais	ASCUS	SIL de baixo grau	SIL de alto grau			Câncer Invasivo
	Classificação Papanicolaou	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV		Classe V	

ASCUS: Células Atípicas de Significado Indeterminado [*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*]

SIL: Lesão Intraepitelial Escamosa [*Squamous Intraepithelial Lesion*].

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

Assim, os vários exemplos de classificações das lesões cervicais HPV-induzidas existentes, ilustrados na Tabela 2, foram desenvolvidos tanto com o intuito de facilitar o trabalho dos anatomo-patologistas na fase de leitura de lâminas, quanto o de fornecer ao clínico mais informações prognósticas acerca de uma determinada lesão.

Os diversos estágios de evolução citológica, por sua vez, são observados no momento da coleta de células endo e ectocervicais uterinas em esfregaços e consistem de cinco classes (I, II, III, IV e V) que variam conforme o grau de indiferenciação celular observado nas células exfoliadas (PAPANICOLAOU e TRAUT, 1943). Em 1989, houve a criação de um outro sistema classificatório, denominado sistema Bethesda, que introduziu o termo lesão intraepitelial escamosa ou SIL (*squamous intraepithelial lesion*), renomeou a classe III da terminologia de Papanicolau como SIL de baixo grau -correspondente as alterações citológicas atípicas encontradas nas classificações histológicas NIC I ou NIC de baixo grau - e agrupou as classes IV e V desta mesma terminologia como SIL de alto grau – correspondente às alterações citológicas atípicas encontradas nas classificações histológicas NIC II e III ou NIC de alto grau (Tabela 2) (HERBST, 1992).

Além disso, essa nova classificação definiu uma nova classe, denominada de citologia atípica de significado indeterminado ou ASCUS (*atypical squamous cells of undetermined significance*). Essa classe é constituída por anormalidades celulares que são mais marcantes do que aquelas atribuíveis a alterações reativas mas que, quantitativa ou qualitativamente, não podem ser diagnosticadas como SIL de baixo grau. O significado do encontro dessa classe em uma lâmina é interpretado como indeterminado

porque as alterações celulares nela apresentadas podem refletir tanto uma alteração benigna exuberante quanto uma lesão potencialmente séria, que não pode ser classificada de maneira equivocada (KURMAN e SOLOMON, 1994).

1.7.2. - Detecção e Tipagem do Dna Viral

A dificuldade de isolamento e cultivo de vírions de HPV, aliada à subjetividade inerente ao diagnóstico morfológico destes vírus nas células e tecidos infectados, priorizaram o desenvolvimento e a utilização de técnicas de biologia molecular visando detectar e identificar o DNA do HPV em materiais biológicos (IARC, 1995).

As infecções pelo HPV podem ser demonstradas por diversas metodologias, com variados níveis de sensibilidade. A detecção de sequências do genoma do HPV ou a identificação das proteínas virais nos tecidos infectados podem ser obtidas através do uso de anticorpos ou sondas específicas em protocolos imunocitoquímicos. Outros métodos, por sua vez, preconizam a amplificação do DNA viral por PCR *in situ*. A estratégia oposta seria a hibridização direta do genoma viral nos espécimes clínicos com sondas específicas, seguida pela amplificação do sinal obtido (IARC, 1995).

As metodologias baseadas em PCR, entretanto, são bastante corriqueiras nos laboratórios de pesquisa, tendo sido empregadas em diversos estudos epidemiológicos visando esclarecer questões relacionadas, por exemplo, à prevalência e persistência dos HPV. A ampla utilização da PCR nestes estudos foi devida a características vantajosas por ela apresentada, como a alta sensibilidade (menos de 10 cópias de genomas de HPV

por célula), a utilização de quantidades ínfimas de espécime clínico e o custo acessível. Além disso, esse tipo de metodologia permite tanto diferenciar os diversos tipos de HPV existentes, através do uso de conjuntos de iniciadores específicos, quanto amplificar uma ampla gama de HPV para posterior reação de tipagem dos mesmos com sondas específicas, através do uso de conjuntos de iniciadores genéricos (IARC, 1995).

As metodologias baseadas na utilização de técnicas de hibridização também são de enorme importância no diagnóstico do HPV. O *Southern blot*, por exemplo, é um método amplamente utilizado na identificação e tipagem de HPV, mas tem disputado espaço com uma metodologia recentemente desenvolvida, a Captura Híbrida (IARC, 1995). Esta metodologia, por sua vez, diferencia os tipos de HPV de alto e baixo risco através da utilização de dois conjuntos de sondas não radioativas e da posterior identificação dos complexos DNA/RNA (vírus/sondas) formados por anticorpos específicos acoplados a compostos quimioluminescentes (CLAVEL *et al.*, 1998; FARTHING *et al.*, 1994).

A detecção do genoma viral, ou de seus transcritos, em lesões pode ser efetuada através da metodologia da hibridização *in situ*, efetuada em células ou tecidos fixados em lâminas com o uso de sondas de DNA ou RNA. Esta técnica, apesar da menor sensibilidade, ainda é importante nos ensaios que objetivam localizar o genoma viral no tumor ou buscar a correlação da expressão de genes virais específicos e a evolução da lesão (DURST *et al.*, 1992).

1.7.3. Detecção Sorológica

A detecção sorológica da infecção pelo HPV ainda não tornou-se uma prática de rotina na maioria dos laboratórios devido a razões tanto históricas quanto práticas. A insuficiência de taxas de sensibilidade e especificidade, capazes de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, e a ausência de reagentes padronizados disponíveis para avaliar de maneira crítica a resposta imune aos epítomos superficiais conformacionais do vírion nos primeiros ensaios sorológicos desenvolvidos não permitiram a utilização imediata desta técnica (SCHILLER e RODEN, 1996).

Os ensaios mais recentes de ELISA, entretanto, desenvolvidos com VLP de vários tipos de HPV (genitais e cutâneos), têm demonstrado a utilidade de ter-se anticorpos séricos anti-vírion como marcadores de infecção de HPV (SCHILLER e RODEN, 1996). Apesar disso, a dificuldade em encontrar soros-controle verdadeiramente negativos para a infecção por este vírus e em definir os valores de *cutoff* para análise dos resultados dos ensaios imunoenzimáticos permanecem como questões abertas até os dias de hoje.

A concordância **intralaboratorial** dos resultados dos ensaios de ELISA-VLP para HPV-16 é boa, ao passo que a concordância **interlaboratorial** destes resultados é considerada de moderada a boa, sugerindo que este tipo de ensaio seria melhor se utilizado para fazer comparações entre duas populações (casos e controles, por exemplo) dentro de um mesmo laboratório. Os autores deste estudo colocam também, entretanto, que a o tratamento de valores marginais como indeterminados e a partilha de espécimes

séricos positivos e negativos através de toda a comunidade de pesquisa poderia auxiliar na obtenção de uma generalização dos resultados melhor padronizada de um laboratório para outro (STRICKLER *et al.*, 1997).

Em termos históricos, tanto os estudos sobre os aspectos imunológicos das infecções por HPV quanto o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos para detectar estas infecções ficaram estagnados durante muito tempo, devido à falta de uma fonte farta de antígenos virais, uma vez que os HPV não podem ser propagados em cultura de tecidos (GALLOWAY, 1992, 1996). No princípio, uma das únicas fontes de antígenos virais existentes era a recuperação de partículas virais de HPV através da purificação direta de extratos de verrugas, mas o rendimento de tal metodologia era relativamente baixo. E grandes quantidades destes antígenos, por sua vez, eram imprescindíveis para o desenvolvimento de diversos ensaios, cujo objetivo fosse avaliar não somente as respostas humoral e celular dos indivíduos infectados pelo HPV mas também medir a infectividade e/ou a neutralização deste vírus (GALLOWAY, 1996).

As primeiras abordagens utilizadas para superar a inexistência dessa fonte de antígenos virais advieram da determinação das sequências de DNA dos diversos tipos de HPV, cuja informação foi utilizada na clonagem de genes virais codificadores para proteínas estruturais ou regulatórias em vetores de expressão gênica, tais como a expressão de proteínas de fusão e a expressão de capsídios virais vazios ou *virus-like particles* (VLP), ou na construção de peptídeos sintéticos. Além disso, novas metodologias para a obtenção de vírions completos, continuaram sendo desenvolvidas (Tabela 3) (GALLOWAY, 1996).

Tabela 3: Sumário de características das principais fontes de antígenos de HPV utilizadas em ensaios imunológicos (resumido de Galloway, 1992 e Hagensee & Galloway, 1996).

Fonte de Antígeno	Metodologia para Geração	ORF e Tipos de HPV Utilizados	Vantagens do Antígeno	Desvantagens do Antígeno	Tipos de Epítomos Gerados
Proteínas de Fusão	Clonagem de ORF de HPV em <i>Escherichia coli</i>	-6, -11, -16, -18 L1, L2, E4 e E7	- Elevada expressão - Elevada reprodutibilidade - Baixo Custo	- Insolubilidade em água - Difícil Purificação - Uso limitado a ensaios de Western blot	Lineares
Peptídeos Sintéticos	- Algoritmos de hidrofiliicidade e antigenicidade das sequências genômicas - Construção e teste de séries de peptídeos sobrepostos - Mapeamento de regiões imunoreativas de ORF expressa como proteínas de fusão	-6, -11, -16 Região Precoce Inteira L1, L2	- Elevado Rendimento - Baixo Tempo de Execução	Permite apenas a pesquisa de anticorpos gerados contra epítomos lineares	Lineares
Víriões Completos	- Geração através de transplantes inter-específicos em camundongos atímicos - Purificação de Extratos de Verrugas Plantares - Obtenção de partículas através de Modelos Experimentais de Vacas Infectadas - Produção de Víriões em Culturas Organotípicas	-1, -11 Todas	Permite a pesquisa de anticorpos gerados contra epítomos conformacionais	- Baixo rendimento - Complexa Execução	Conformacionais

A abordagem que proporcionou um novo impulso aos estudos de imunologia das infecções por HPV e, em especial, para o desenvolvimento dos ensaios sorológicos, foi a produção dos capsídios virais (VLP) de HPV-16 em células de insetos (eucarióticas) (FRAZER, 1996; GALLOWAY, 1996; SCHILLER e RODEN, 1996). Esta produção foi efetuada através da transfecção de baculovírus recombinantes para o gene L1 ou para os genes L1/L2 nestas mesmas células (KIRNBAUER *et al.*, 1992; 1993; 1994). A produção de VLP também pode ser conseguida em bactérias (LI *et al.*, 1997), leveduras (LOWE *et al.*, 1997; SASAGAWA *et al.*, 1995), e outros sistemas de expressão heterólogos (ZHOU *et al.*, 1993).

Estes capsídios são semelhantes em conformação aos virions selvagens infecciosos, mas não possuem o material genético, potencialmente oncogênico, responsável pelo estabelecimento da infecção viral. Esse fato torna o seu uso como antígenos virais muito interessante, tanto como antígenos em imunoenaios desenvolvidos para avaliar a resposta humoral contra os vírions de HPV em indivíduos saudáveis ou afetados, quanto como antígenos indutores de respostas imunológicas no desenvolvimento de vacinas profiláticas contra as infecções por HPV (SCHILLER e RODEN, 1996).

Além disso, os ensaios do tipo ELISA-VLP, permitiriam que se tomassem medidas acuradas de exposição prévia ou corrente ao vírus de HPV e facilitariam o desenvolvimento e a avaliação de vacinas baseadas no uso de VLP de HPV (GALLOWAY, 1996; SCHILLER e RODEN, 1996).

1.7.3.1. - Estudos sobre a Prevalência de Imunoglobulinas contra VLP de HPV

Estudos sobre a resposta imunológica desencadeada nos indivíduos portadores de infecções pelo papilomavírus humano (HPV) concluíram que a imunidade celular parece controlar não só o tamanho e o tempo de duração da lesão HPV-induzida, mas também a aquisição de novas infecções, o estabelecimento de infecções persistentes, a ativação de infecções latentes e a produção de partículas virais (FRAZER, 1996; HO *et al.*, 1994; PETRY *et al.*, 1994).

A avaliação da resposta imune humoral desencadeada pelas infecções pelo HPV é detectada através de ELISA e pode utilizar como antígenos virais tanto peptídios, representando segmentos de ORF de genes de interesse do HPV, quanto VLP. O uso de peptídios sintéticos permite avaliar a resposta humoral dirigida a epítomos lineares representativos de lesões portadoras do genoma do HPV já integrado (DE SANJOSÉ *et al.*, 1996; DE GRUIJL *et al.*, 1996). O uso de VLP, por sua vez, permite a pesquisa de respostas imunes dirigidas contra epítomos conformacionais representativos de lesões que apresentam infecções produtivas de partículas virais (DILLNER *et al.*, 1995).

Mais da metade dos casos de câncer associados ao HPV-16 tem **respostas humorais detectáveis** em ensaios do tipo ELISA-VLP, e este tipo de metodologia parece ser mais sensível na detecção de anticorpos presentes em casos de neoplasias pré-malignas do que de lesões francamente malignas (NONNENMACHER *et al.*, 1995). Essa metodologia pode ser útil como um marcador para avaliar o risco relativo das neoplasias associadas aos HPV e o risco elevado das infecções de tipos de HPV

associados a neoplasias em populações saudáveis, através da detecção de imunoglobulinas da classe G (NONNENMACHER *et al.*, 1995). Além disso, a soropositividade em um ELISA-VLP parece refletir a exposição cumulativa relativa aos HPV, especialmente em populações geográficas que apresentam um elevado risco de desenvolver câncer cervical, como a da Groenlândia, de maneira mais eficiente do que a detecção do DNA deste vírus (NONNENMACHER *et al.*, 1996, OLSEN *et al.*, 1997).

A soropositividade contra HPV-16 está associada de maneira significativa ao quanto os indivíduos estiveram expostos ao HPV-16 durante a sua vida sexual (OLSEN *et al.*, 1996; STRICKLER *et al.*, 1999), correlacionando-se fortemente com a detecção, corrente ou prévia, do DNA de HPV-16 (OLSEN *et al.*, 1996). Os estudos de WIDEROFF *et al.* (1996) complementaram esses dados, demonstrando que a detecção persistente do DNA de HPV-16 confere uma elevação brutal da taxa de soropositividade de anticorpos contra HPV-16 (WIDEROFF *et al.*, 1996).

STRICKLER *et al.* (1999) demonstraram que a sorologia para HPV-16 pode ser útil como um marcador de exposição sexual aos tipos de HPV anogenitais, seja em mulheres ou homens. A detecção da presença desse vírus através do uso de testes baseados em métodos de hibridização de DNA é difícil dentre os homens, o que tornaria a sorologia uma metodologia interessante para o estudo da disseminação viral nesta população. Além disso, esses autores demonstraram também que as taxas de soroprevalência de anticorpos contra HPV-16 são maiores dentre os indivíduos tratados por clínicas de controle de doenças sexualmente transmissíveis (DST) do que dentre indivíduos doadores de sangue (STRICKLER *et al.*, 1999).

O diagnóstico sorológico através do uso de VLP como antígenos pode ser utilizado como um marcador de comportamento sexual nas populações, conforme demonstrado por DILLNER *et al.* (1996). Esses autores relataram que a prevalência de anticorpos contra HPV-16 em uma população de mulheres aumenta em cerca de 4% para cada parceiro sexual acrescentado ao longo da vida e que a soroprevalência de anticorpos contra HPV-18 e de HPV-33 foram, também, linearmente dependentes do número de parceiros (DILLNER *et al.*, 1996).

A utilização de peptídios como antígenos, por sua vez, permite que o diagnóstico sorológico seja utilizado como um marcador de massa tumoral. DE SANJOSÉ *et al.* (1996) relataram que anticorpos contra os peptídios E2 e, particularmente, E7, estão fortemente associados ao câncer cervical, sendo que os anticorpos contra E7 parecem ser marcadores, embora moderados, de massa tumoral (DE SANJOSÉ *et al.*, 1996).

DE GRUIJL *et al.* (1996) afirmaram que a reatividade sorológica contra um peptídio sintético da ORF E7 de HPV-16 é significativamente maior nos pacientes cujas infecções não mais apresentam DNA de qualquer tipo de HPV do que naqueles que apresentam infecções persistentes por este mesmo vírus. Os mesmos autores encontraram resultados sugestivos de que os anticorpos específicos contra VLP de HPV-16 não seriam responsáveis pela eliminação das lesões induzidas pelo vírus, mas poderiam ser indicativos de um risco aumentado para o câncer cervical em pacientes com infecções persistentes por HPV-16, funcionando mais como marcadores de progressão do que como agentes eliminadores de infecção (DE GRUIJL *et al.*, 1997).

SASAGAWA *et al.* (1998) relataram que anticorpos das classes IgG e IgA contra VLP de HPV-16 foram frequentemente detectados em mulheres repetidamente positivas para o DNA de HPV-16, em que as respostas por IgA aparecem primeiro e persistem por mais tempo que as respostas por IgG. Assim sendo, a soropositividade parece refletir infecções virais persistentes que podem aumentar o risco para progressão maligna de lesões cervicais, sugerindo que essas infecções são cruciais para o desenvolvimento de respostas humorais efetivas contra o HPV. Os autores sugerem também que os ensaios sorológicos utilizando VLP de HPV-16 podem ser úteis como uma nova ferramenta diagnóstica adjuvante aos testes citológicos cervicais (SASAGAWA *et al.*, 1998).

Em um estudo relacionando a sorologia contra as proteínas E6 e E7 de HPV-16 com dados clínico-patológicos de pacientes com carcinoma cervical, BAAY *et al.* (1997) relataram que os níveis destes anticorpos estão fortemente relacionados com a carga tumoral e o envolvimento de linfonodos nos casos estudados. Esse resultado levantaria a suspeita de que a elucidação da resposta imune contra o HPV em carcinomas cervicais pode ter uma importância chave na compreensão da resposta imune ao tumor. VILADIU *et al.* (1997) também demonstraram que a presença de anticorpos contra as proteínas E7 de HPV-16 pode ser considerada como um possível marcador de valor prognóstico no câncer cervical em estágios iniciais (VILADIU *et al.*, 1997).

Há, ainda, a procura por evidências de que a presença de anticorpos contra proteínas estruturais e/ou regulatórias de vários tipos de HPV poderia ser utilizada como um marcador de estadiamento de doença e do monitoramento de recidivas, ou no sorodiagnóstico de câncer cervical. A soropositividade de anticorpos contra VLP de

alguns tipos de HPV parece fornecer uma correlação sorológica ao estágio do câncer cervical, permitindo o seu uso para monitorar o estado da doença após o tratamento inicial para a malignidade cervical, tal qual um marcador de estágio da doença (FISHER *et al.*, 1996). Os títulos de anticorpos contra capsídios e peptídios do HPV-16, por sua vez, decrescem consideravelmente dentro de um período compreendido entre 16 e 27 meses após o tratamento de conização de pacientes com NIC de alto grau (ELFGREN *et al.*, 1996), indicando que os ensaios sorológicos poderiam também ser utilizados na busca de informações sobre mudanças significativas do estado da paciente durante e após a terapia de tratamento.

O relato de que um número considerável de pacientes com neoplasias cervicais apresentou uma resposta sorológica positiva para anticorpos contra VLP (L1/L2) e contra as proteínas traduzidas *in vitro* E6 e E7 de HPV-16 indicou que estas proteínas poderiam ser utilizadas como marcadores específicos de doença, assim como poderiam ser úteis em ensaios diagnósticos adicionais e em estudos soroepidemiológicos de neoplasias cervicais relacionadas ao HPV (PARK *et al.*, 1998).

Um dos estudos de seguimento (*follow-up*) que muito contribuiu para o conhecimento da resposta sorológica contra vírions de HPV-16, até o momento, foi desenvolvido por CARTER *et al.* (1996), que avaliou estudantes universitárias no início de sua vida sexual durante um período de 3 a 4 anos. Concluiu-se deste estudo que mulheres positivas para o DNA de qualquer HPV têm cerca de 12 vezes mais probabilidade de soroconverter do que as mulheres negativas para o DNA destes vírus, e que esta soroconversão pode ocorrer dentro de um período médio de 8,3 meses após a

detecção do DNA viral. Concluiu-se também que a resposta humoral, apesar de demorar mais tempo para surgir, mantém-se por muito mais tempo no indivíduo do que a detecção do DNA viral ($\cong 3$ anos contra $\cong 14$ meses). Além disso, todas as mulheres que soroconverteram tinham cerca de 6 vezes mais probabilidade de desenvolver SIL associadas ao HPV-16 do que as mulheres que não soroconverteram (CARTER *et al.*, 1996).

O estudo de seguimento Ludwig-McGill sobre os fatores determinantes de risco da infecção pelo HPV e do carcinoma cervical, que vem sendo conduzido em nosso laboratório, também vem obtendo interessantes resultados. A presença de soropositividade no momento da admissão ao estudo foi mais fortemente associada com infecções persistentes pelo HPV durante o primeiro ano de seguimento (RR=2,67) do que com as infecções transientes por esse vírus (RR=1,22), sendo também capaz de prever um risco cumulativo maior para a infecção por tipos de HPV de alto risco (RR=2,23) do que por tipos de baixo risco (RR=1,15). Além disso, a soropositividade no momento de admissão ao estudo também conferiu um maior risco do desenvolvimento de quaisquer SIL, sejam prevalentes (RR=2,21) ou incidentes (RR=1,85), aliado a um risco mais elevado para o desenvolvimento específico de SIL de alto grau ou HSIL (RR=2,74) do que para qualquer SIL (RR=1,88), mesmo após o ajuste das análises para presença de DNA de HPV e idade à admissão (CANDEIAS *et al.*, 1997, 1999; CANDEIAS, 1998).

O comportamento dos anticorpos contra VLP de HPV na população masculina também foi investigado. A sororeatividade de anticorpos contra HPV-16 em homens que

frequentam clínicas para o atendimento de DST parece ser um biomarcador para exposição aos tipos de HPV genitais bem menos sensível em homens do que em mulheres (SVARE *et al.*, 1997). Já a avaliação de prevalência de anticorpos contra HPV-6 ou HPV-16 em homens homossexuais, portadores ou não do vírus da imunodeficiência humana (HIV), concluiu que a infecção pelo HIV não foi associada significativamente com soropositividade contra HPV, falhando em demonstrar um possível papel dos anticorpos séricos no controle de infecções existentes por HPV. Nessa população, entretanto, foram encontradas correlações entre a presença de anticorpos contra HPV-6, a detecção de DNA de HPV-6/11 anal e o estado de doença, através da presença de verrugas anais (HAGENSEE *et al.*, 1997).

A avaliação da resposta imune humoral ao HPV em mulheres infectadas pelo HIV, por sua vez, envolveu a pesquisa de anticorpos das classes IgG, IgA e IgM contra VLP de HPV6/11, -16, -18 e -31 e resultou em maior prevalência de anticorpos IgG e IgA para todos os tipos de HPV analisados dentre as mulheres soropositivas para o HIV do que entre os controles não infectados pelo HIV. A resposta por anticorpos da classe IgM foi baixa. Além disso, a taxa extraordinariamente alta de anticorpos contra a proteína do capsídio L1 de HPV de alto risco dentre a população de mulheres positivas para o HIV sugere uma exposição cumulativa vitalícia elevada ao HPV e uma expressão aumentada das proteínas do capsídio devido ao estado de imunodeficiência a que as mulheres infectadas pelo HIV estão submetidas (PETTER *et al.*, 2000).

Já o estudo da prevalência de anticorpos contra HPV-16 (47%) e -6 (62%) em uma população de mulheres homossexuais e bissexuais revelou que, tanto as infecções

por HPV genitais quanto as lesões intraepiteliais escamosas, são muito comuns entre mulheres que são sexualmente ativas com outras mulheres e ocorrem, inclusive, entre aquelas mulheres que reportaram nunca haver tido relações heterossexuais (MARAZZO *et al.*, 1998).

O teste da prevalência de imunoglobulinas das classes IgG (12%) e IgA (6%) contra VLP de HPV-16 em amostras de esfregaços cervicais, através de um imunoensaio com revelação quimioluminescente, resultou em fortes associações de anticorpos da classe IgG com detecção prévia do DNA de HPV-16 (dentro de 12 meses) e de anticorpos da classe IgA com detecção prévia de SIL (dentro de 4-8 meses). Esses resultados indicam que, assim como ocorre para os anticorpos séricos contra HPV-16, parece haver um atraso de vários meses entre a infecção cervical pelo HPV e a detecção de anticorpos cervicais contra esse vírus (HAGENSEE *et al.*, 2000).

Outro estudo, demonstrou uma forte associação entre soropositividade de anticorpos contra VLP de HPV-16, -18, -31 e 45 e a detecção dos respectivos DNAs desses tipos virais. Além disso, a soropositividade de anticorpos contra qualquer tipo de HPV associou-se com uma elevação dos títulos de anticorpos contra todos os outros tipos virais analisados. Esses resultados sugerem que a soropositividade de anticorpos contra um dado tipo de HPV reflete principalmente uma infecção tipo-específica mensurada pela detecção do DNA, podendo também sinalizar exposições passadas a outros tipos que estariam detectáveis no soros somente no momento dessa análise (WIDEROFF *et al.*, 1999).

Poucos trabalhos relatam a determinação da prevalência de imunoglobulinas da classe IgM contra as VLP de alguns tipos de HPV em literatura no decorrer dos últimos anos. HAGENSEE *et al.* (1995) demonstraram experimentalmente que a imunização de camundongos com capsídios purificados de HPV-1 resultava na detecção de IgM sérica (resposta primária), precedente ao aparecimento de IgG (resposta secundária) em cerca de duas semanas, e estável por um período compreendido entre 1 e 3 semanas. Essa resposta primária foi direcionada especificamente contra os epítomos nativos da proteína L1 do HPV-1 (HAGENSEE *et al.*, 1995).

Outro estudo relatou que a prevalência sérica de anticorpos da classe IgM contra HPV-16, em crianças, estava compreendida em um intervalo de 20 a 60%. Os maiores títulos de soropositividade foram encontrados na faixa etária compreendida entre 1 e 10 anos, seguida por uma queda na faixa etária seguinte (11-15 anos) e uma nova elevação a partir dos 16 anos, coincidindo com o início da atividade sexual destas crianças (CASON *et al.*, 1995).

O estudo de HEIM *et al.* (1995) foi um dos primeiros a avaliar a prevalência de anticorpos da classe IgM anti-VLP de HPV dos tipos -6 e -11 em cinco grupos de pacientes de clínicas ginecológicas, tendo encontrado os seguintes resultados: 79% das pacientes com condiloma acuminado, 64% das pacientes com CIN, 6% das pacientes-controle, 19% das pacientes grávidas pré-parturientes e 0% dos neonatos nascidos destas últimas pacientes apresentaram anticorpos da classe IgM contra estas VLP (HEIM *et al.*, 1995).

SASAGAWA *et al.* (1996) relataram resultados sugestivos de que as respostas humorais baseadas em imunoglobulinas das classes IgA e IgG são HPV-16 específicas, enquanto que as respostas humorais baseadas em imunoglobulinas da classe IgM reagem cruzadamente com vários tipos de HPV (SASAGAWA *et al.*, 1996).

VAN DOORNUM *et al.* (1998), por outro lado, relataram não ter encontrado respostas imunes específicas baseadas em IgM em uma coorte de mulheres suecas avaliada para infecções com os tipos 6, 11 e 16 de HPV, embora houvesse uma resposta IgG e IgA específica e mensurável em todos os casos. Já no caso das infecções com os tipos 18 e 33 de HPV, houve uma fraca resposta IgM específica que acompanhou respostas normais de IgG e IgA no caso do HPV-18 e respostas também fracas destas duas imunoglobulinas no caso do HPV-33. Assim, os autores consideraram inadequado utilizar a medida de IgM como correlata de infecções recentes nas mucosas, dados os títulos muito baixos desta imunoglobulina no soro (VAN DOORNUM *et al.*, 1999).

Atualmente, têm-se levantado a hipótese de que talvez a detecção de IgA sérica seja um melhor marcador para infecções presentes e produtivas do que a IgM. A tipo-especificidade da resposta de anticorpos contra os capsídios de HPV-16 estende-se por diversos isotipos de anticorpos e implica que os anticorpos das classes IgG total e dos isotipos IgG1 são marcadores estáveis da exposição cumulativa vitalícia, enquanto que a resposta baseada em IgA parece ser um melhor marcador de infecções produtivas e ainda presentes. Os anticorpos das classes IgG e IgA eram os mais abundantes, ao passo que menos do que 2% dos soros testados por este grupo continham anticorpos da classe IgM contra capsídios de HPV-16. Além disso, as classes de anticorpos IgG total e IgA,

assim como o isotipo IgG1, foram associados com casos de NIC III e puderam predizer riscos de neoplasias cervicais posteriores (WANG *et al.*, 2000).

Ainda, seguindo por esta linha, BONTKES *et al.* (1999) demonstraram que as respostas baseadas em IgA sérica tendiam a correlacionar-se melhor com a eliminação do HPV do que a IgA local, em uma coorte de mulheres submetidas a um estudo prospectivo na Holanda. Entretanto, neste estudo não foi avaliada a resposta baseada em IgM para comparação (BONTKES *et al.*, 1999).

A contribuição da análise da prevalência das imunoglobulinas IgG e IgM contra VLP de HPV-16 no contexto de um estudo prospectivo sobre os fatores determinantes da prevalência de HPV na cérvix uterina pode vir a ser extremamente abrangente. O maior conhecimento do comportamento soroepidemiológico das infecções pelo HPV teria uma importância fundamental nas pesquisas que visam uma melhor compreensão da história natural dessas infecções. Além disso, indubitáveis avanços no diagnóstico clínico das infecções pelo HPV poderiam decorrer de um maior estudo da resposta imune humoral contra esses vírus, resultando em uma otimização da identificação de indivíduos infectados pelo vírus ou de indivíduos em risco para o desenvolvimento de câncer.

2. - OBJETIVOS

1. Avaliar a resposta imune humoral contra o HPV-16 através da determinação da prevalência de imunoglobulinas das classes IgG e IgM nos soros de mulheres assintomáticas pertencentes a uma população de risco para o câncer cervical.

2. Correlacionar os resultados da sororeatividade com diferentes determinantes de risco para infecções por HPV e neoplasia cervical obtidos em um estudo epidemiológico prospectivo.

3. - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. – Coleta das Amostras de Soro

3.1.1. – Soros de Mulheres Assintomáticas Participantes do Estudo

Prospectivo Ludwig/McGill

Os espécimes utilizados nesse trabalho foram coletados após o consentimento expresso das pacientes envolvidas, que concordaram em participar de um estudo prospectivo de longa duração sobre a história natural da infecção pelo HPV e neoplasia cervical e os fatores determinantes da persistência deste vírus na cérvix uterina em uma população de mulheres de baixa renda em São Paulo. Este estudo vem sendo coordenado pela Dra. Luisa Lina Villa, do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, filial São Paulo, e pelo Dr. Eduardo L. Franco, da Universidade McGill, Montreal/Quebec, Canadá e foi aprovado pelos comitês de ética dos hospitais e instituições envolvidos.

Durante um período de três anos e quatro meses (nov./93 – mar./97) foram admitidas 2529 mulheres atendidas pelas clínicas de ginecologia e planejamento familiar do Hospital Municipal de Vila Nova Cachoeirinha, São Paulo, S.P. em um programa de estudo constante de várias etapas. À admissão, todas as mulheres foram submetidas à uma avaliação prévia de seus hábitos de higiene, de sua atividade sexual e de suas condições sócio demográficas através do preenchimento de um questionário padrão. A

seguir, nessa mesma consulta, eram colhidas as amostras de esfregaços cervicais para realização dos exames citológicos de Papanicolaou e para a detecção, tipagem e quantificação do DNA de HPV, juntamente com as amostras de soro destinadas a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM contra o HPV. Durante o período de um ano, subsequente à data da admissão, foram colhidas novas amostras de esfregaços cervicais e de soros, intercaladas por intervalos de quatro meses entre as consultas, seguindo-se os mesmos procedimentos realizados à consulta de admissão. Nos anos subsequentes, até o encerramento do estudo, previsto para o ano de 2002, novas amostras de esfregaços e soros serão colhidas em consultas intercaladas por intervalos de seis meses, através do mesmo protocolo (FRANCO *et al.*, 1999a).

3.1.2. – Soros Controle (BR)

A determinação de soros controles verdadeiramente negativos para anticorpos contra o HPV que pudessem ser incluídos em imunoenaios do tipo ELISA é dificultada pelas características de transmissão desse vírus. A existência de outras formas de transmissão do HPV, além da transmissão via atividade sexual, não permite que se elimine a probabilidade de que mesmo os soros provenientes de populações normalmente utilizadas como controle negativo para a infecção por esse agente, como freiras, virgens ou recém-nascidos, devido sua provável ausência de atividade sexual, tenham baixos títulos de anticorpos contra o HPV provenientes de um contato prévio com esse vírus através de uma transmissão vertical, por exemplo.

A necessidade de se estabelecer alguns soros que fossem capazes de atuar como soros de controle intra e inter-ensaios, cujos intervalos de variação de valores de absorbância bruta resultantes fossem conhecidos, também se fez presente no momento da padronização dessa metodologia. Esses soros poderiam atuar também como fatores de normalização dos resultados obtidos pois, ao menos em teoria, eles demonstrariam o *background* populacional quanto ao título de anticorpos anti-HPV presentes naturalmente na população. Esses anticorpos anti-HPV populacionais adviriam de cicatrizes sorológicas obtidas após contatos prévios dos indivíduos com o agente e não estariam, necessariamente, sujeitos à presença concomitante do DNA viral.

Em virtude disso, fez-se necessária a obtenção de um *pool* de soros proveniente de doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital A.C.Camargo, São Paulo. Todos os soros, que resultaram negativos para os testes efetuados no momento da doação de sangue (Chagas, Sífilis, HIV, Hepatites B e C, ALT e anti HTLV-1), foram colocados num único frasco e alcançaram um volume final de 4 litros de soro, o que deveria ser suficiente para a sua utilização como controle até o final do estudo, de forma a eliminar as eventuais variações que ocorreriam caso houvesse o esgotamento do estoque e fosse necessária a substituição desse *pool* por um novo lote de soro controle. As alíquotas deste soro, designado *pool* BR, estão armazenadas em freezers a uma temperatura de -20°C .

3.1.3. – Seleção de Soros para a Determinação da Prevalência de
Anticorpos da Classe IgG contra VLP de HPV-16

As amostras testadas para determinação de anticorpos contra VLP de HPV-16 pertencentes à classe IgG foram selecionadas dentre a coorte de 2529 mulheres pertencentes ao estudo prospectivo descrito no item A, de forma a obter uma amostragem do tipo caso-controle aninhado (*nested case-control sampling*). A seleção das amostras foi realizada pelo Dr. Eduardo L. Franco, Diretor da Divisão de Epidemiologia, Departamento de Oncologia Clínica, da Universidade McGill, Montreal, Quebec, Canadá. Assim, foram selecionadas 1052 pares de amostras, referentes às amostras colhidas no momento da admissão ao estudo e da consulta de primeiro retorno (visitas 1 e 2, respectivamente). A aluna só teve acesso aos bancos de dados no momento em que efetuou as análises sorológicas para evitar a formação de viés estatístico.

O critério adotado para efetuar a escolha foi o que se segue:

Os casos foram considerados como todas as mulheres que apresentaram resultado positivo para a presença do DNA de HPV e/ou lesão intraepitelial escamosa incidentes ou prevalentes durante o primeiro ano do estudo.

Os controles, por sua vez, consistem de uma amostra aleatoriamente selecionada de mulheres cujos espécimes cervicais não apresentavam anormalidades citológicas e eram negativos para o DNA de HPV, tanto na época de admissão ao estudo quanto durante múltiplas visitas de retorno. Os controles incluíram um subgrupo de 610

mulheres que tiveram resultados de HPV e citologia consistentemente negativos nas amostras provenientes do primeiro ano de estudo (admissão, 4 meses, 8 meses e 12 meses) e foram utilizadas para definir os pontos de corte (*cutoffs*) sorológicos.

3.1.4. – Seleção de Soros para a Determinação da Prevalência de Anticorpos da Classe IgM contra VLP de HPV-16

As amostras testadas para determinação de anticorpos contra VLP de HPV-16 pertencentes à classe IgM foram selecionadas pelo Dr. Eduardo L. Franco, a partir do mesmo critério descrito acima para IgG. Da mesma forma que a escolha das amostras séricas destinadas à determinação da prevalência de anticorpos da classe IgG, o intuito desta abordagem fundamentou-se, também, na determinação de uma amostragem do tipo caso-controle aninhado que incluiu a escolha de um número total de 626 mulheres, composto tanto por indivíduos controle quanto por casos, ou seja, mulheres portadores de infecções primárias.

A determinação de anticorpos contra VLP de HPV-16 pertencentes à classe IgM foi realizada em amostras provenientes de 290 mulheres escolhidas dentre as 626 mulheres supracitadas, colhidas em dois diferentes momentos dentro do estudo: no momento do início do estudo e após um ano. Tal se deveu ao fato de que como a IgM é, basicamente, uma imunoglobulina típica da fase inicial da resposta imune, o teste de amostras colhidas ao início do estudo seria uma tentativa de avaliar o perfil dessa

imunoglobulina na população em teste que, aliado ao teste de amostras colhidas após um ano de seguimento do mesmo, poderia favorecer a detecção dos picos dessa imunoglobulina e a associação dos mesmos ao surgimento de positividade para o DNA de HPV e ao desenvolvimento de lesões cervicais.

3.2. - Exame Citológico das Amostras

As lâminas de esfregaços cervicais coradas pelo método de Papanicolaou de cada paciente, foram examinadas por um citotécnico treinado do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e revisadas pelos citopatologistas do grupo coordenado pelo Dr. A. Ferenczi, da Universidade McGill em Montreal/Canadá, sem o conhecimento prévio de qualquer resultado da paciente.

A classificação das lâminas empregou o sistema de Bethesda (HERBST, 1992) de diagnóstico de citologia cervical, instituído em 1989, que organizou o sistema de classificação citopatológica para a leitura dos esfregaços cervicais vigente na época. As terminologias normalmente adotadas em todas as classificações existentes estão expostas na Tabela 2 e algumas das abreviações mais utilizadas em nosso estudo vêm descritas abaixo.

- NIC – neoplasias intraepiteliais cervicais.
- ASCUS – células escamosas atípicas de significado indeterminado [*atypical squamous cells of undetermined significance*].

- SIL – lesão intraepitelial escamosa [*squamous intraepithelial lesion*].
- LSIL - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau [*low-grade squamous intraepithelial lesion*].
- HSIL – lesão intraepitelial escamosa de alto grau [*high-grade squamous intraepithelial lesion*].

3.3. – Avaliação da Presença do DNA de HPV nas Amostras

Os dados resultantes da análise do DNA de HPV foram correlacionados com os resultados obtidos na sorologia para HPV. A detecção do DNA de HPV forneceu alguns aspectos importantes para serem correlacionados com a soropositividade de anticorpos contra VLP de HPV-16: a detecção transiente ou persistente do DNA viral nas infecções pelo HPV, e a existência de possíveis infecções primárias por esse vírus.

- Infecção transiente: os espécimes cervicais de pacientes que apresentaram a detecção do DNA de um mesmo tipo de HPV em uma única amostra, proveniente de uma única visita, foram considerados como indicativos de uma infecção transiente ou passageira.
- Infecção persistente: os espécimes cervicais de pacientes que apresentaram a detecção do DNA de um mesmo tipo de HPV em mais de uma amostra, sejam elas provenientes de visitas consecutivas ou não, foram considerados como indicativos de uma infecção persistente.

- Infecção primária: os espécimes cervicais de pacientes que apresentaram a detecção do DNA de qualquer tipo de HPV nas amostras colhidas após um ano de seguimento do estudo, seguindo esfregaços cervicais negativos para qualquer tipo de HPV no início do estudo, foram considerados como indicativos de uma infecção primária.

3.3.1. - Extração do DNA de HPV

As células oriundas do esfregaço da região genital colhidos com o auxílio de uma escova (Cytobrush) foram transferidas para tubos contendo o tampão Tris/EDTA 10 mM/1mM (Tampão de Eluição ou T.E.). A extração do DNA de HPV das amostras foi efetuada por tratamento com 1mg/ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 20mg/ml de proteinase K, seguido por incubação em banho-maria a 37° C *overnight*. A seguir, efetuou-se a inativação da proteinase K por ebulição do material a 95°C durante 10 minutos. A purificação do DNA das amostras foi realizada através do uso do kit Glass Max DNA Isolation (GIBCO BRL). Em resumo, 200µl de amostra tratada foram adicionados a 900 µl de *Binding solution* (Iodeto de sódio 5M), 550 µl dessa solução foram aplicados em colunas de Sepharose, que foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante foi descartado e os 550 µl restantes da amostras foram adicionados às mesmas colunas, e centrifugados novamente. As colunas foram então lavadas com 400 µl de solução de lavagem (Concentrado do kit, 71 ml de água

deionizada e 85 ml de etanol absoluto) por 3 vezes em centrifugações a 13.000 rpm por 20 segundos. Um passo adicional de centrifugação seguindo as mesmas especificações para as colunas secas também foi efetuado, no intuito de concentrar o DNA purificado. Finalmente, foram adicionados 50 µl de água Milli-Q a 65°C a essas colunas, que foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 20 segundos, e o sobrenadante resultante, contendo o DNA purificado, foi armazenado a - 20°C.

3.3.2. - Detecção e Tipagem do DNA de HPV

A detecção do DNA de HPV nas amostras foi feita através da reação de PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando-se os primers genéricos MY 09/11, que amplificam uma região muito conservada de 450 pares de bases (pb) do gene L1 de HPV (BAUER *et al.*, 1992).

A tipagem dos HPV foi feita através da reação de hibridização em pontos (*dot-blot*) com sondas de oligonucleotídeos específicas para os seguintes tipos de HPV: 06, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 70, 72 e 73. Além disso, foi também avaliada a presença de alguns HPV, isolados de espécimes clínicos, mas ainda não formalmente determinados tais como PAP 155, PAP 291 e W13B. (BAUER *et al.*, 1992; HILDESHEIM *et al.*, 1993).

3.4. - Elisa para a Detecção de IgG e IgM contra HPV-16

A metodologia de ELISA utilizada neste estudo foi a descrita por KIRNBAUER *et al.* (1994), com modificações.

3.4.1. - Antígeno: VLP de HPV-16

Os antígenos utilizados neste trabalho foram gentilmente fornecidos pelo Dr. John T. Schiller, chefe do Laboratório de Oncologia Celular, do *National Cancer Institute* (NCI), *National Institute of Health* (NIH), USA. A obtenção de capsídios vazios do HPV ou *virus-like particles* (VLP), muito semelhantes aos capsídios do vírus natural, deu-se através da expressão dos genes L1 e L2 do capsídio do HPV em baculovírus, conforme anteriormente descrito (KIRNBAUER *et al.*, 1992 e 1993).

3.4.2. - Etapa de Adsorção do Antígeno à Microplaca

A solução de VLP de HPV-16 purificada foi diluída em PBS 150 mM, pH 7,3, até alcançar uma concentração final de 0,01 µg/ml, para que um volume de 50 µl desta diluição fosse adicionado às cavidades de uma microplaca de 96 poços da marca Immulon II (Dynatech, Chantilly, VA, USA). A seguir, a microplaca foi incubada em

câmara úmida por 2 horas a 37°C ou “overnight” a 4°C. Após este período, a placa foi lavada por três vezes, durante três minutos a cada vez, em um lavador automático de microplacas (BIORAD, USA) utilizando a mesma solução tampão.

3.4.3. - Etapa de Bloqueio

Esta etapa foi realizada apenas nos ensaios determinantes de IgM porque os baixos títulos de IgM séricos resultaram em ensaios muito reativos devido ao aumento de ruído de fundo das placas. Nos ensaios determinantes de IgG, por outro lado, esta etapa foi efetuada concomitantemente à adição dos soros.

Um volume de 50 µl de “PBS enriquecido”, (constituído por 0,5% de leite desnatado diluído em PBS 150 mM, pH7,3, acrescido de 0,1% de soro fetal bovino [GIBCO] e 1% de albumina bovina sérica fração V [BSA - INLAB]) foi adicionado a cada microplaca. Após incubação em câmara úmida a 37°C, durante 90 minutos, a microplaca foi lavada cinco vezes, durante três minutos cada vez, em um lavador automático de microplacas (BIORAD,USA), com PBS 150 mM, pH7,3.

3.4.4. – Etapa de Adição dos Soros Pesquisados

Um volume de 50 µl dos soros dos pacientes diluídos a 1:10 e a 1:50 em “PBS enriquecido”, com o objetivo de bloquear reações inespecíficas, (constituído por 0,5% de leite desnatado diluído em PBS 150 mM, pH7,3, acrescido de 0,1% de soro fetal bovino [GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD, USA] e 1% de albumina bovina sérica fração V [BSA – INLAB, SP, BR]) foram adicionados às cavidades da microplaca logo após a última lavagem. Após incubação em câmara úmida a 37°C, durante 45 minutos, a microplaca foi lavada cinco vezes, durante três minutos a cada vez, em um lavador automático de microplacas, com PBS 150 mM, pH7,3.

As soluções de PBS enriquecido utilizadas nestes ensaios foram feitas no dia de cada reação e foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos antes do uso para evitar a presença de grumos de leite ou de outros compostos não totalmente dissolvidos.

Todos os soros em teste foram testados em duplicata, e a média aritmética da absorbância apresentada por cada soro foi utilizada no cálculo dos pontos de corte ou *cutoff* e dos índices de absorbância normalizadas (vide adiante) e na análise estatística. Utilizamos como controles da reação de ELISA seis canaletas *blank* (contendo apenas o antígeno e as diluições do conjugado e do substrato) e seis canaletas em que o *pool* de soros (BR) foi adicionado. A média dos valores de absorbância obtidos para os soros BR foi também utilizada para o cálculo dos índices de absorbância normalizada.

3.4.5. - Etapa de Adição do Conjugado

Foram adicionados às cavidades 50 µl de soro de cabra anti IgG ou anti IgM humana conjugado com peroxidase (Tago Immunologicals, USA), diluído a 1:10.000 em “PBS enriquecido”. A microplaca foi incubada por uma hora, em câmara úmida, à 37°C e, posteriormente, lavada por 3 vezes, durante 3 minutos a cada vez, em um lavador automático de microplacas, com PBS 150 mM, pH7,3.

3.4.6. - Etapa de Adição do Substrato

Foram adicionados à microplaca 100 µl da solução de substrato peróxido de hidrogênio ou H₂O₂ (10 µl), na presença do cromógeno orto-phenil-diamina ou OPD (10 mg) dissolvido em 25 ml de tampão citrato, sendo esta incubada à temperatura ambiente, no escuro. Após 20 minutos da adição do substrato, a reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico ou H₂SO₄ 4N e a leitura espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas MR 4000 (Dynatech, USA), no comprimento de onda de 490 nm.

3.5. - Análises Estatísticas

As análises estatísticas apresentadas neste trabalho foram realizadas sob a orientação do Dr. Eduardo L. Franco, diretor da Divisão de Epidemiologia do Departamento de Oncologia da Universidade McGill, Montreal, Quebec, Canadá.

3.5.1. - Controle da Variação dos Resultados na Reação Imunoenzimática

A reatividade sorológica em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA, em geral, é medida diretamente pelos valores das absorbâncias colorimétricas apresentadas pelos alvéolos das microplacas de poliestireno, correspondentes às amostras testadas, após a subtração dos valores obtidos nos alvéolos correspondentes ao controle *blank*. Estes últimos, por sua vez, são constituídos apenas por antígeno, anticorpo anti IgG ou IgM conjugados com peroxidase ácida, OPD e H₂SO₄ e os valores de absorbância neles obtidos implicam em um sinal ou "ruído" correspondente à atividade cromogênica basal dos reagentes que deve ser eliminado dos valores de absorbância das amostras.

A inclusão dos soros controle BR em cada microplaca, por sua vez, apresentou uma grande variabilidade de valores de absorbância de um ensaio para o outro, refletindo, provavelmente, a grande variabilidade dos ensaios e as variações intra-ensaios inerentes a um método sorológico tão sensível às variações experimentais quanto o teste de ELISA.

Para minimizar os efeitos dessa variabilidade inter- e intra-ensaios, os valores absolutos das densidades ópticas das amostras de soros do estudo, testadas nos ensaios imunoenzimáticos para IgG e IgM, nas diluições de 1:10 e 1:50, foram convertidos nos valores de dois índices, elaborados pelo dr. Eduardo L. Franco: a razão de absorbância normalizada [*normalized absorbance ratio (NAR)*] e a diferença de absorbância normalizada [*normalized absorbance difference (NAD)*] segundo as fórmulas abaixo descritas e, só então, foram analisados estatisticamente.

$$\text{NAR} = \frac{\text{Média aritmética das absorvâncias brutas das duplicatas do soro testado na diluição X}}{\text{Média aritmética das absorvâncias brutas das duplicatas do pool de soros controle testado na diluição X e incluído na mesma placa onde o soro teste foi avaliado}}$$

$$\text{NAD} = \frac{\text{Média aritmética das absorvâncias brutas das duplicatas do soro testado na diluição X}}{\text{Média aritmética das absorvâncias brutas das duplicatas do pool de soros controle testado na diluição X e incluído na mesma placa onde o soro teste foi avaliado}}$$

A utilização destas duas fórmulas corrigiria as flutuações, referentes a variações nas condições dos reagentes utilizados e na conduta a cada ELISA realizado, desde que estas fossem sistemáticas, ou seja, semelhantes em intensidade para um dado ensaio e afetando igualmente a todos os alvéolos de uma mesma placa, pois as mesmas estariam presentes tanto na reatividade das amostras em teste quanto na dos soros controles para a mesma placa e diluição.

3.5.2. – Comparação entre as Medidas de Reatividade Sorológica

Os valores normalizados (na forma de NAR e NAD) permitem uma melhor avaliação de todas as correlações estatísticas e epidemiológicas analisadas neste estudo. Além disso, a reatividade medida por estas duas fórmulas poderia fornecer associações de maior força estatística do que aquelas obtidas a partir dos valores de absorbâncias brutas, não corrigidas.

A análise da existência de uma correlação forte entre as respostas sorológicas anti-HPV-16 medidas nas amostras de admissão e nas de primeiro retorno foi feita utilizando-se o princípio de regressão linear através do método dos quadrados mínimos, em que foram analisados os coeficientes de determinação das regressões (r^2), indicativos da proporção da variação que é explicada pelo modelo de regressão entre as reatividades séricas apresentadas nas duas visitas testadas. Estas correlações tiveram que ser efetuadas após a transformação logarítmica dos valores das reatividades sorológicas obtidas em valores de NAR, NAD e absorbâncias brutas, visto que as distribuições originais eram extremamente assimétricas ou log-normais. Finalmente, no caso do NAD, adicionou-se o valor absoluto 2 ao resultado, antes da derivação do logaritmo, para evitar os valores negativos.

A comparação entre as médias das reatividades sorológicas corrigidas em cada diluição e visita exigiu a utilização do método de análise das variâncias, também fundamentado na transformação logarítmica dos resultados, conforme descrito acima. Estas comparações foram feitas entre os vários grupos definidos conforme os riscos

cumulativos de infecção pelo HPV e de lesões cervicais. A significância estatística destas análises foi avaliada segundo duas maneiras diversas, a global e a tendência, que apresentavam valores de *p* bicaudais específicos em cada combinação. Na análise global de significância estatística, a hipótese-teste foi a de que pelo menos uma das médias era diferente das outras, ao passo que na análise de tendência foi verificada a relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo (por exemplo: severidade das lesões ou tipos de HPV) em relação à magnitude das médias da reatividade sorológica.

3.5.3. – Definição da Positividade Sorológica

Devido a ausência de soros tipicamente negativos para a prevalência de anticorpos contra HPV-16, bem como à ausência de soros marginalmente positivos para estes anticorpos, que permitiriam a definição *a priori* de um valor de *cutoff*, tornou-se necessária a abordagem de uma outra estratégia. A definição de um valor mínimo de soropositividade de anticorpos da classe IgG contra o HPV-16 para cada medida analisada (NAR e NAD) fundamentou-se na reatividade típica dos soros de um grupo de pacientes considerado como controle negativo. Esse grupo incluiu 610 mulheres pertencentes ao estudo prospectivo que completaram quatro ou mais consultas de retorno e cujas amostras cervicais do primeiro ano de seguimento foram todas negativas para a detecção do DNA de HPV por PCR e para lesões HPV-induzidas.

As amostras em que a reação controle de PCR para β -globina resultou negativa foram excluídas para diminuir a probabilidade de subdetecção de infecções pelo HPV durante o início do estudo e ao longo dos primeiros doze meses de seguimento. Além disso, foram excluídas todas as pacientes com pelo menos uma consulta com diagnóstico cervical anormal durante o primeiro ano de seguimento.

A distribuição de NAR e NAD para cada diluição e visita foi calculada para o grupo controle negativo e os valores correspondentes aos percentis de 75% e 90% foram utilizados experimentalmente como discriminantes de positividade sorológica em cada definição. Com base nesses valores os resultados sorológicos foram classificados como negativos e positivos e assim interpretados nas análises de associação epidemiológica com risco de infecção pelo HPV e risco de lesões cervicais durante o estudo.

No caso da determinação da prevalência dos anticorpos da classe IgM, por outro lado, optou-se pela utilização dos valores de corte definidos pelos percentis 66%, 75% e 90% da distribuição de frequências de todos os valores de NAR e NAD. A análise da distribuição de frequências dos valores de NAR e NAD de um grupo controle definido *a posteriori* (151 mulheres negativas para a detecção do DNA de HPV e para o desenvolvimento de lesões cervicais, tanto no início do estudo quanto após um ano de seguimento do estudo) resultou em valores essencialmente idênticos àqueles definidos pela distribuição de frequências de todos os valores de NAR e NAD acima descrita. Tal fato permitiu que se optasse por um ou outro método de definição de valores de corte.

**3.5.4. – Associação entre Positividade Sorológica e Risco de Infecção
pelo HPV e Lesões Cervicais**

Conforme descrito anteriormente, a estratégia utilizada para a escolha das amostras a serem testadas, dentre aquelas provenientes de 2529 pacientes pertencentes à coorte do estudo prospectivo que vem sendo desenvolvido neste laboratório, está fundamentada na seleção de uma amostragem caso-controle aninhada (*nested case-control sampling*). Esse sistema de amostragem permite a utilização do cálculo das Razões de Chance (*Odds Ratio* ou OR) como uma estimativa direta do Risco Relativo (RR), em que os indivíduos soropositivos apresentam riscos múltiplos da categoria de referência (grupo controles) para o desenvolvimento das variáveis analisadas. Isso é possível porque a escolha dos controles deu-se dentre indivíduos pertencentes à mesma coorte e influenciados, portanto, pelos mesmos fatores externos que os casos, mas que ainda não haviam apresentado as características que os tornariam indivíduos afetados ou casos (neste estudo, essas características corresponderiam à detecção do DNA de HPV e/ou de lesões HPV-induzidas) durante um longo período de seguimento.

As correlações epidemiológicas entre a resposta sorológica para anticorpos das classes IgG e IgM, seja ao início do estudo ou subsequente, e os riscos posteriores do desenvolvimento de infecção pelo HPV e lesões cervicais foram, portanto, avaliadas através do cálculo da Razão de Chances (OR) e expressas nas tabelas como Riscos Relativos. Essa avaliação foi efetuada para os atributos em questão como uma função da soropositividade sorológica definida segundo os critérios descritos no item E.3. A

significância estatística das correlações encontradas e a precisão das estimativas calculadas foram corroboradas pelo cálculo dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%).

Os cálculos das razões de chances (OR) ajustadas para variáveis cujos efeitos de confusão são bem conhecidos na epidemiologia causal das lesões HPV-induzidas, tais como a infecção pelo HPV e a idade, foram também efetuados, na tentativa de controlar esses efeitos, e discriminados sempre ao lado da razão de chance bruta equivalente. A estratégia utilizada para calcular essas estimativas de risco relativo ajustadas foi a regressão logística múltipla incondicional.

3.5.5. – Fatores Preditores da Resposta Sorológica

Ao contrário do item anterior, em que se procurou avaliar a resposta sorológica como sendo independente e capaz de prever a infecção pelo HPV e o aparecimento de lesões cervicais HPV-induzidas durante o estudo, a avaliação de fatores associados à resposta sorológica, aqui descrita, considera a resposta sorológica como uma variável dependente de outras variáveis epidemiológicas pesquisadas.

Estas análises foram efetuadas utilizando-se combinações de NAR e NAD da diluição 1:10, em valores contínuos, não dicotomizados, segundo os valores discriminantes anteriormente descritos, de maneira isolada nas amostras de admissão e como média aritmética na combinação das visitas de admissão e primeiro retorno. A

forma logarítmica desses valores foi preferencialmente utilizada nas análises, com o objetivo de obter uma distribuição normalizada dos valores.

O questionário padrão utilizado para avaliação das diversas variáveis epidemiológicas inseridas nesse estudo continha diversas questões sobre cada tópico analisado, porém destacamos apenas as variáveis efetivamente calculadas, que são:

- Variáveis sócio-demográficas: idade, raça, escolaridade e tabagismo.
- Variáveis de higiene íntima: coceira genital, desconforto vaginal nos últimos 2 dias, ducha vaginal, uso de absorvente higiênico, uso de absorvente higiênico não comercial e doenças sexualmente transmissíveis (DST)
- Variáveis de comportamento sexual: idade à primeira relação, nº de parceiros durante a vida, nº de parceiros nos últimos cinco anos, coito anal, sexo oral e uso de preservativos.
- Variáveis de saúde reprodutiva: idade à menarca, gravidezes e uso de pílula.

Estas análises foram realizadas através da técnica de regressão linear múltipla, em que o cálculo dos coeficientes de regressão e os respectivos valores de p bicaudais referentes a cada categoria das variáveis explanatórias foi efetuado, tanto de maneira bruta quanto com o ajustamento simultâneo para variáveis confundíveis. Estes ajustes são comuns em estudos epidemiológicos do carcinoma cervical, tais como infecção pelo HPV (aqui definida pela detecção do DNA viral por PCR) e a idade. Todas as variáveis

ordinais e nominais foram tratadas como conjuntos binários de variáveis codificadas ou *dummy variables*. Além disso, vale salientar que a análise dos dados obtidos deve sempre levar em consideração que coeficientes com:

- valores positivos: indicam uma associação positiva com a resposta sorológica, ou seja, a presença do atributo em questão estaria associada a uma elevação da reatividade sorológica.
- Valores negativos: indicam uma associação negativa com a resposta sorológica, ou seja, a presença do atributo em questão estaria associada a uma diminuição da reatividade sorológica.

4. – RESULTADOS

4.1. - Determinação de Anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16

Os 1052 pares de amostras séricas, coletados no momento da admissão e após um período de quatro meses (primeiro retorno) das pacientes, foram escolhidos aleatoriamente dentro da coorte de 2529 mulheres pertencentes ao estudo epidemiológico prospectivo que vem sendo desenvolvido.

Todas as amostras foram testadas com o intuito de detectar anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16. Valores de absorbância bruta medidos através da leitura de densidade óptica a um comprimento de onda de 490 nm foram obtidos. Esses valores, por sua vez, foram convertidos em dois índices normalizados, denominados NAR e NAD e, posteriormente, submetidos a análises estatísticas gerais. A Tabela 4 ilustra os coeficientes de determinação (r^2) para as correlações entre as respostas sorológicas expressas como NAR e NAD, assim como das absorbâncias brutas, destes 1052 pares de amostras de admissão e primeiro retorno, em ambas diluições de soros testados. Observa-se o aumento dos valores do r^2 nas diferentes formas de análise dos dados, sendo a absorbância bruta a pior referência (0,3085 e 0,3427) e os dois índices normalizados, NAR e NAD, maiores e bastante similares entre si (0,5935 / 0,5170 para NAR e 0,6469 / 0,6137 para NAD).

Em seguida, definiram-se os pontos de corte (*cutoffs*) dos ensaios utilizados na determinação da prevalência de anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16. Estes pontos de corte foram baseados na distribuição dos valores NAR ou NAD obtidos em ensaios de ELISA-VLP para um grupo controle composto por 610 pacientes alocadas no estudo prospectivo. O critério para a definição desse grupo controle baseou-se em resultados consistentemente negativos tanto para os testes de detecção de DNA de HPV de qualquer tipo, quanto para a detecção de lesões citológicas durante as quatro visitas iniciais consecutivas do primeiro ano do seguimento do estudo (admissão, após 4 meses, após 8 meses e após 12 meses). Os valores de corte foram, então, aleatoriamente definidos nos percentis septuagésimo quinto (75%) e nonagésimo (90%) da distribuição dos valores de NAR e NAD obtidos para o grupo controle, de modo a evidenciar que as tendências obtidas subsequente nos resultados mantinham-se de maneira independente ao nível de ponto de corte utilizado para efetuar a análise. Assim, consideraram-se soronegativas as amostras cujos valores expressos por NAR ou NAD, seja na diluição 1:10 ou 1:50, fossem inferiores aos valores correspondentes aos percentis 75% e 90% da distribuição equivalente de valores do grupo controle. As amostras testadas cujos valores, seguindo os mesmos critérios, fossem superiores aos valores correspondentes a esses dois percentis, foram consideradas como soropositivas (Figura 2).

Tabela 4: Coeficientes de determinação (r^2) para as correlações entre as respostas sorológicas das amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo usando diferentes diluições (1:10 e 1:50) e expressões de reatividade (NAR e NAD).

Coeficiente de Determinação Segundo a Expressão de Reatividade**			
Diluição	Absorbância bruta	NAR	NAD
1:10	0,3085	0,5935	0,6469
1:50	0,3427	0,5170	0,6137

* número de pares de soros por correlação = 1052.

** forma logarítmica destas variáveis.

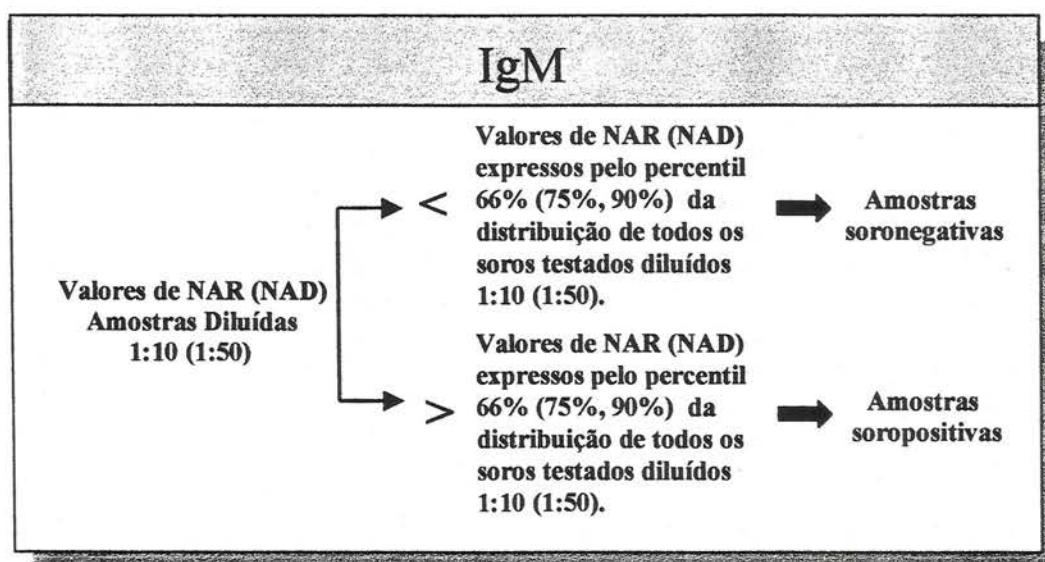
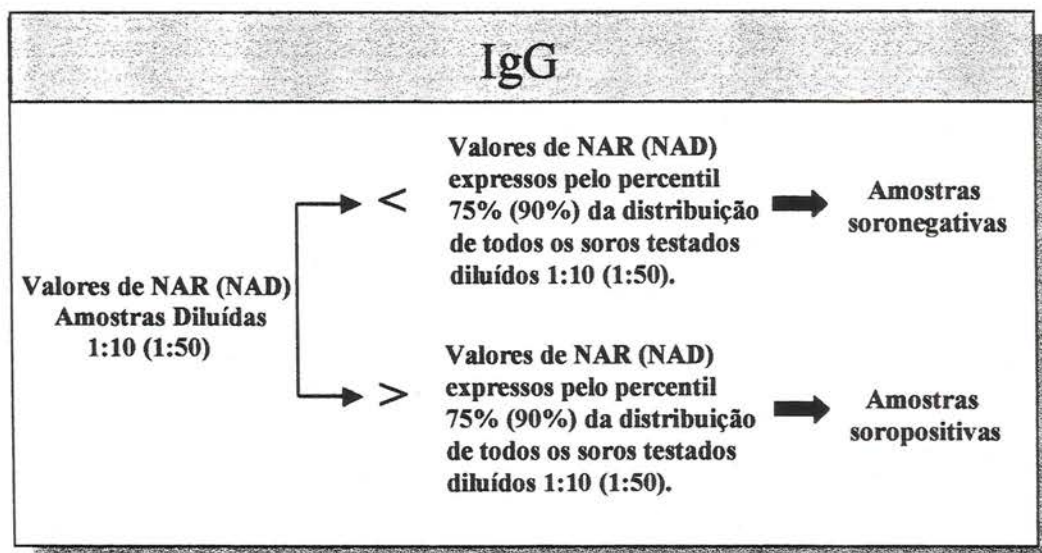


Figura 2: Esquema utilizado para definição de positividade e negatividade sorológica para amostras testadas para análise de prevalência de duas classes de imunoglobulinas (IgG e IgM).

A Tabela 5 expõe as medidas de reatividade sorológica observadas nos testes realizados com este grupo controle. A grande variabilidade dos valores de reatividade dos soros pertencentes a este grupo não é essencialmente diferente quando comparamos os valores expressos como NAR ou NAD. Nota-se que, de maneira independente à diluição utilizada no ensaio ou ao momento em que as amostras foram coletadas, os valores medianos demonstrados por esse grupo controle negativo, quando expressos em NAR ou NAD, são bastante aproximados. A utilização dos percentis 75% e 90% para definição dos pontos de corte dos ELISA-VLP, mostrou a consistência dos resultados obtidos de maneira independente à fórmula utilizada para o grupo controle. Assim, devido a homogeneidade e consistência apresentadas pelo conjunto das reatividades das amostras que compõem esse grupo controle negativo, nota-se que o mesmo poderia ser utilizado com sucesso para definir valores de *cutoff* similares, sem o risco da ocorrência de erros classificatórios ou de exclusão de amostras (sejam negativas ou positivas), qualquer que seja a diluição, fórmula ou percentil utilizados.

A opção por testar as amostras séricas em duas diluições tão baixas (1:10 e 1:50), mantendo os anticorpos presentes nesses soros bastante concentrados, fato relativamente incomum em ensaios do tipo ELISA, adveio da observação de que a resposta humoral ao HPV apresenta níveis extremamente baixos de quaisquer classes de anticorpos, impossibilitando a utilização de diluições maiores.

Tabela 5: Distribuição das medidas de reatividade sorológica para imunoglobulinas da classe G nas amostras do grupo negativo*.

Fórmula	Período	Diluição	Parâmetros de distribuição		
			Mediana	Percentil 75	Percentil 90
NAR	Admissão	1:10	0,670	0,950	1,421
		1:50	0,740	1,052	1,578
	Após 4 Meses	1:10	0,732	1,097	1,583
		1:50	0,768	1,124	1,700
NAD	Admissão	1:10	-0,217	-0,038	0,371
		1:50	-0,098	0,021	0,275
	Após 4 Meses	1:10	-0,237	0,079	0,560
		1:50	-0,119	0,061	0,392

* 610 pacientes cujas 4 primeiras visitas no estudo tiveram resultados negativos para DNA de HPV e citologia normal.

Conforme pode ser notado até aqui, tanto os índices normalizados NAR e NAD quanto as amostras testadas para as diluições 1:10 e 1:50 comportam-se de maneira similar, permitindo supor que não há grande variabilidade quanto a ocorrência de erros classificatórios ou perda de amostras, sejam elas positivas ou negativas, se utilizarmos somente um ou outro índice, o que também se observa em relação à diluição empregada. Assim sendo, optou-se por discutir nessa dissertação os dados obtidos através do uso dos valores em NAR para as amostras diluídas a 1:10. Além disso, são apresentados no corpo da dissertação os resultados obtidos com a utilização do percentil 75%, mas as tabelas oriundas da utilização do NAD para as duas diluições e do NAR na diluição 1:50, utilizando os pontos de corte definidos por ambos percentis, são apresentadas no Anexo 1.

As tabelas 6, 7 e 8 exemplificam a correlação encontrada entre a reatividade sorológica média apresentada pelas pacientes do estudo à admissão, e os grupos de positividade para HPV segundo oncogenicidade, tipo de infecção por HPV e desenvolvimento de lesões cervicais durante o primeiro ano de seguimento, respectivamente.

Na Tabela 6, observa-se que os valores de reatividade por grupo (negativas, com HPV de baixo risco e com HPV de alto risco) variam pouco, mas revelam um certo aumento entre o grupo das mulheres infectadas por HPV de alto risco (0,777) quando comparadas com o grupo das mulheres negativas para HPV (0,693). Já as mulheres infectadas com HPV de baixo risco, apresentam uma elevação menor da sororeatividade (0,739). A diferença dos valores apresentados por esses três grupos de mulheres é

estatisticamente significativa, conforme pode ser visto pelo valor de p global, indicativo preciso de que as diferenças de valores apresentadas pelos três grupos amostrais advém efetivamente de títulos diferentes de anticorpos nesses soros e não de artefatos da técnica utilizada ou do acaso. Além disso, esses diferentes grupos apresentam um efeito dose-resposta (expresso pelo valor de p *trend* ou tendência muito significativo), implicando que maiores títulos de anticorpos presentes nos soros de cada um desses grupos amostrais são acompanhados por uma maior chance de detecção do DNA de HPV de alto ou baixo risco.

Na Tabela 7, o mesmo padrão pode ser observado para os tipos de infecções pelo HPV, em que as mulheres com infecções persistentes (0,830) para o HPV apresentam uma maior reatividade sorológica do que as mulheres com infecções transientes (0,712) ou ainda, aquelas negativas (0,693). Nota-se nessa análise que os diferentes grupos amostrais aqui descritos também apresentam um valor de p global significativo, indicando que a diversidade apresentada pelos valores é inerente ao título de anticorpos presentes nas amostras e não oriunda do acaso ou de artefatos do ensaio. Ademais, o efeito dose-resposta também pode ser observado aqui pelo valor de tendência (p *trend*) altamente significativo.

Na Tabela 8, as reatividades sorológicas apresentadas pelos soros pertencentes a mulheres diagnosticadas como portadoras de ASCUS (0,717) são muito semelhantes com aquelas apresentadas pelas mulheres negativas para doença cervical (0,662). Os soros pertencentes a mulheres portadoras de lesão apresentam reatividades levemente aumentadas, sendo que as portadoras de lesões de alto grau (HSIL) apresentam soros

com as maiores reatividades médias (0,998). É digno de menção que, concordando com o que foi encontrado para a análise de tipo de HPV e de tipo de infecção, essa análise também apresenta valores de p global e de tendência extremamente significativos, indicando não só que as diferenças de valores observadas advém de diferentes títulos de anticorpos presentes nas amostras de cada grupo, como que há um efeito de dose-resposta, correlacionando os níveis desses anticorpos com a posterior detecção de lesões HPV-induzidas.

Na Tabela 9, por sua vez, pode-se notar que mulheres soropositivas à admissão do estudo apresentaram um risco relativo de cerca de duas vezes maior de desenvolverem quaisquer lesões intraepiteliais escamosas (LSIL, HSIL). Esta diferença é significativa no cálculo bruto (o intervalo de confiança excluiu a unidade) mas deixa de sê-lo após os ajustes por HPV e por idade. O mesmo ocorre para o risco de desenvolver exclusivamente lesões de alto grau, em que mulheres soropositivas para IgG contra HPV-16 ao início do estudo apresentam cerca de três vezes mais chances de desenvolverem esse tipo de lesão cervical.

Tabela 6: Reatividade sorológica* média de amostras coletadas à admissão, segundo grupos de positividade para infecção por HPV de diferentes riscos de oncogenicidade durante um ano de seguimento do estudo.

Reatividade por grupo**			Significância***	
Negativo (N=631)	Baixo risco (N=113)	Alto risco (N=182)	Global [#]	Tendência ^{##}
0,693	0,739	0,777	0,0513	0,0149

* Média geométrica segundo grupo e expressão da reatividade, através de NAR e medida em soros diluídos a 1:10.

** Negativo: nenhum resultado positivo para DNA de HPV durante as visitas 1-4.

Baixo risco: pelo menos uma visita com positividade para DNA de HPV de baixo risco oncogênico, mas não de alto risco.

Alto risco: pelo menos uma visita com resultado positivo para DNA de HPV de alto risco oncogênico, tendo ou não positividade para DNA de HPV de baixo risco oncogênico na mesma ou em outras visitas.

*** Valores de p para as comparações entre grupos.

Pelo menos uma das médias era diferente das outras.

Relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo e a magnitude das médias.

Tabela 7: Reatividade sorológica* média de amostras coletadas à admissão, segundo grupos de positividade para infecção transiente ou persistente pelo HPV durante um ano de seguimento do estudo.

Reatividade por Grupo**		Significância***	
		Global#	Tendência##
Negativas (N=631)	0,693	0,0115	0,0021
Transientes (N=170)	0,712		
Persistentes 2+ (N=78)	0,838		
Persistentes 3+/4+(N=47)	0,833		

* Média geométrica segundo grupo e expressão da reatividade através de NAR e medida em soros diluídos a 1:10.

** Negativo: nenhum resultado positivo para DNA de HPV durante as visitas 1-4.

Transiente: menos que duas visitas positivas para o mesmo tipo de HPV.

Persistente2+: duas visitas positivas para o mesmo tipo de HPV.

Persistente3+/4+: pelo menos três visitas positivas para o mesmo tipo de HPV.

*** Valores de p para as comparações entre grupos.

Pelo menos uma das médias era diferente das outras.

Relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo e a magnitude das médias.

Tabela 8: Reatividade sorológica* média de amostras coletadas à admissão, segundo risco cumulativo de lesões cervicais durante um ano de seguimento do estudo.

Reatividade por grupo**				Significância***	
Negativo (N=930)	ASCUS (N=42)	LSIL (N=84)	HSIL (N=29)	Global#	Tendência##
0,717	0,662	0,855	0,998	0,0006	0,0003

* Média geométrica segundo grupo e expressão da reatividade, através de NAR e medida em soros diluídos a 1:10.

** Negativo: nenhum resultado de citologia anormal durante as visitas 1-4.

ASCUS: citologia atípica de significado indeterminado.

LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

*** Valores de p para as comparações entre grupos.

Pelo menos uma das médias era diferente das outras.

Relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo e a magnitude das médias.

Tabela 9: Riscos relativos (RR) de lesão cervical (SIL), segundo a resposta sorológica ao início do estudo: lesões diagnosticadas durante um ano de seguimento.

Tipo de lesão	RR (IC 95%)*		
	Bruto	Ajustado por HPV	Ajustado por HPV e idade
LSIL e HSIL	2,14 (1,33-3,43)	1,75 (0,91-3,36)	1,74 (0,90-3,34)
HSIL	3,58 (1,63-7,89)	2,27 (0,93-5,54)	2,23 (0,90-5,49)

*Categoria de referência para os cálculos foi um grupo soronegativo, RR = 1,0.

É digno de menção que mulheres apresentando duas amostras soronegativas, coletadas ao início e após quatro meses de seguimento do estudo (notadas como 0), foram consideradas como soronegativas, ao passo que mulheres apresentando apenas uma amostra soropositiva em qualquer dos período de coleta (notadas como 1), juntamente com aquelas que apresentavam amostras soropositivas nos dois períodos de coleta (notadas como 2), foram consideradas como soropositivas nas análises demonstradas nas Tabelas 10, 11 e 12.

O risco relativo de desenvolvimento de SIL predito pela soropositividade foi correlacionado com o número de amostras soropositivas (Tabela 10). Conforme esperado, observou-se que os riscos relativos para o desenvolvimento de lesões cervicais aumentam com o número de amostras soropositivas. Assim, pacientes que foram soropositivas nos dois períodos de coleta tem pelo menos 2 vezes mais chances de desenvolver quaisquer lesões quando comparadas as pacientes soronegativas. Além disso, essas mesmas pacientes tem 4 vezes mais chances de desenvolver lesões de alto grau especificamente.

A Tabela 11 ilustra os riscos relativos de mulheres com amostras soropositivas virem a apresentar infecções por HPV de alto ou baixo risco, segundo o ponto de corte definido pelo percentil 75%. Observa-se um risco aproximadamente duas vezes maior de mulheres com pelo menos uma amostra soropositiva (seja ao início ou após quatro meses de seguimento do estudo) terem infecções por HPV, definidas como a presença de DNA de HPV tanto de baixo risco ($RR=2,06$) quanto de alto risco ($RR=1,46$). Esse risco

é ainda maior no caso de mulheres com HPV de alto risco e portadoras de duas amostras soropositivas.

Os riscos relativos de desenvolvimento de infecções persistentes ou transientes pelo HPV em relação à resposta sorológica são apresentados na Tabela 12. Mulheres que apresentam infecções persistentes pelo HPV tendem a ter pelo menos uma amostra soropositiva. Esta tendência mantém-se fortemente com as pacientes que apresentam duas amostras soropositivas.

Tabela 10: Riscos relativos (RR) de lesão cervical (SIL), diagnosticadas a partir do quarto mês até três anos do seguimento, segundo a resposta sorológica de amostras durante os dois períodos de coleta (à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo) na coorte.

Tipo de lesão	Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)		
		Bruto	Ajustado por HPV	Ajustado por HPV e idade
LSIL e HSIL	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
	1	0,65 (0,23-1,84)	0,37 (0,11-1,31)	0,39 (0,11-1,37)
	2	2,13 (1,14-3,97)	1,59 (0,66-3,82)	1,69 (0,70-4,08)
HSIL	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
	1	0,91 (0,12-7,10)	0,48 (0,06-4,02)	0,48 (0,06-4,06)
	2	4,25 (1,46-12,38)	2,61 (0,75-9,03)	2,62 (0,75-9,11)

* Número de visitas com positividade sorológica para HPV.

Tabela 11: Riscos relativos (RR) de infecção por HPV de alto e baixo risco de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento**.

Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)	
	Baixo risco	Alto risco
0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
1	2,06 (1,19-3,55)	1,46 (0,89-2,42)
2	1,98 (1,21-3,23)	2,17 (1,46-3,24)

* Número de visitas com positividade sorológica para HPV.

** Soros diluídos a 1:10, percentis 75%, NAR

Tabela 12: Riscos relativos (RR) de infecção transiente ou persistente pelo HPV de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo**.

Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)	
	Transiente	Persistente
0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
1	1,39 (0,84-2,31)	2,19 (1,28-3,75)
2	1,65 (1,07-2,52)	2,84 (1,81-4,47)

* Número de visitas com positividade sorológica para HPV.

** Soros diluídos a 1:10, percentis 75%, NAR

4.1.1. – Variáveis Epidemiológicas Associadas à Soropositividade da classe G contra HPV-16

No item anterior, procurou-se determinar o papel preditivo da soropositividade de anticorpos da classe G contra HPV-16 no aparecimento de infecções por HPV e no posterior desenvolvimento de lesões, considerando a soropositividade um evento independente, capaz de prever ambos os eventos.

A seguir, buscou-se correlações entre a soropositividade das amostras testadas e diversas variáveis epidemiológicas, obtidas através do preenchimento de questionários padrão concebidos para este estudo prospectivo (Tabelas 13 a 16). Essas análises foram efetuadas pressupondo-se que a soropositividade seria uma variável dependente da existência das outras variáveis epidemiológicas pesquisadas.

Na Tabela 13 encontram-se as correlações entre a reatividade sorológica contra o HPV-16 e algumas variáveis sócio-demográficas e o tabagismo. As correlações significativas encontradas (aquelas que apresentaram um valor de p menor do que 0,05) correspondem às variáveis idade e tabagismo. Na variável idade nota-se que mulheres acima de 35 anos apresentam correlações positivas com a reatividade sorológica após o ajuste das análises por presença de DNA de HPV e pela idade, ou seja, estas faixas etárias seriam acompanhadas sempre por elevada soropositividade. A variável tabagismo, por sua vez, apresenta uma correlação negativa com a reatividade sorológica

na categoria fumante, evidenciando que as mulheres que ainda fumam teriam uma soropositividade menor do que as não fumantes ou do que as ex-fumantes.

A Tabela 14, por sua vez, demonstra as correlações encontradas entre a reatividade sorológica anti-HPV das amostras obtidas na admissão e primeiro retorno combinadas e as variáveis de higiene e DST. Nota-se nesta tabela que a única variável que apresentou uma correlação significativa foi a DST: mulheres que referiram ter tido DST e/ou HPV apresentaram maiores reatividades sorológicas, tanto nos índices brutos quanto nos ajustados.

Já na Tabela 15, estão ilustradas as correlações encontradas entre a reatividade sorológica anti-HPV e algumas variáveis de comportamento sexual. Pode ser observado nesta tabela que as únicas variáveis que originaram correlações significativas foram a idade da primeira relação sexual e o número de parceiros, tanto durante a vida quanto nos últimos cinco anos. No caso da variável idade da primeira relação sexual, nota-se que as categorias com idade superior a 18 anos resultam em correlações negativas significativas (com valor de p menor do que 0,05), seja nos coeficientes brutos ou ajustados por idade. Assim, quanto maior a idade das mulheres no momento do seu primeiro coito, menor a chance de serem soropositivas. Já as categorias número de parceiros (durante a vida e nos últimos cinco anos) apresentaram correlações fortemente positivas com a soropositividade, em ambos os índices, indicando que mulheres com mais de um parceiro sexual na vida (ou nos últimos cinco anos) tem uma maior probabilidade de serem também soropositivas para o HPV-16.

Finalmente, a Tabela 16 demonstra as correlações encontradas entre a reatividade sorológica anti-HPV e algumas variáveis de saúde reprodutiva. Nesta tabela, apenas a variável gravidez (categoria acima de 4) mostrou correlações significativas com soropositividade.

Tabela 13: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis sócio demográficas e tabagismo e a reatividade sorológica anti-HPV-16 combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAR.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Idade (anos)	18-24 (211)	Referência		Referência	
	25-34 (440)	0,0654	0,1172	0,0757	0,0684
	35-44 (295)	0,0931	0,0383	0,1125	0,0118
	45-70 (106)	0,1282	0,0307	0,1419	0,0163
Raça	Branca (690)	Referência		Referência	
	Não Branca (362)	0,0097	0,7654	0,0084	0,7928
Escolaridade	Primário incompleto (253)	Referência		Referência	
	Primário (617)	-0,0704	0,0589	-0,0660	0,0785
	Ginásio (152)	-0,0669	0,1909	-0,0435	0,4030
	Colegial/Universidade (29)	-0,1145	0,2415	-0,0936	0,3329
Tabagismo	Nunca fumou (527)	Referência		Referência	
	Ainda fuma (357)	-0,0754	0,0270	-0,0921	0,0066
	Já fumou (168)	0,0629	0,1530	0,0593	0,1722

* Valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (Transformação de Student).

Tabela 14: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis de higiene e doenças sexualmente transmissíveis e a reatividade sorológica anti-HPV-16 combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno, medida pela fórmula NAR.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Coceira genital	Não (882)	Referência		Referência	
	Sim (170)	0,0125	0,7641	0,0125	0,7621
Desconforto vaginal	Não (662)	Referência		Referência	
	Sim (390)	-0,0229	0,4725	-0,0188	0,5494
Desconforto vaginal nos últimos 2 dias	Não (675)	Referência		Referência	
	Sim (377)	-0,0434	0,1759	-0,0406	0,2001
Ducha vaginal	Nunca/Ocasional(952)	Referência		Referência	
	Frequentemente (100)	0,0105	0,8407	-0,0056	0,9149
Uso de absorvente higiênico	Não usa (925)	Referência		Referência	
	Usa (127)	0,0162	0,7315	0,0270	0,5650
Uso de absorvente higiênico não comercial	Não usa (628)	Referência		Referência	
	Usa (424)	0,0605	0,0534	0,0452	0,1609
DSTs	Não teve (819)	Referência		Referência	
	DST-HPV (53)	0,1505	0,0333	0,1538	0,0296
	Outras DST (177)	0,0517	0,2107	0,0395	0,3356

* Valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (Transformação de Student).

Tabela 15: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis de comportamento sexual e a reatividade sorológica anti-HPV combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAR.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Idade à 1ª relação	15 anos ou menos (280)	Referência		Referência	
	De 16 a 17 anos (291)	-0,0396	0,3401	-0,0403	0,3240
	De 18 a 19 anos (209)	-0,1365	0,0026	-0,1478	0,0011
	20 anos ou mais (272)	-0,1399	0,0009	-0,1800	0,0001
Nº de parceiros durante a vida	1 (478)	Referência		Referência	
	2-3 (360)	0,2039	<0,0001	0,1931	<0,0001
	4-5 (132)	0,2536	<0,0001	0,2338	<0,0001
	6 ou + (86)	0,2668	<0,0001	0,2700	<0,0001
Nº de parceiros nos últimos 5 anos	0-1 (809)	Referência		Referência	
	2 ou + (242)	0,1285	0,0004	0,1210	0,0011
Nº de parceiros no último ano	0-1 (988)	Referência		Referência	
	2 ou + (55)	0,0594	0,3894	0,0667	0,3362
Coito anal	Nunca fez (648)	Referência		Referência	
	1 ou mais (404)	0,0051	0,8720	0,0117	0,7079
Sexo oral	Nunca fez (493)	Referência		Referência	
	1 ou mais (559)	-0,0261	0,3962	-0,0094	0,7620
Uso de preservativo	Nunca/Ocasional (1009)	Referência		Referência	
	Sempre (43)	-0,0962	0,2154	-0,0966	0,2098

* Valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (Transformação de Student).

Tabela 16: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis de saúde reprodutiva e a reatividade sorológica anti-HPV combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAR.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Idade na menarca	Menos de 12 (234)	Referência		Referência	
	12-19 (816)	0,0171	0,6417	0,0149	0,6844
Gravidez	0-1 (161)	Referência		Referência	
	2-3 (469)	0,0575	0,2069	0,0570	0,2140
	4-6 (308)	0,1280	0,0084	0,1122	0,0260
	7 ou + (104)	0,1479	0,0185	0,1175	0,0796
Uso de pílula	Nunca usou (158)	Referência		Referência	
	Menos de 6 anos (593)	0,0355	0,4263	0,0372	0,3994
	6 ou mais anos (301)	0,0619	0,2063	0,0409	0,4049

* Valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (Transformação de Student).

4.2 - Determinação de Anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16

Os testes para determinar a prevalência de IgM em um grupo de 289 mulheres escolhidas dentre as 2529 mulheres pertencentes a coorte deste estudo prospectivo seguem os mesmos moldes de um estudo de caso-controle aninhado, de acordo com o que foi descrito para os testes de prevalência de IgG. A única diferença reside no fato de que, como a IgM é classicamente considerada como um tipo de imunoglobulina típica de primo-infecções, estamos testando soros das mesmas mulheres colhidos em dois momentos diferentes: na admissão ao estudo e após um ano de seguimento (4ª visita), visando detectar elevação dos níveis de IgM séricos dentro da coorte. Os valores de absorbância-bruta obtidos através do teste das 578 amostras correspondentes a estes períodos, foram convertidos em dois índices normalizados, NAR e NAD, conforme já descrito, e submetidos a análises de estatística geral.

A primeira análise efetuada com esses dados foi a determinação de um valor de *cutoff* para cada um dos grupos de soros, com o intuito de definir as mulheres soropositivas e as soronegativas para anticorpos do tipo IgM contra VLP de HPV-16. A definição de soropositividade de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16, dentro das amostras coletadas nos dois períodos (início e após um ano de seguimento do estudo) avaliados, foi efetuada através de duas estratégias distintas, previamente descritas para ensaios de IgG em literatura pertinente, com o intuito de comparar a consistência dos valores de corte obtidos posteriormente. A primeira delas foi definir arbitrariamente o valores expressos pelos percentis 75% das distribuições das

frequências dos valores normalizados pela fórmula NAR das amostras coletadas no início (1,133) e após um ano de seguimento (1,094) do estudo, diluídas a 1:10.

A segunda, por seu turno, foi estabelecer uma categoria de 165 mulheres citologicamente normais e negativas para a detecção de DNA de HPV por PCR nesses mesmos grupos de amostras, correspondente a um grupo controle negativo, e definir os valores expressos por esse mesmo percentil 75% das distribuições de frequências dos valores de NAR das amostras pertencentes a esse grupo de mulheres, tanto ao início (1,137) quanto após um ano de seguimento (1,104) do estudo. Como os desvios de valores de *cutoff* obtidos por essas duas estratégias não foram estatisticamente significativos, optou-se pelo uso dos valores obtidos através da primeira estratégia como os valores limiares para a definição de soropositividade da classe M contra HPV-16 em todas as análises doravante executadas.

Assim, visto que os desvios apresentados pelos valores de *cutoff* obtidos por estas duas estratégias não foram estatisticamente diferentes, e que os dados gerados com a utilização dos valores de NAR nas diluições 1:50 e com a utilização do NAD nas duas diluições seguiram a mesma tendência, optou-se por utilizar a primeira estratégia e geraram-se valores de corte utilizando os percentis 66%, 75% e 90%.

Considerou-se como amostras soronegativas aquelas cujos valores de absorbância expressos por NAR ou NAD, em ambas as diluições, fossem inferiores aos valores correspondentes aos percentis 66%, 75% e 90%. As amostras consideradas como soropositivas, por sua vez, foram aquelas que, seguindo os mesmos critérios,

apresentaram valores superiores aqueles correspondentes a esses mesmos percentis (Figura 2).

Conforme citado anteriormente, a análise estatística dos dados de sorologia obtidos a partir do teste das amostras em ambas diluições (1:10 e 1:50) demonstrou que os resultados obtidos apresentavam as mesmas tendências estatísticas independentemente da diluição utilizada. Além disso, as tendências de resultados provenientes de NAR e NAD também se mostraram equivalentes. Para facilitar, optamos por incluir no corpo dessa dissertação apenas os dados gerados utilizando a fórmula NAR, a diluição 1:10 e o percentil 66% pelo fato de que este inclui cerca de dois terços das amostras dentre positivas e negativas, quando comparado com os outros dois percentis. Além disso, as análises de IgM foram um pouco dificultadas pelo baixo número de amostras testado, o que também interferiu na escolha do percentil 66%. Entretanto, as análises efetuadas com os outros percentis, com a fórmula NAR na diluição 1:50, além daquelas efetuadas com a fórmula NAD, estão dispostas no item Anexo 2.

A prevalência de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 foi calculada: 24,91% (72/289) de soros foram positivos para IgM nas amostras colhidas no início do estudo e 22,49% (65/289) nas amostras obtidas após 1 ano de seguimento.

As primeiras análises procuraram relacionar a presença de DNA de HPV de alto e baixo risco detectada por PCR em relação à soropositividade de imunoglobulinas da classe M contra VLP de HPV-16. Foram executadas em separado para as amostras colhidas nos diferentes períodos e demonstraram uma tendência de associação da

soropositividade da classe M contra HPV-16 com a infecção por tipos de HPV de baixo risco. Conforme exposto na tabela 17, mulheres infectadas por tipos de HPV de baixo risco têm cerca de três vezes mais chances ($RR=3,1$) de vir a apresentar títulos detectáveis de anticorpos da classe IgM contra HPV-16 do que aquelas infectadas por tipos de HPV de alto risco ($RR=0,73$) ao início do estudo. Após um ano de seguimento, essa tendência é mantida embora os valores de risco relativo caiam um pouco, conforme exposto na Tabela 18. Estas diferenças são marginalmente significativas apenas para os dados coletados ao início do estudo, perdendo completamente a significância após um ano de seguimento, o que permite que se afira apenas uma tendência e não uma associação de força estatística aceitável.

A distribuição de soropositividade da classe M contra VLP de HPV-16, definida através de quartis da distribuição dos valores de NAR para a diluição 1:10, em relação à proporção de indivíduos que apresentam infecção por tipos de HPV de alto e baixo risco à admissão é vista na Figura 3. Nota-se nesse gráfico uma tendência linearmente crescente e significativa ($p \text{ trend} = 0,04$) para a associação de infecção por HPV de baixo risco com títulos crescentes de anticorpos da classe IgM, em que o aumento do título é acompanhado diretamente por um aumento na proporção de indivíduos infectados. A tendência oposta é observada para a infecção por tipos de HPV de alto risco: há menos indivíduos infectados com HPV de alto risco que apresentam altos títulos de anticorpos da classe IgM. Além disso, há uma maior concentração de indivíduos infectados por HPV de alto risco no segundo e terceiro quartil.

Tabela 17: Riscos relativos (RR) da associação entre a presença de HPV de alto e baixo risco e IgM contra HPV-16 em soros obtidos à admissão ao estudo.

RR (IC 95%)*	Tipo de HPV	
	Alto Risco	Baixo Risco
Bruto	0,737 (0,328-1,657)	3,132 (1,079-9,090)**
Ajustado por Idade	0,738 (0,328-1,662)	3,045 (1,045-8,871)**

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

** Valor de $p < 0,05$.

Percentil 66%, 1:10, NAR

Tabela 18: Riscos relativos (RR) da associação entre a presença de HPV de alto e baixo risco, e IgM contra HPV-16 em soros obtidos após um ano de seguimento do estudo.

RR (IC 95%)*	Tipo de HPV	
	Alto Risco	Baixo Risco
Bruto	0,917 (0,380-2,214)	2,000 (0,481-8,310)
Ajustado por Idade	0,750 (0,298-1,883)	1,760 (0,412-7,515)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Percentil 66%, 1:10, NAR

<i>Parâmetros Calculados</i>	<i>HPV Baixo Risco</i>	<i>HPV Alto Risco</i>
X^2 Total 3 g.l. (p)	3,89 (0,27)	5,27 (0,15)
X^2 da Linearidade 2 g.l. (p)	0,01 (1,00)	3,27 (0,19)
X^2 da Inclinação 1 g.l. (p)	3,88 (0,05)	2,00 (0,16)
<i>p de Inclinação</i>	0,04	- 0,03

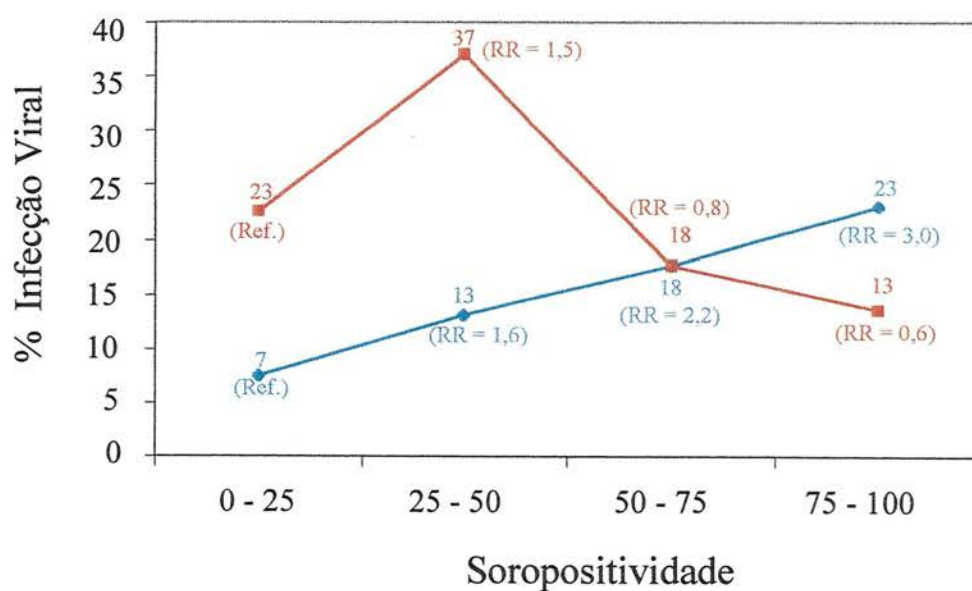


Figura 3: Correlação entre a proporção de mulheres infectadas por tipos de HPV de alto (vermelho) e baixo (azul) risco em esfregaços cervicais e a soropositividade para anticorpos da classe IgM detectados contra VLP de HPV-16, definida através de quartis da distribuição dos dados expressos em NAR, em amostras séricas coletadas ao início do estudo prospectivo e diluídas a 1:10.

O tipo de infecções pelo HPV também foi avaliado: as infecções foram discriminadas em infecções persistentes e transientes e cruzadas com os resultados de soropositividade de anticorpos da classe M contra HPV-16. Conforme pode ser observado na Tabela 19, ao início do estudo as infecções persistentes por HPV apresentam uma tendência a ter uma maior associação com títulos mais altos de anticorpos do tipo IgM do que as infecções transientes, embora os valores não atinjam significância estatística. Esta tendência mantém-se também após um ano de seguimento do estudo, embora os valores de risco relativo sejam menores (Tabela 20).

A análise de soros pertencentes a mulheres que eram negativas para o DNA de HPV no início do estudo mas apresentavam a detecção de DNA de qualquer tipo de HPV após um ano de seguimento foi efetuada na tentativa de correlacionar a soropositividade de classe M contra HPV-16 dentro de uma amostragem de soros que contivesse uma proporção de prováveis infecções primárias. O cruzamento dos dados de soropositividade de anticorpos da classe M nas amostras séricas colhidas após um ano de seguimento com os dados provenientes dessa população de mulheres resultou no cálculo de um valor de risco relativo de 1,550 (IC95% 0,522-4,600) (dados não apresentados). Esses resultados, apesar de não atingirem significância estatística, indicariam que as prováveis infecções primárias pelo HPV contidas dentro dessas população resultariam em 50% maior chance de um resultado positivo para IgM contra HPV-16.

Tabela 19: Riscos relativos (RR) da associação entre a presença de infecções persistentes ou transientes por HPV e IgM contra HPV-16 em soros obtidos à admissão ao estudo.

RR (IC 95%)*	Tipo de Infecção	
	Persistente	Transiente
Bruto	2,285 (0,546-9,565)	1,582 (0,712-3,516)
Ajustado por Idade	2,236 (0,516-9,680)	1,577 (0,709-3,505)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0. Percentil 66%, 1:10, NAR

Tabela 20: Riscos relativos (RR) da associação entre a presença de infecções persistentes ou transientes por HPV e IgM contra HPV-16 em soros obtidos após um ano de seguimento do estudo.

RR (IC 95%)*	Tipo de Infecção	
	Persistente	Transiente
Bruto	1,964 (0,468-8,248)	0,921 (0,415-2,042)
Ajustado por Idade	1,829 (0,429-7,800)	0,885 (0,396-1,980)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0. Percentil 66%, 1:10, NAR

A próxima etapa das análises procurou avaliar a existência de eventuais correlações entre o número de cópias virais/célula determinado nos esfregaços cervicais e a soropositividade de IgM contra HPV-16 nos soros correspondentes, conforme ilustrado nas Tabelas 21 e 22. A quantificação do DNA de qualquer tipo de HPV, arbitrariamente discriminada em baixo número de cópias (< 10 cópias/célula) e alto número de cópias (>10 cópias/célula), quando correlacionada com a soropositividade de IgM contra HPV-16, resultou em uma tendência de que os maiores títulos de anticorpos da classe IgM estariam acompanhando mais às amostras com baixo número de cópias do que as amostras com alto número de cópias ao início do estudo. Essa tendência é perdida após um ano de seguimento, conforme pode ser visto na Tabela 22. Ao procurarmos tal correlação em relação à soropositividade de anticorpos da classe G contra HPV-16, observamos que não há diferença entre alto e baixo número de cópias (Tabela 23).

Tabela 21: Riscos relativos (RR) da associação entre a determinação da carga viral nos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 em soros obtidos à admissão ao estudo.

RR (IC 95%)*	Carga Viral	
	Alta	Baixa
Bruto	0,696 (0,235-2,058)	1,491 (0,689-3,183)
Ajustado por Idade	0,713 (0,240-2,116)	1,477 (0,689-3,166)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0. Percentil 66%, 1:10, NAR

Tabela 22: Riscos relativos (RR) da associação entre a determinação da carga viral nos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 em soros obtidos após um ano de seguimento do estudo.

RR (IC 95%)*	Carga Viral	
	Alta	Baixa
Bruto	0,800 (0,206-3,102)	1,182 (0,496-2,814)
Ajustado por Idade	0,744 (0,188-2,947)	0,938 (0,377-2,336)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0. Percentil 66%, 1:10, NAR

Tabela 23: Riscos relativos (RR) da associação entre a determinação da carga viral nos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 em soros obtidos à admissão do estudo.

RR (IC 95%)*	Carga Viral	
	Alta	Baixa
Bruto	1,348 (0,449-4,049)	1,384 (0,541-2,399)
Ajustado por Idade	1,483 (0,487-4,518)	1,340 (0,647-2,775)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.
Percentil 66%. 1:10, NAR

As Tabelas 24 e 25 apresentam as tendências obtidas para a carga viral determinada nos esfregaços cervicais e a soropositividade de anticorpos da classe IgM, definida por quartis. O primeiro quartil (0-25%) foi utilizado como referência, indicando as mulheres soronegativas. As taxas de risco relativo calculadas após o ajuste para possíveis fatores de confusão dos resultados obtidos, como idade, tipo de HPV e tipo de infecção estão apresentadas após as taxas brutas. Nota-se nessas tabelas que a tendência de associação entre soropositividade de IgM e baixo número de cópias permanece inalterada mesmo após os ajustes no início do estudo e apresenta flutuações nos dados obtidos após um ano de seguimento.

A presença de alto ou baixo número de cópias nas amostras de esfregaços cervicais, quando correlacionadas com a soropositividade de IgM, analisadas por quartis de soropositividade, indica uma associação crescente dos altos títulos de IgM com um baixo número de cópias ao início do estudo, conforme demonstrado pela Figura 4.

Tabela 24: Riscos relativos (RR) da associação da detecção de carga viral nos esfregaços cervicais de acordo com a definição da resposta sorológica para IgM contra HPV-16 em soros obtidos à admissão do estudo.

Definição de Soropositividade	RR (IC 95%)	
	Baixa Carga Viral	Alta Carga Viral
Percentil 25-50%	2,340 (0,970-5,641) *	0,727 (0,239-2,214) *
	3,306 (0,834-13,101) **	0,411 (0,116-1,681) **
	6,247 (1,082-36,080) ***	0,357 (0,077-1,651) ***
Percentil 50-75%	1,571 (0,624-3,954) *	0,477 (0,137-1,664) *
	1,890 (0,410-8,718) **	0,340 (0,078-1,477) **
	1,757 (0,241-12,829) ***	0,395 (0,078-1,997) ***
Percentil 75-100%	2,004 (0,820-4,898) *	0,347 (0,088-1,368) *
	1,913 (0,398-9,190) **	0,159 (0,032-0,800) **
	3,891 (0,575-26,326) ***	0,106 (0,016-0,720) ***

* Risco Relativo Bruto

** Risco Relativo Ajustado por Idade e Tipo de HPV

*** Risco Relativo Ajustado por Idade, Tipo de HPV e Tipo de Infecção

Tabela 25: Riscos relativos (RR) da associação da detecção de carga viral nos esfregaços cervicais de acordo com a definição da resposta sorológica para IgM contra HPV-16 em soros obtidos após um ano de seguimento do estudo.

Definição de Soropositividade	RR (IC 95%)	
	Baixa Carga Viral	Alta Carga Viral
Percentil 25-50%	1,000 (0,351-2,848) *	1,722 (0,394-7,526) *
	1,139 (0,356-3,649)**	1,466 (0,330-6,517) **
	1,941 (0,310-12,171) ***	3,819 (0,496-29,425) ***
Percentil 50-75%	0,983 (0,345-2,797) *	2,067 (0,494-8,641) *
	1,087 (0,333-3,550) **	0,941 (0,181-4,899) **
	0,612 (0,094-3,978) ***	0,677 (0,091-5,025) ***
Percentil 75-100%	0,860 (0,293-2,528) *	1,000 (0,194-5,148) *
	0,935 (0,283-3,087) **	0,896 (0,172-4,678) **
	0,935 (0,283-3,087) ***	0,615 (0,083-4,556) ***

* Risco Relativo Bruto

** Risco Relativo Ajustado por Idade e Tipo de HPV

*** Risco Relativo Ajustado por Idade, Tipo de HPV e Tipo de Infecção

<i>Parâmetros Calculados</i>	<i>Baixa Carga Viral</i>	<i>Alta Carga Viral</i>
X^2 Total 3 g.l. (p)	4,05 (0,26)	2,99 (0,40)
X^2 da Linearidade 2 g.l. (p)	2,89 (0,24)	0,05 (1,00)
X^2 da Inclinação 1 g.l. (p)	1,16 (0,28)	2,94 (0,08)
<i>p de Inclinação</i>	0,02	- 0,02

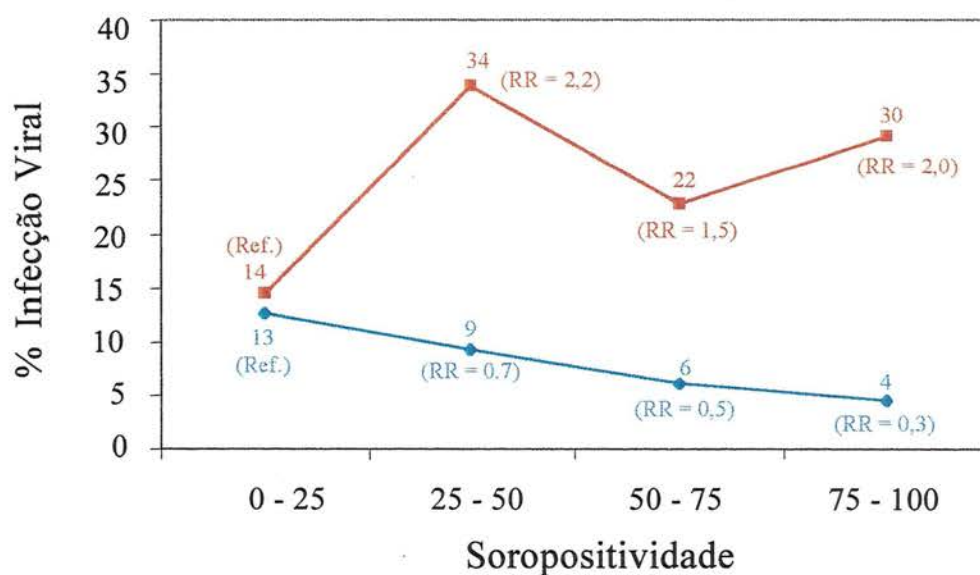


Figura 4: Correlação entre a proporção de indivíduos portadores de alta (azul) ou baixa (vermelho) carga viral em esfregaços cervicais e a soropositividade para anticorpos da classe IgM detectados contra VLP de HPV-16, definida através de quartis da distribuição dos dados expressos em NAR, em amostras séricas coletadas ao início do estudo prospectivo e diluídas a 1:10.

Não foram encontradas correlações entre a presença de anormalidades citológicas HPV-induzidas e a soropositividade de IgM tanto no início do estudo quanto após um ano de seguimento (dados não apresentados). Não foi encontrada nenhuma associação entre o desenvolvimento de lesões cervicais e altos títulos de anticorpos da classe IgM em nenhum dos períodos analisados, quando são utilizados os pontos de corte definidos pelo percentil 66%. O número baixo de ocorrências de lesões dentro da população de mulheres testadas ocasionou a ausência de casos que fossem, concomitantemente, positivos para lesões e para altos títulos de IgM, não permitindo a realização de tal análise.

A soropositividade de IgG contra VLP de HPV-16 por outro lado, apresenta um caráter preditivo em que a população soropositiva para essa imunoglobulina demonstra um aumento de cerca de 2,5 mais chances de prever o desenvolvimento de lesões de alto grau, especificamente, quando comparada com a população de indivíduos soronegativos (Tabela 9 e 10).

5. - DISCUSSÃO

Inicialmente os ensaios do tipo ELISA foram otimizados para detectar a presença de anticorpos contra o HPV nas amostras de soros coletadas em um estudo prospectivo de amplas dimensões para avaliar os fatores de risco predisponentes ao câncer cervical. A utilização dos índices NAR e NAD permitiu a normalização dos valores de absorbância bruta obtidos nestes ensaios.

A normalização de dados absolutos é importante, de acordo com JECKELL *et al.* (1996), porque eliminaria facilmente os efeitos de distorção dos dados causados pelo uso de valores unitários absolutos, através do uso de uma “forma livre da unidade” ou normalizada, como o é a abordagem que escolhemos. A idealização desses dois índices inéditos com o propósito de utilização neste estudo exigiu, entretanto, que a adequação dos mesmos fosse avaliada.

Os valores do coeficiente de determinação r^2 apresentados na Tabela 4 devem ser entendidos como as frações de variância compartilhadas pelos dois conjuntos de valores analisados, ou seja, aqueles provenientes tanto do início do estudo quanto após quatro meses de seguimento do mesmo. Em outras palavras, os valores dos coeficientes de determinação calculados para os dados de absorbância bruta, NAR e NAD das amostras referentes a esses dois períodos de tempo representariam a porcentagem de variabilidade que seriam equivalentes, ou estariam correlacionadas, dentro desses dois grupos amostrais. A variabilidade amostral deve ser compreendida aqui como uma

somatória de dois componentes: a variabilidade que pode ser explicada pela correlação ou equivalência dos dois conjuntos de dados e a variabilidade decorrente do acaso ou de erros de medidas. Assim, o valor de r^2 calculado para amostras diluídas a 1:10 para a absorbância bruta, por exemplo, representaria que 30% da variabilidade das absorbâncias brutas medidas ao início do estudo equivalem a 30% da variabilidade dessas absorbâncias quando medidas após quatro meses de seguimento do estudo. Os 70% restantes da variabilidade dentro desses dois grupos amostrais deveriam ser creditados tanto a variações ao acaso quanto a erros de medidas (MOTULSKY, 1995).

Logo, segundo a análise da Tabela 4, vê-se que a normalização dos valores de absorbância bruta através da sua conversão para NAR e NAD resulta em um incremento de 30% na correlação entre os dados provenientes de amostras do início e após quatro meses de seguimento do estudo, quando comparada à correlação encontrada na análise das absorbâncias brutas, e diminui consideravelmente a parcela da variabilidade inter-grupos amostrais devida ao acaso e a erros de medidas. Tal se dá porque a normalização dos valores de absorbância bruta provavelmente diminui o impacto das variações intra e inter-ensaios, que ocorrem inevitavelmente em imunoensaios.

Essa observação permite que não só se considerem esses índices normalizadores bastante adequados, como melhores do que as medidas expressas como absorbância bruta para analisar a associação entre a soropositividade de anticorpos contra HPV-16, a detecção do DNA de HPV, o desenvolvimento de lesões cervicais e diversas variáveis epidemiológicas.

Ainda na Tabela 4, é possível observar que o NAD responderia por uma elevação 5-10 % maior da correlação entre esses dois grupos amostrais do que o NAR. Entretanto, esse fato não pareceu afetar de maneira marcante a análise estatística final dos resultados, visto que as mesmas tendências de associação foram observadas para ambos os índices, permitindo a opção por qualquer um deles para a análise dos resultados obtidos.

A definição dos valores de corte ou *cutoff* nos ensaios imunoenzimáticos que objetivam avaliar a resposta humoral sorológica em indivíduos infectados pelo HPV sempre foi uma questão controversa na literatura científica pertinente. Diversos grupos de pesquisadores procuraram estipular a melhor maneira de definir os valores de *cutoff* para o estabelecimento de amostras positivas e negativas nos ensaios sorológicos para avaliar anticorpos séricos contra o HPV, mas não chegaram a um consenso.

Algumas das estratégias descritas para contornar esse problema são:

a. a definição *a priori* (antes do início dos testes laboratoriais) de um valor de *cutoff*, seja oriundo da reatividade média de um grupo de soros de mulheres com baixa probabilidade de exposição ao vírus, como virgens ou freiras; (NONNENMACHER *et al.*, 1996) ou arbitrário (VAN DOORNUM *et al.* 1994; HEINO *et al.*, 1995; ANDERSSON-ELLSTRÖM *et al.*,1996), seja definido pela somatória da média dos valores de absorbância dos casos e dos controles divididas por 2 (CHUA *et al.*, 1996).

b. a definição de um valor de *cutoff* fundamentado na distribuição amostral estatística de populações amostrais específicas, portadoras de características previamente definidas, tais como mulheres saudáveis (HAMSIKOVA *et al.*, 1997), mulheres sem

carcinoma cervical (FISHER *et al.*, 1996), mulheres com doenças não relacionadas ao HPV (HEIM *et al.*, 1995), mulheres citologicamente normais e negativas para a detecção do DNA de HPV por PCR (KIRNBAUER *et al.*, 1994), virgens (VAN DOORNUM *et al.*, 1998) e crianças não expostas ao vírus (DE SANJOSÉ *et al.*, 1996; SASAGAWA *et al.*, 1996). Em todos os casos, os valores de *cutoff* foram definidos através da somatória dos valores médios das distribuições supracitadas com duas ou três vezes o valor dos desvios padrões, desde que excluídos os valores *outliers*.

c. A definição de valores de *cutoff* através da curva denominada como *Receiver Operating Characteristic Curve* ou *ROC*, muito utilizada para definição de valores de *cutoff* em ensaios de proteínas sanguíneas, pois respeita as variações intra-individuais ocorridas independentemente da condição do mesmo, se caso ou controle, através da apresentação gráfica dos valores de sensibilidade no eixo X e de falsos negativos (1-especificidade) no eixo Y (NONNENMACHER *et al.*, 1995).

Não há, entretanto, uma maneira ideal ou mais correta de definir um valor de *cutoff* para os ensaios sorológicos para HPV porque, embora a principal via classicamente definida para a transmissão dos tipos de HPV genitais seja o contato sexual (SYRJÄNEN, 1996), outras vias de transmissão deste agente têm sido consideradas em literatura nos últimos anos, tais como a transmissão vertical perinatal, envolvendo a transferência do vírus de mães infectadas para recém-nascidos, via o canal de parto (RICE *et al.*, 1999; CASON *et al.*, 1995) e a transmissão horizontal indireta via fômites (RODEN *et al.*, 1997). Este fato torna a parte experimental dos estudos de sorologia das infecções por HPV um pouco mais controversa, na medida em que

difículta a obtenção de soros verdadeiramente negativos para anticorpos contra os antígenos de qualquer tipo de HPV, visto que mesmo os soros provenientes de mulheres não expostas ao HPV por via sexual poderiam ter anticorpos contra esse vírus.

No caso da classe G, tanto imunoglobulinas devidas a uma infecção ainda presente pelo HPV, quanto aquelas devidas a infecções passadas e, muitas vezes, já debeladas (cicatrices sorológicas), são passíveis de detecção pelos ensaios sorológicos, o que tornaria ainda mais difícil definir quais os critérios e as características necessárias para considerar os soros controles.

No caso da classe M, por sua vez, embora não se tenha mais o inconveniente da detecção de cicatrizes sorológicas, visto que a IgM é uma imunoglobulina típica de primo-infecções e pouco duradoura, têm-se a desvantagem de avaliar uma imunoglobulina de títulos séricos extremamente baixos.

Assim, em virtude de tamanha controvérsia com respeito a essa questão da definição dos valores de *cutoff*, optou-se neste estudo por utilizar a estratégia previamente descrita por KIRNBAUER *et al.* (1994) para a definição de soropositividade da classe G. Assim, neste estudo, efetuou-se a distribuição de frequências dos valores de NAR e NAD para um grupo de 610 mulheres consistentemente negativas para a detecção do DNA de HPV e para o diagnóstico de lesões cervicais HPV-induzidas durante o período de um ano de seguimento do estudo e, arbitrariamente, escolheram-se os valores de NAR e NAD compreendidos pelos percentis 75% e 90% como valores de corte.

A escolha de duas diluições relativamente baixas (1:10 e 1:50) no teste das amostras utilizadas neste estudo fundamentou-se na literatura: KIRNBAUER *et al.* (1994) padronizou o seu ELISA-VLP utilizando uma diluição de 1:4 dos soros em teste. Ponderou-se o uso de diluições séricas mais baixas no intuito de manter um título elevado o suficiente desses anticorpos para ser passível de detecção em ELISA, visto que a resposta imune humoral dirigida contra o HPV origina níveis extremamente baixos de anticorpos sistêmicos, independente da classe avaliada. Tal deve-se ao fato de que as infecções por esse vírus são altamente localizadas e periféricas, dificultando a criação de uma resposta imune humoral sistêmica de vulto. Além disso, a infecção produtiva do epitélio cervical aparentemente pode manter-se por meses ou anos sem desencadear nem mesmo respostas inflamatórias associadas (FRAZER, 1996), o que implicaria em uma não detecção (ou em um atraso da detecção) da presença dos antígenos virais pelo sistema imune do hospedeiro durante meses ou até anos (ZINKERNAGEL e KELLY, 1997).

Baseado nestes fatos, CANDEIAS (1998) padronizou e utilizou as diluições das amostras em teste para 1:10, 1:50 e 1:100, mas concluiu que a diluição 1:100 era mais eficiente apenas nos casos de soros com títulos muito elevados, podendo originar resultados soronegativos ou *borderline* para negatividade em soros que apresentassem menores títulos de anticorpos. Essa observação o persuadiu a descartar essa última diluição e a utilizar apenas as duas primeiras diluições citadas em seu estudo de padronização dessa metodologia.

O desenvolvimento de doença cervical HPV-induzida é sempre acompanhada por uma soroconversão, seja para anticorpos gerados contra epítomos virais conformacionais ou lineares (VONKA *et al.*, 1999). Segundo CARTER *et al.* (1996), a soroconversão ocorre cerca de 8,3 meses após a detecção cervical do DNA de HPV por PCR, podendo ocorrer antes ou concomitante à detecção das lesões cervicais. Ainda segundo esses autores, mulheres que apresentam a detecção positiva para o DNA de HPV-16 na cérvix uterina têm um risco relativo 12 vezes maior para soroconverter do que aquelas negativas para DNA de HPV. E, uma vez que a soroconversão ocorre, os níveis de anticorpos tendem a persistir por um período médio de 3 anos, mesmo na ausência do DNA de HPV cervical, cuja persistência é de apenas 14 meses, em média (CARTER *et al.*, 1996).

Considera-se que as respostas humorais que geram anticorpos da classe IgG contra capsídios (VLP) de HPV-16 são inteiramente dependentes de epítomos conformacionais (RODEN *et al.*, 1996; SASAGAWA *et al.*, 1998), visto que os anticorpos contra epítomos lineares provenientes de proteínas virais precoces são observados em níveis elevados somente após o desenvolvimento de lesões displásicas significativas ou após a progressão maligna da lesão precursora cervical. Já os anticorpos gerados contra epítomos conformacionais de capsídios (VLP) parecem ser produzidos apenas durante as infecções assintomáticas (DILLNER *et al.*, 1995).

Assim sendo, poder-se-ia considerar a soropositividade de anticorpos da classe G contra o HPV como um bom indicador de risco elevado para o desenvolvimento do carcinoma cervical, visto que reflete infecções persistentes prolongadas. Além disso, a

soropositividade contra HPV fornece tanto informações sobre infecções passadas pelo HPV (exposição cumulativa ao vírus) quanto sobre infecções ainda presentes (NONNENMACHER *et al.*, 1995), enquanto que a positividade cervical para o DNA de HPV pode apenas fornecer informações sobre infecções em andamento no momento do teste. Por outro lado, existem autores que defendem que a detecção do DNA de HPV nos tecidos e esfregaços cervicais refletiria apenas infecções transientes com baixo risco de progredir para a malignidade (SASAGAWA *et al.*, 1998).

Neste estudo, as reatividades sorológicas médias encontram-se mais elevadas nos soros pertencentes a mulheres infectadas por tipos de HPV de alto risco do que para aqueles de mulheres não infectadas pelo HPV, e que o grupo das mulheres infectadas por tipos de HPV de baixo risco apresentam uma reatividade sorológica média intermediária. VAN DOORNUM *et al.* (1994) e VISCIDI *et al.* (1997) relataram que os valores de absorbância bruta médios tendiam a aumentar nos grupos de indivíduos positivos para o DNA de HPV de outros tipos que não o HPV-16 e no de indivíduos positivos para o DNA de HPV-16 especificamente, quando comparados aos indivíduos negativos para o DNA de HPV em ensaios sorológicos que utilizavam como antígenos peptídios de genes tardios e VLP de HPV-16, respectivamente (VAN DOORNUM *et al.*, 1994; VISCIDI *et al.*, 1996). Além disso, outros estudos empregando ELISA com VLP de HPV-16 relatam uma prevalência crescente de anticorpos contra HPV-16, principalmente, nos grupos de indivíduos negativos para o DNA de HPV (9%-18%), indivíduos positivos para outros tipos de HPV que não o HPV-16 (17%-40%), e para

indivíduos positivos para o DNA de HPV-16 (28%-56%) (SASAGAWA *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1997; VAN DOORNUM *et al.*, 1998).

O fato de que os dados de sororeatividade demonstrados aqui estarem categorizados por tipos de HPV de alto e baixo risco não impede que os comparemos com os dados de literatura porque o HPV-16 foi o tipo de HPV de alto risco mais prevalente (19% de todos os casos positivos para a detecção do DNA de HPV no início do estudo) dentro das mulheres admitidas no estudo que estamos desenvolvendo, seguido pelo HPV-53 (10% de todos os casos) e pelo HPV-58 (2,2% de todos os casos) (FRANCO *et al.*, 1999b). Esse fato permite supor que a elevada sororeatividade no grupo infectado por HPV de alto risco está sendo bastante influenciada por essa alta prevalência do HPV-16 na nossa população de mulheres, permitindo que, sob a análise da sororeatividade como uma variável contínua, esse grupo apresente o mesmo padrão de sororeatividade que os grupos de mulheres positivas somente para o DNA de HPV-16 descritos nos outros estudos. Além disso, considera-se que a sorologia baseada em anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16 é tipo-específica. As taxas de prevalência significativas de anticorpos contra HPV-16 detectadas em vários estudos, têm sido explicadas como oriundas de cicatrizes sorológicas causadas por infecções prévias pelo HPV-16, não mais detectáveis por PCR no momento da análise (CHUA *et al.* 1996; RODEN *et al.*, 1996; SASAGAWA *et al.*, 1998). Sendo assim, a reatividade levemente aumentada que encontramos entre as mulheres infectadas por HPV de baixo risco em nosso estudo poderia também ser devida a infecções prévias pelo HPV-16. Em concordância com esse postulado, CARTER *et al.* (1996) levantaram a hipótese de que a

tendência apresentada por mulheres infectadas por outros tipos de HPV que não o HPV-16 de terem 2 vezes mais chances de soroconverter para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16 do que as mulheres HPV-negativas, quando comparada com o risco 12 vezes maior de soroconversão apresentado por mulheres infectadas pelo HPV-16, sugeriria que epítomos imunodominantes na superfície dos capsídios de HPV-16 são tipo-específicos.

A “persistência” de soropositividade (amostras do início e após quatro meses de seguimento do estudo positivas para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16) e o seu risco levemente maior de prever infecções por HPV de alto risco demonstrados na Tabela 11 relacionam-se, provavelmente, ao fato de que os HPV de alto risco tendem a persistir por mais tempo na cérvix uterina do que os HPV de baixo risco (FRANCO *et al.*, 1999b). WANG *et al.* (1996) descreveram a persistência de anticorpos cervicais da classe IgA em visitas sucessivas de seguimento de um estudo prospectivo, em que a persistência do anticorpo estava sempre acompanhada pela persistência do DNA de HPV-16 na cérvix uterina. ELFGREEN *et al.* (1996), por sua vez, relataram que os níveis detectáveis de anticorpos das classes IgA e IgG contra HPV-16 decrescem sensivelmente após o tratamento de lesões HPV-induzidas por conização da cérvix uterina, devido à provável remoção do estímulo antigênico viral. Hamsikova *et al.* (2000) também relataram uma queda marcante nos níveis séricos de anticorpos da classe IgG contra epítomos provenientes das proteínas E2 e E7 de HPV após radioterapia intensiva em um grupo de pacientes com carcinoma cervical. Esses dados sugerem que a permanência dos determinantes antigênicos estimuladores da resposta imune do

hospedeiro por um tempo maior e, conseqüentemente, a persistência dos anticorpos séricos contra HPV.

O risco relativo de ser soropositivo para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16 e apresentar DNA de HPV cervical variam na literatura de 3,7 a 9 vezes para indivíduos positivos apenas para o DNA de HPV-16 e de 1,2 a 3,7 vezes para indivíduos positivos para outros tipos de DNA de HPV quando comparados com os indivíduos negativos para o DNA de HPV (referência 1,0) (VISCIDI *et al.*, 1997; BONTKES *et al.*, 1999; WIDEROFF *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). Nota-se em nosso estudo a mesma tendência previamente descrita, ou seja, mulheres infectadas por tipos de HPV de alto risco (aliado à persistência de soropositividade) teriam um risco relativo maior de apresentar anticorpos da classe IgG específicos para HPV-16 (RR=2,17).

Outro aspecto interessante é o fato de que a soropositividade da classe G contra HPV-16 em apenas uma amostra, seja ela proveniente do início do estudo ou de quatro meses de seguimento, resulta em um risco relativo 2 vezes maior para que os indivíduos apresentem a detecção de HPV de baixo risco na cérvix uterina. Partindo-se do pressuposto que as reações sorológicas para detectar anticorpos contra HPV-16 são tipo específicas, essa associação poderia ser explicada baseando-se na capacidade da sorologia para HPV de detectar a exposição cumulativa ao vírus (WIKSTRÖM *et al.*, 1995; NONNENMACHER *et al.*, 1996 e OLSEN *et al.*, 1997) e em algumas características das infecções por tipos de HPV de baixo risco. Essas infecções, embora sejam menos prevalentes (7,0%) do que as infecções por tipos de HPV de alto risco (8,4%), tendem, também, a regredir espontaneamente mais rapidamente (cerca de 7

meses) do que essas últimas (cerca de 9 meses), conforme observado no estudo epidemiológico prospectivo Ludwig/McGill. Além disso, as infecções por tipos de HPV de baixo risco apresentam uma taxa de perda de positividade mensal (*clearance*) do DNA viral (12,2%/mês) muito maior do que aquela apresentada pelos tipos de alto risco (9,5%/mês) (FRANCO, *et al.*, 1999b). A somatória destas características com fatores de risco relacionados preferencialmente a variáveis de comportamento sexual recente, conforme relatado em alguns estudos epidemiológicos, permite que se confira um comportamento biológico predominantemente transitório às infecções por tipos de HPV de baixo risco (FRANCO *et al.*, 1995; KJAER *et al.* 1997).

As características citadas acima permitem a inferência de que a soropositividade de anticorpos contra VLP de HPV-16 em uma única amostra estaria evidenciando a exposição cumulativa prévia dos indivíduos ao HPV-16, atuando como um marcador de atividade sexual. Em outras palavras, estes indivíduos estariam mais expostos ao HPV, particularmente aos tipos de baixo risco, uma vez que a probabilidade cumulativa de adquirir estas infecções é mais elevada (22,4%) em relação aquela apresentada pelos tipos de HPV de alto risco (11,2%) dentro da nossa coorte (FRANCO *et al.*, 1999b). Essa combinação de eventos poderia evidenciar-se através do risco 2 vezes maior de detecção de tipos de HPV baixo risco em mulheres soropositivas para anticorpos contra HPV-16 do que naquelas soronegativas.

De forma similar aos resultados obtidos em nosso estudo, DE GRUIJL *et al.* (1997) e BONTKES *et al.* (1999) encontraram valores de reatividade médias para IgG contra VLP de HPV-16 maiores no grupo de indivíduos que apresentavam detecções

persistentes do DNA de HPV quando comparados aqueles encontrados no grupo dos indivíduos com infecções transientes pelo HPV. Corroborando esse achado, as taxas de soroprevalência para anticorpos IgG contra VLP de HPV-16 são normalmente maiores dentro do grupo dos indivíduos que apresentam infecções persistentes pelo HPV (69%-91%) do que dentro do grupo que apresenta infecções transientes (22%-29%) ou que são negativos para a detecção do DNA de HPV (16%) (WIDEROFF *et al.*, 1996; CARTER *et al.*, 1996). Esse panorama poderia ser explicado, segundo SASAGAWA *et al.* (1998), pelo fato de que a persistência do DNA de HPV na cérvix uterina é necessária para disparar respostas imunes caracterizadas por anticorpos das classes IgA e IgG.

WIDEROFF *et al.* (1996) relatam que indivíduos repetidamente positivos para o DNA viral apresentaram um risco relativo 2 vezes maior de serem soropositivos para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16 do que os indivíduos positivos para o DNA de HPV em apenas uma amostra. Em nosso estudo, a “persistência” da soropositividade da classe G contra VLP de HPV-16 (ao início e durante o seguimento do estudo) confere um risco ainda maior (cerca de 3 vezes) para a detecção de infecções persistentes. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a exposição prolongada aos antígenos virais atuaria como o determinante primordial das respostas indutoras de anticorpos contra VLP de HPV-16 detectáveis em mulheres infectadas com DNA cervical de HPV-16 (WIDEROFF *et al.*, 1996). Outros estudos, ainda, referem valores mais elevados de risco relativo para a detecção de infecções persistentes dentre indivíduos soropositivos para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16, tais como 7,1 (BONTKES *et al.*, 1999) e 23,1 (WIDEROFF *et al.*, 1999). A diferença dos

valores absolutos, visto que as tendências permanecem as mesmas, pode ser explicada novamente por variações na escolha das amostras analisadas em cada estudo. Eventuais diferenças nos protocolos utilizados nestes dois estudos, quando comparados ao nosso, não podem ser descartadas como possíveis causas para essa diferença, embora esses dois estudos também tenham padronizado seus ELISA a partir de modificações daquele publicado por KIRNBAUER *et al.* (1994).

A persistência do DNA de HPV na cérvix uterina é maior dentre as mulheres infectadas por tipos virais de alto risco e predispõe um risco maior para o desenvolvimento de lesões cervicais (VILLA, 1997; FRANCO *et al.*, 1999b; HILDESHEIM *et al.*, 1993 e HO *et al.*, 1995). A persistência do DNA viral na cérvix uterina está sempre associada à persistência de títulos elevados de anticorpos séricos (BONTKES *et al.*, 1999) ou mucosos cervicais (WANG *et al.*, 1996), o que permite sugerir que a detecção sorológica persistente de anticorpos contra o HPV, aliada à detecção do DNA de HPV cervical, poderia atuar como um marcador indireto da presença de um maior risco à curto prazo do desenvolvimento de lesões HPV-induzidas. Além disso, as respostas séricas contra VLP de HPV-16 seriam um indicador relativamente sensível de infecção cervical persistente pelo HPV-16 (WIDEROFF *et al.*, 1996) e indicariam um risco aumentado de câncer cervical (DE GRUIJL *et al.*, 1997). De fato, foi constatado que como uma única detecção positiva para o DNA de HPV em esfregaços cervicais está fortemente associada ($RR=16,4$) ao carcinoma cervical invasivo (WALLIN *et al.*, 1999). Portanto, a realização de sorologia para HPV poderia

servir como uma metodologia adjuvante à detecção molecular do DNA de HPV na cérvix uterina, com o intuito de permitir o diagnóstico precoce das lesões cervicais.

Neste estudo, mulheres que apresentam lesão cervical tendem a ter maiores reatividades sorológicas médias (LSIL: 0,855 e HSIL: 0,998) do que os indivíduos que apresentam citologia normal (0,717), ou que foram classificados como portadores de citologia atípica de significado indeterminado ou ASCUS. Esses dados concordam com aqueles publicados por HEIM *et al.* (1995), em que foram descritas reatividades sorológicas médias para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV6/11 (tipos de HPV de baixo risco) maiores dentre pacientes portadoras de lesões de baixo e alto grau (LSIL e HSIL) do que dentre indivíduos controle, que não apresentavam alterações citológicas induzidas pelo HPV.

Diversos autores também encontraram uma reatividade média elevada para anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16 dentre os casos de CIN II e III (correspondentes à classificação de HSIL em nosso estudo) do que dentre os controles portadores de citologia normal em seus respectivos estudos (CHUA *et al.*, 1996; OLSEN *et al.*, 1996; DE GRUIJL *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000). Além disso, reportou-se uma reatividade sorológica média mais elevada dentre indivíduos portadores de CIN III, carcinoma *in situ* (também classificado como HSIL em nosso estudo) e carcinoma cervical invasivo do que dentre os indivíduos sem anormalidades citológicas (NONNENMACHER *et al.*, 1995; SASAGAWA *et al.*, 1996; SHAH *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, soropositividade de anticorpos em mulheres assintomáticas ao início do estudo conferiu uma tendência 2 vezes maior para o diagnóstico específico de

lesões cervicais de alto grau (HSIL) no período compreendido por um ano de seguimento. Esses dados concordam com os de Wang *et al.* (2000), que também encontraram um risco 2 vezes maior para o desenvolvimento de lesões cervicais em mulheres soropositivas para IgG contra VLP de HPV-16 no início do seu estudo longitudinal. Além disso, a análise de soros coletados e estocados na admissão das pacientes deste estudo longitudinal, que perdurou por um período total de seguimento de 23 anos, revelou que a soropositividade com altos títulos de anticorpos ao início do estudo foi capaz de prever um risco excessivo de 6,2 vezes para o desenvolvimento posterior de lesões. A tendência desses valores de risco era de duplicação caso o intervalo de tempo entre a detecção dos anticorpos séricos e o diagnóstico da lesão fosse superior a 10 anos.

SHAH *et al.* (1997), por sua vez, relataram que a soropositividade inicial de anticorpos contra VLP de HPV-16 conferia um risco relativo 4 vezes maior para o desenvolvimento posterior de carcinoma *in situ* (classificado como HSIL em nosso estudo) e carcinoma invasivo, que subia para 7,5 desde que fossem incluídos na análise apenas as mulheres apresentando altos níveis de anticorpos. Neste estudo, definiu-se que as mulheres consideradas como soropositivas apenas seriam aquelas que apresentassem valores de absorbância $\geq 0,200$ enquanto que as consideradas como portadoras de altos níveis de anticorpos (fortemente positivas) seriam as que apresentassem um valor de absorbância bruta $\geq 0,400$. Esses valores foram obtidos através da definição de valores de *cutoff* pela fórmula [(média mais três vezes o desvio padrão)] da distribuição amostral de uma população controle considerada soronegativa semelhante àquela utilizada em

nosso estudo (mulheres que relataram ≤ 1 parceiro sexual durante a vida, não apresentaram anormalidades citológicas e resultaram negativas para a detecção do DNA de HPV cervical através de reação de PCR).

NONNENMACHER *et al.* (1995) também relatam que a presença de anticorpos contra VLP de HPV-16 na ausência de estímulo antigênico - ou uma co-existência de lesões produtivas de proteínas virais com carcinomas - pode persistir por muitos anos em alguns indivíduos. Além disso, as tendências verificadas em nosso trabalho concordam com os dados provenientes de outros estudos. CHUA *et al.* (1996) e MARAIS *et al.* (1997) relataram um risco relativo 3 vezes maior para o diagnóstico de lesões de alto e baixo grau ou somente de alto grau, respectivamente, em mulheres soropositivas para IgG contra VLP de HPV-16. OLSEN *et al.* (1996) e CARTER *et al.* (1996) demonstraram que mulheres que apresentam anticorpos contra esse mesmo antígeno têm 2,8 vezes mais chances de desenvolverem lesões específicas de alto grau (HSIL) ou quaisquer SIL, respectivamente, do que as mulheres soronegativas para HPV-16, sendo que esse risco sobe para 4,3 e 5,7 em cada estudo, se as mulheres forem soropositivas para HPV-16 e positivas para o DNA de HPV-16 na cérvix uterina.

Em relação às variáveis epidemiológicas associadas à soropositividade da classe G contra HPV-16, uma série de associações foram observadas. A variável idade, categoria acima de 35 anos, apresentou correlações positivas estatisticamente significativas com soropositividade contra HPV-16, indicando que mulheres com mais de 35 anos tendem a ser mais soropositivas para anticorpos do que mulheres mais jovens. Os estudos de soroprevalência para anticorpos contra VLP de HPV-16 realizados

nos Estados Unidos por VISCIDI *et al.* (1997) e na Jamaica por STRICKLER *et al.* (1999), também encontraram que a soropositividade contra o HPV é mais elevada em indivíduos acima dos 30 anos. Esses resultados são consistentes com a idéia de que a sorologia para o HPV é uma medida de exposição cumulativa e que por isso, mulheres mais velhas teriam estado expostas ao vírus por tempo maior e apresentariam, conseqüentemente, maiores níveis de anticorpos do que mulheres mais jovens. A respeito desse aspecto, NONNENMACHER *et al.* (1996) relataram que, em uma população de mulheres sob baixo risco de desenvolvimento de carcinoma cervical (Dinamarca), a soropositividade contra HPV-16 aumentava significativamente com a idade, enquanto que em uma população de mulheres sob alto risco de desenvolvimento do carcinoma cervical (Groenlândia), esse padrão se invertia. A explicação dada pelos autores para esse fenômeno foi que a infecção pelo HPV-16 seria tão mais comum na Groenlândia que na Dinamarca, que aquelas mulheres seriam expostas aos tipos genitais de HPV em um período relativamente curto desde o início de sua atividade sexual, permitindo que uma resposta sorológica ao vírus fosse montada rapidamente. Nas dinamarquesas, por outro lado, por estarem menos expostas ao HPV, observou-se que fatores de risco classicamente associados a soroconversão dessas mulheres, como o número de parceiros sexuais durante a vida e a idade fossem os responsáveis pelo perfil de resposta sorológica fundamentada em IgG contra o HPV apresentado por essa população.

OLSEN *et al.* (1997) e MARAIS *et al.* (1997), de modo diferente, indicaram em seus estudos que a soropositividade contra VLP de HPV-16 é mais elevada em

indivíduos jovens (20-30 anos) e tende a diminuir com o aumento de idade. Essa aparente discrepância poderia ser explicada pelo desenho epidemiológico de caso-controle destes estudos que, ao contrário dos estudos de soroprevalência desenvolvidos com indivíduos assintomáticos, incluiu portadores de lesões de alto grau e controles citologicamente normais. CHUA *et al.* (1996) também relataram que a soropositividade de anticorpos da classe G contra VLP de HPV-16 conferia um risco mais elevado para o desenvolvimento de CIN em mulheres mais jovens (menos de 35 anos) e que esse risco decrescia em mulheres mais velhas. A explicação plausível para esses dados seria que o nível de anticorpos contra capsídios tende a diminuir com a passagem do tempo e a progressão das lesões em indivíduos afetados, devido tanto à queda fisiológica dos níveis de anticorpos existentes com o passar do tempo, quanto ao evento de integração do genoma viral e interrupção da síntese das proteínas do capsídio durante a progressão de lesões.

A variável raça não apresentou correlação com soropositividade contra HPV-16. O mesmo ocorreu em relação à variável escolaridade para as categorias ginásio e ensino superior. Entretanto, a correlação negativa entre a categoria escolaridade em nível primário e soropositividade foi marginalmente significativa ($p=0,07$) quando se utilizou a fórmula NAR e confirmou-se quando se utilizou a fórmula NAD (Anexo), indicando que as mulheres que cursaram o nível primário completo tenderiam a apresentar menor soropositividade do que as mulheres que não chegaram a cursar todo o nível primário. HAGENSEE *et al* (1999) encontraram que o nível de escolaridade era um fator preditivo de soropositividade em mulheres grávidas. SHAH *et al.* (1997) indicaram que mulheres

com escolaridade menor do que oito anos tinham riscos relativos maiores de vir a desenvolver carcinoma *in situ* ou carcinoma invasivo do que mulheres com escolaridade superior a oito anos. Uma explicação provável para esses dados seria que o maior acesso à educação permitiria que as mulheres obtivessem também maiores informações a respeito de métodos contraceptivos que, indiretamente, dificultassem a exposição ao HPV, como uso de preservativos, por exemplo. Além disso, tais mulheres teriam uma maior preocupação com o próprio estado de saúde, acessando o sistema de saúde em busca de diagnóstico preventivo e tratamento precoce.

A variável tabagismo correlacionou-se fortemente, de maneira negativa, à soropositividade de anticorpos da classe G contra VLP de HPV-16, indicando que as fumantes apresentam menor soropositividade do que as não fumantes ou do que as ex-fumantes. A explicação para essa queda do nível de anticorpos em fumantes poderia ser explicada pelo conhecido efeito imunossupressor causado pelo tabagismo. Resultados semelhantes foram obtidos por ANDERSEN *et al.* (1982) e CARRILLO *et al.* (1991) que observaram que indivíduos não fumantes têm níveis séricos maiores de IgG do que os fumantes, indicando que o tabagismo pode suprimir a resposta imune humoral, neste caso para HPV-16.

Foram também avaliadas as correlações entre a soropositividade de anticorpos da classe G contra VLP de HPV-16 e diversas variáveis de higiene e doenças sexualmente transmissíveis (DST). A única variável que apresentou correlação positiva com soropositividade de anticorpos contra HPV-16 foi a detecção prévia de DST, associada com a detecção do DNA de HPV, o que é consistente com a idéia de que o histórico de

DST poderia ser considerado como um marcador de atividade sexual. De fato, VISCIDI *et al.* (1997) relataram que indivíduos com histórico de DST prévias apresentavam 3 vezes mais chances de serem soropositivos para anticorpos contra VLP de HPV-16. HAGENSEE *et al.* (1999) também observaram que o histórico de infecções prévias por *Neisseria gonorrhoeae* poderia ser considerado como um fator de risco para a soropositividade contra VLP de HPV-16. Além disso, STRICKLER *et al.* (1999) descreveram que esta soroprevalência era bem mais elevada em indivíduos atendidos em clínicas de DST do que em doadores de sangue.

Uma série de outras variáveis como coceira genital, desconforto vaginal (recente ou não), ducha vaginal e uso de absorventes higiênicos (comerciais ou não) não foram associadas com a soropositividade de IgG contra HPV-16, o que está de acordo com os achados da literatura.

Correlações entre a soropositividade contra HPV-16 e variáveis de comportamento sexual foram também observadas, conforme esperado. A primeira variável a apresentar correlação negativa com a soropositividade contra HPV-16 em nosso estudo foi a idade ao primeiro coito nas categorias de idade superiores a 18 anos, indicando que quanto mais jovens as mulheres no momento de sua iniciação sexual, maior o risco de serem soropositivas para o HPV-16. Entre as prováveis explicações para essa associação estariam o elevado risco de encontrar um parceiro infectado por HPV (ANDERSSON-ELLSTRÖM *et al.*, 1996) ou a maior probabilidade de encontro de células propícias para infecção produtiva do HPV dentro das áreas de metaplasia

comuns na zona de transformação (junção escamo-colunar) do colo do útero de mulheres mais jovens.

Achados concordantes com os nosso estudo são apresentados por ANDERSSON-ELLSTRÖM *et al.* (1996), em seu estudo prospectivo acompanhando o início da vida sexual de adolescentes suecas: quanto mais jovens as mulheres em sua iniciação sexual, maior o grau da soropositividade contra o HPV-16. WIDEROFF *et al.* (1996) também encontraram essa associação, porém ela desapareceu após os ajustes por número de parceiros sexuais durante a vida e por uso de contraceptivos orais. Uma série de outros estudos, entretanto, não encontraram correlação entre soropositividade contra HPV e idade ao primeiro coito (DILLNER *et al.*, 1996; VISCIDI *et al.*, 1997; OLSEN *et al.*, 1997).

A correlação positiva entre soropositividade contra HPV-16 e o número de parceiros sexuais das mulheres seguidas em nosso estudo, indicou que um número superior a 2 parceiros sexuais durante toda a vida eleva significativamente a soropositividade. Esse dado não só foi corroborado por outros estudos, como apresentou um efeito dose-resposta na maioria deles, em que a taxa de soroprevalência aumentava linearmente com o aumento do número de parceiros sexuais durante a vida das mulheres analisadas até atingir um platô, geralmente por volta de 36% de taxa de soroprevalência para as mulheres que relataram mais do que 10 parceiros sexuais durante a vida (ANDERSSON-ELLSTRÖM *et al.*, 1996; CARTER *et al.*, 1996; DILLNER *et al.*, 1996; NONNEMACHER *et al.*, 1996; WIDEROFF *et al.*, 1996; OLSEN *et al.*, 1997; VISCIDI *et al.*, 1997; HAGENSEE *et al.*, 1999; STRICKLER *et al.*, 1999; WANG *et*

al., 2000). Esse fenômeno poderia ser devido ao desenvolvimento de imunidade contra infecções adicionais em mulheres já altamente expostas ao HPV, conforme demonstrado pelo seu alto número de parceiros sexuais durante a vida. Outra explicação seria a de que esse fenômeno poderia representar uma proporção de mulheres expostas ao vírus que desenvolveram e mantiveram de maneira estável uma resposta sorológica (DILLNER *et al.*, 1996).

A associação entre a soropositividade contra HPV-16 e o elevado número de parceiros sexuais durante a vida também corrobora a noção de que a sorologia fundamentada em anticorpos da classe IgG contra HPV mede principalmente a exposição ao vírus de maneira cumulativa. O estudo de WIDEROFF *et al.* (1999) relatou que a sororeatividade concomitante a mais de um tipo de HPV (-16, -18, -31 e -45) estava mais fortemente associada a um elevado número de parceiros sexuais durante toda a vida do que a sororeatividade a um único tipo de VLP. Esse dado poderia ser explicado pela associação entre a exposição cumulativa a múltiplos tipos de HPV e a persistência da resposta sorológica gerada contra cada um deles, aliada à relativa estabilidade dos níveis de IgG contra HPV ao longo do tempo.

A última das variáveis presentes na Tabela 15 que correlacionou-se positivamente com a sorologia para o HPV foi o número de parceiros sexuais nos últimos 5 anos, indicando que mulheres que relataram mais do que 2 parceiros sexuais neste período apresentavam soropositividade mais elevada do que aquelas que relataram até um parceiro. WIDEROFF *et al.* (1996) encontraram uma tendência mais fraca para a associação de soropositividade com número de parceiros recentes do que aquela descrita

para o número de parceiros durante a vida. STRICKLER *et al.* (1999) encontraram uma associação significativa entre soropositividade contra HPV-16 e número de parceiros sexuais no último ano em uma população masculina. Como esses autores não incluíram esse aspecto nos questionários preenchidos pela população feminina, não é possível avaliar se o mesmo aconteceu entre as mulheres desse estudo. De qualquer forma, embora essa associação pareça sofrer maiores flutuações nos diversos estudos publicados, ela fornece consistência a três pressupostos básicos da sorologia para HPV: primeiro, que esta sorologia mede a exposição cumulativa ao vírus; segundo, que a sorologia contra esse vírus pode detectar tanto anticorpos provenientes de infecções passadas quanto de infecções mais recentes e, terceiro, que os estudos de soroprevalência estão confirmando que a transmissão do HPV segue o mesmo padrão encontrado para DST.

A não correlação entre o uso de preservativos e a soropositividade de IgG contra o HPV-16 observada em nosso estudo também foi relatada por VISCIDI *et al.* (1997). Além disso, outras variáveis, como sexo oral e coito anal, também não têm sido comumente descritas como fatores de risco para a soropositividade contra o HPV-16.

Em relação a variáveis de saúde reprodutiva, a única variável que apresentou correlação positiva com soropositividade foi a variável gravidez, na categoria 4-6, e uma correlação marginalmente significativa na categoria superior a 6. O número de gravidezes também foi associado positivamente com a prevalência do DNA de HPV em uma população de mulheres de baixa renda de Washington (HILDESHEIM *et al.*, 1993). Como a população de mulheres participante do nosso estudo também pode ser

considerada como uma população de baixa renda, seria possível e razoável pressupor que esse dado poderia estar se repetindo em nossa população, sendo revelado indiretamente com a elevação da soropositividade contra VLP de HPV. Além disso, tem sido postulado que o estrogênio e outros hormônios seriam capazes de reativar infecções latentes pelo HPV ou de aumentar a expressão de genes virais, e que esse fato seria refletido pela associação de elevada paridade com a prevalência do DNA de HPV (MUÑOZ *et al.*, 1996; MUÑOZ e BOSCH, 1996) e, conseqüentemente, com a soroprevalência de anticorpos contra o HPV-16.

Embora o uso constante de contraceptivos orais não tenha sido correlacionado em nosso estudo com soropositividade contra VLP de HPV-16, WIDEROFF *et al.* (1996) relataram que esta variável estava fortemente associada ao risco de elevada soropositividade contra esse vírus em mulheres negativas para o DNA viral. Além disso, HILDESHEIM *et al.* (1993) descreveram que usuárias constantes de contraceptivos apresentaram uma prevalência do DNA de HPV mais elevada do que as não usuárias, provavelmente correlacionada aos efeitos descritos para o estrogênio na infecção pelo HPV (PATER *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996; ARBEIT *et al.*, 1996).

Os níveis de anticorpos da classe IgG contra o HPV-16 tornam-se detectáveis sorologicamente após um tempo mediano de 8,3 meses desde a obtenção da primeira detecção cervical do DNA de HPV, persistindo por aproximadamente 3 anos e superando, inclusive, a perda do DNA viral, que tende a persistir por, aproximadamente, 14 meses (CARTER *et al.*, 1996). Além disso, WIKSTRÖM *et al.* (1995) relataram que, durante todo o período de seguimento do seu estudo longitudinal, os anticorpos da classe

IgG mantiveram a tendência constante de elevar-se, previa ou concomitantemente à detecção cervical do DNA de HPV. Além disso, as reações sorológicas contra VLP de HPV-16 que detectam essa classe de anticorpos, são consideradas tipo-específicas (RODEN *et al.*, 1996; CARTER *et al.*, 1996).

Os anticorpos da classe IgM, por outro lado, tornaram-se detectáveis sorologicamente cerca de 1 a 2 semanas antes dos anticorpos da classe IgG, e persistiram por um período compreendido por 1 a 3 semanas apenas, em experimentos de imunização de camundongos com capsídios de HPV-1 (HAGENSEE *et al.*, 1995). A detecção desses anticorpos em seres humanos tem sido dificultada pela vida média curta e pelos baixos títulos dessa imunoglobulina no soros, mas alguns estudos relataram uma elevação de IgM contra VLP de HPV-16 e 18 ao longo do tempo (VAN DOORNUM *et al.*, 1998), seguida por uma tendência ao declínio durante o seguimento de estudos longitudinais, especialmente após a perda de positividade para o DNA de HPV, o que contrariaria a tendência à persistência demonstrada pela IgG (VAN DOORNUM *et al.*, 1994; Wikström *et al.*, 1995). Esses dados são consistentes com a mudança de classe de imunoglobulinas após o contato inicial com o agente exógeno descrita para as respostas imune primárias e secundárias (GOODMAN, 1992). Além disso, alguns autores consideram as metodologias que detectam anticorpos da classe IgM capazes de reagir cruzadamente com diferentes tipos de HPV, pois apresentam taxas de soroprevalência bastante semelhantes entre indivíduos infectados tanto pelo HPV de mesmo tipo que a VLP usada como antígeno, quanto por diferentes tipos de HPV (HEIM *et al.*, 1995; SASAGAWA *et al.*, 1996). O conceito de que os anticorpos da classe IgM poderiam

reagir cruzadamente com diversos antígenos não relacionados já havia sido previamente descrito. SCHATTNER (1987) descreveu que anticorpos monoclonais da classe IgM, gerados a partir de células coletadas de indivíduos normais, comportavam-se como anticorpos típicos de portadores de doenças auto-imunes, pois eram capazes de reagir cruzadamente tanto com vários antígenos próprios não relacionados quanto com diversos órgãos. MEURMAN (1982), por sua vez, relatou que reações cruzadas entre anticorpos anti-virais dessa classe poderiam acontecer com certa frequência para vírus estritamente relacionados, como, por exemplo, os flavivírus e alfavírus e o grupo dos herpesvírus (citomegalovírus e vírus Epstein-Barr), embora os títulos de anticorpos heterólogos (cruzados) seja em geral menor do que os dos anticorpos homólogos. Esse autor também relata a maior tipo-especificidade demonstrada pelos anticorpos da classe IgG, quando comparada com a da classe IgM.

A prevalência de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 que encontramos em nosso estudo (24,82% nas amostras coletadas ao início do estudo e 22,41% nas amostras coletadas após um ano de seguimento) está próxima ao que vem sendo publicado. CASON *et al.* (1995) detectaram uma prevalência de anticorpos da classe IgM contra HPV-16 compreendida entre 20% e 60% em um grupo de crianças, o que concorda com os nossos dados. As taxas de soroprevalência para IgM contra HPV estão compreendidas entre 39% e 67% em mulheres positivas para DNA de HPV e entre 6% e 16% em mulheres negativas (HEIM *et al.*, 1995; SASAGAWA *et al.*, 1996). A diferença encontrada entre as nossas taxas de prevalência e as destes estudos poderia ser explicada pelo fato de que o desenho epidemiológico destes dois estudos é o de caso-

controle, incluindo casos de LSIL, HSIL, condilomas e carcinomas, enquanto que o nosso é um estudo de soroprevalência realizado a partir de uma população assintomática, o que poderia implicar em taxas de soroprevalência um pouco menores. Apesar de pouco provável, outro aspecto a ser levado em consideração poderia ser o fato de que esses dois estudos foram desenvolvidos com populações provenientes de áreas (Áustria e Japão) que poderiam ter diferentes taxas de prevalência de infecção pelo HPV do que as nossas.

A soropositividade de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16, ao contrário do que ocorreu em relação a anticorpos da classe IgG, foi associada mais fortemente com infecções por tipos de HPV de baixo risco do que com infecções por tipos de alto risco. Ademais, devido a vida média curta da IgM, quando comparada à de IgG, poderia ser afirmado sem dúvida que essa associação estaria refletindo a resposta a uma infecção recente, em vez de passada. Esse dado, outrossim, poderia indicar um papel da IgM como marcador de infecções com vírus de baixo risco.

Sabe-se que as infecções por tipos de HPV de baixo risco apresentam um perfil epidemiológico diferente das infecções por tipos de HPV de alto risco (FRANCO *et al.*, 1995b). Enquanto as infecções por tipos de baixo risco tendem a regredir espontaneamente após um período de tempo menor, a apresentar uma taxa de *clearance* do DNA de HPV maior e a exibir uma probabilidade cumulativa de reinfecção também maior, as infecções pelos tipos de HPV de alto risco tendem a persistir por mais tempo, a apresentar uma taxa de *clearance* do DNA de HPV menor e a exibir uma probabilidade cumulativa de reinfecção menor (FRANCO *et al.*, 1999b).

Assim, é plausível considerar que o perfil epidemiológico demonstrado pelas infecções por tipos de HPV de baixo risco poderia ser responsável por uma maior proporção das infecções virais, sejam elas incidentes ou prevalentes, que estão ocorrendo dentro da coorte.

Levando-se em conta que a reação sorológica para detecção de IgM, aparentemente, não compartilha da tipo-especificidade demonstrada pela reação sorológica para detecção de IgG, podendo reagir cruzadamente com diversos tipos de HPV (HEIM *et al.*, 1995; SASAGAWA *et al.*, 1996), o teste dos soros dessas mulheres, embora utilizasse como antígeno VLP de HPV-16, poderia estar detectando IgM produzida contra outros tipos de HPV. Esse panorama poderia explicar a tendência de associação de soropositividade de IgM contra VLP de HPV-16 com infecções de baixo risco.

Enquanto mulheres infectadas por tipos de HPV de alto risco apresentam correlação com baixos títulos de IgM, as mulheres infectadas por tipos de baixo risco apresentam uma tendência linear significativa em ter uma proporção mais elevada de indivíduos com altos títulos de anticorpos da classe IgM. Poder-se-ia supor, através dessa observação, que a detecção destes anticorpos estaria indicando a fase inicial da resposta imune a infecções recentes por esses tipos de HPV, caracterizada pela elevação dos títulos de IgM após um prévio contato com o antígeno. Essa tendência de associação foi vislumbrada no estudo de HEIM *et al.* (1995). Esses autores encontraram prevalências mais elevadas para a detecção de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-11 em uma população infectada por tipos de HPV de baixo risco (HPV-6 e HPV-

11) do que para a detecção de anticorpos da classe IgG contra essa mesma VLP em 79 casos de condiloma (67% para IgM x 46% para IgG) e 72 casos de lesões intraepiteliais de alto e baixo grau (64% para IgM x 30% para IgG).

Embora não tenha havido uma diferença marcante entre a soropositividade de IgM contra HPV-16 em infecções transientes ou persistentes pelo HPV, notou-se que a soropositividade dessa imunoglobulina conferiu um risco levemente mais elevado para a detecção de infecções persistentes (cerca de 2) do que para infecções transientes (cerca de 1). Trata-se de um aparente paradoxo, pois demonstrou-se que as infecções persistentes por HPV são em sua maioria causadas por HPV de alto risco e associam-se fortemente com anticorpos da classe IgG, ao passo que os anticorpos da classe IgM associam-se fortemente com infecções por HPV de baixo risco, que raramente desenvolvem infecções persistentes. Uma explicação plausível para esse achado seria que a associação maior entre a detecção de IgM e infecções persistentes estaria evidenciando tanto a minoria de infecções persistentes, especificamente causada por tipos de HPV de baixo risco, quanto uma pequena proporção de infecções persistentes recentes causadas por HPV de alto risco, graças à capacidade de reagir cruzadamente que tem sido descrita para essa classe de anticorpos. Não há nada descrito em literatura que associe diretamente a soropositividade de classe IgM contra HPV-16 com infecções transientes ou persistentes. Devido a isso, a construção de uma analogia tornou-se necessária. O estudo de SASAGAWA *et al.* (1998) avaliou alguns indivíduos em termos de resposta sorológica deflagrada por infecções persistentes e transientes pelo HPV-16 através da detecção de anticorpos das classe IgA, pois esse mesmo grupo já havia

publicado que a resposta baseada em anticorpos da classe IgM era inespecífica (SASAGAWA *et al.*, 1996). Cerca de 80% dos indivíduos portadores de infecções persistentes eram continuamente positivos para a detecção de IgA por um período superior a uma ano, enquanto que somente 25% dos indivíduos portadores de infecções transientes eram soropositivos para IgA pelo mesmo período. Assim, esses autores consideraram que as respostas baseadas em IgA parecem ser induzidas mais cedo e mais continuamente do que as respostas baseadas em IgG.

Sabe-se que as imunoglobulinas da classe IgM podem substituir adequadamente as imunoglobulinas de classe IgA para produzir imunidade de mucosa em indivíduos com deficiência seletiva para IgA. Além disso, a IgA forma polímeros (dímeros ou trímeros) da mesma maneira que a IgM (pentâmeros), pois compartilham um domínio C terminal em sua cadeia pesada responsável pela polimerização, o que favorece a capacidade de ligação e aglutinação de antígenos dessas duas imunoglobulinas. Além disso, são muito similares, pois ambas são responsáveis pela “linha de frente” da resposta imunológica do organismo contra o antígeno exógeno, através de estratégias diferentes: enquanto a IgA evita, preferencialmente, o acesso de substâncias estranhas presentes nas mucosas ao sistema imunológico geral, a IgM destrói antígenos sistêmicos através de uma eficiente fixação do sistema complemento (GOODMAN, 1992; STROBER e JAMES, 1992). Assim, seria razoável inferir que os resultados obtidos para a detecção de IgA por SASAGAWA *et al.* (1998) poderiam estar refletindo o comportamento das respostas baseadas em IgM. E, se assim for, esses resultados seriam consistentes com os dados obtidos em nosso estudo.

A tentativa de encontrar uma correlação entre a soropositividade de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 e o grupo de indivíduos portadores de infecções primárias foi prejudicada pelo fato de que como as amostras séricas coletadas nos períodos intermediários ao início do estudo e após um ano de seguimento (referentes as coletas efetuadas após quatro e oito meses de seguimento) não foram testadas, o que pretendemos fazer brevemente. Assim, fizemos apenas uma estimativa da associação entre a soropositividade de IgM contra VLP de HPV-16 e uma proporção de prováveis infecções primárias ($RR=1,5$) que estaria incluída no grupo de mulheres não infectadas ao início do estudo e infectadas após um ano de seguimento.

Em relação à carga viral, observamos que há uma tendência da soropositividade de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 em associar-se mais fortemente a um baixo número de cópias do que a um alto número de cópias, associação esta que é perdida após um ano de seguimento. Entretanto, esses dados devem ser confirmados empregando um maior número de amostras. Ao contrário, a soropositividade de anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV não demonstrou grandes diferenças de associação com carga viral em nosso estudo. Esse dado discorda com os dados de VISCIDI *et al.* (1997), que relataram em seu estudo uma maior soroprevalência da soropositividade de IgG em indivíduos portadores de um alto número de cópias do HPV. Uma explicação plausível para essa discrepância poderia ser a metodologia utilizada para a detecção de carga viral que variou nos dois estudos, consistindo de uma PCR de baixa-estrangência em nosso estudo (CABALLERO *et al.*, 1995) e da detecção de intensidade de sinal com sondas específicas de oligonucleotídeos no de Viscidi *et al.*

Certamente, este último método é menos quantitativo e controlado do que o empregado por nós, mas novamente estes dados devem ser confirmados.

Existem evidências indicando que a detecção de um alto número de cópias de HPV em um esfregaço poderia prever a persistência da infecção pelo HPV em esfregaços subsequentes (HO *et al.*, 1995). Segundo o modelo que estamos propondo, a persistência das infecções pelo HPV por maior tempo na cérvix uterina deflagraria, por sua vez, uma resposta imune humoral eficiente, permitindo que houvesse a troca da produção dos anticorpos de classe IgM pela dos anticorpos de classe IgG no decorrer da resposta imune e explicando a maior soroprevalência de IgG dentre os indivíduos que são portadores de altas cargas virais (VISCIDI *et al.*, 1997). Ainda de acordo com HO *et al.* (1995), uma baixa carga viral indicaria a tendência a infecções transientes pelo HPV. Essas infecções são causadas, em sua grande maioria, por tipos de HPV de baixo risco, que já foram associados fortemente com a soropositividade de IgM (Tabelas 17 e 18). Assim, a associação da soropositividade de IgM contra HPV-16 com a detecção de um baixo número de cópias poderia estar indiretamente apontando para a presença de infecções transientes, possivelmente causadas por tipos de HPV de baixo risco, o que seria consistente com os dados encontrados em nosso estudo. De fato observamos uma associação crescente dos altos títulos de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 com a detecção de baixos números de cópias do DNA viral nos esfregaços cervicais ($p\text{ trend} = 0,02$) (Figura 4). A detecção de altos números de cópias do HPV, por outro lado, demonstra uma associação inversa, ou seja, quanto menores os títulos de anticorpos IgM contra HPV-16, maior a proporção de indivíduos portadores de altos

números de cópias (p trend = -0,02). Aliás, as tendências neste gráfico são idênticas às aquelas demonstradas para a associação de soropositividade de IgM e infecções por HPV de baixo e alto risco, o que contribuiria ainda mais para corroborar o modelo proposto.

A soropositividade de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 não foi associada a presença de lesões, seja em amostras coletadas ao início do estudo, seja em amostras coletadas após um ano de seguimento do estudo. Esse dado não surpreende, visto que os poucos estudos que analisaram o papel da presença de IgM em lesões precursoras e carcinomas cervicais induzidos pelo HPV não encontraram nenhuma associação dessa imunoglobulina com o desenvolvimento de lesões ou com lesões já estabelecidas (HEIM *et al.*, 1995; SASAGAWA *et al.*, 1996). A soropositividade de IgG contra VLP de HPV-16, por outro lado, confere um risco elevado para o posterior desenvolvimento de lesões cervicais HPV induzidas, como discutido anteriormente.

De maneira análoga aos estudos realizados para HPV, uma série de estudos imunohistoquímicos de patologia comparada analisaram tecidos provenientes de diferentes tumores em diversos animais como queratose actínica, carcinomas de células escamosas equinas (provenientes de regiões mucosas) e felinas (provenientes de regiões cutâneas) não associadas ao HPV. Nestes tumores, encontraram-se células plasmáticas secretoras de IgM escassamente representadas dentro dos infiltrados inflamatórios associados às lesões, não correlacionando-se com grau histológico ou com grau de invasão das lesões analisadas (PEREZ *et al.*, 1999a; PEREZ *et al.*, 1999b). Apesar do fato desses estudos terem sido feitos em lesões não induzidas pelo HPV, as lesões

analisadas são muito semelhantes àquelas causadas por esse vírus, implicando que poder-se-ia inferir que a IgM, ao contrário do que acontece com a IgG, não permaneceria representada durante todo o processo de progressão de lesões tumorais.

Deve ser salientado também que o processo de progressão das lesões HPV-induzidas é muito lento, levando cerca de 10 ou mais anos para que as lesões displásicas (SIL de baixo grau) evoluam até o carcinoma *in situ* (SIL de alto grau) e um tempo médio de outros 10 anos para que estes últimos, se não tratados, evoluam para o carcinoma cervical invasivo (ZUR HAUSEN, 1996b). Esse fato, associado aos nossos resultados e aos de outrém, permite que se infira que a ausência da detecção de IgM no desenvolvimento de lesões cervicais ou naquelas já estabelecidas é compatível com a noção de que essa imunoglobulina apresenta uma vida média curta e está presente apenas durante as primeiras semanas após o início das respostas imunes, sendo logo substituída pela IgG, o que impediria, de fato, a sua associação ao desenvolvimento de lesões HPV-induzidas. Assim, a soropositividade de IgM contra HPV-16 não parece ser um bom marcador para o desenvolvimento para a presença destas lesões.

Vale salientar que a ausência de significância estatística na maioria dos nossos dados para IgM pode ser um efeito circunstancial do número amostral testado. Após o teste de um maior número amostral essas análises deverão ser refeitas para confirmar e/ou descartar as tendências encontradas agora. Mesmo com ausência de significância estatística, os dados obtidos são relevantes na medida em que são absolutamente inéditos.

Anticorpos séricos da classe IgM contra HPV têm sido considerados como imunoglobulinas de difícil estudo, devido aos baixos títulos, o que levou diversos pesquisadores a relatarem a não detecção ou a baixa detecção dessa imunoglobulina em seus estudos soropidemiológicos para HPV (WANG *et al.*, 1996; VAN DOORNUM *et al.*, 1998; PETTER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000). Postulou-se, inclusive, que a detecção sérica de IgM contra HPV não demonstrava resultados confiáveis na demonstração de infecções mucosais recentes (VAN DOORNUM *et al.*, 1998). Devido a isso, existe uma tendência atual dos pesquisadores em substituir a detecção da IgM pela de IgA, porque essa classe de anticorpos seria mais facilmente detectada devido aos títulos séricos maiores. Wang *et al.* (2000), por exemplo, relataram que a IgA parece marcar infecções pelo HPV recentes ou ainda presentes de maneira mais eficiente do que a IgM. Seguindo por essa linha, BONTKES *et al.* (1999) demonstraram que as respostas baseadas em IgA sérica tendiam a correlacionar-se melhor com a eliminação do HPV do que a IgA local, embora não tenha sido avaliada a resposta baseada em IgM para comparação neste estudo. Apesar disso, em nosso estudo não só foi possível determinar a soropositividade de IgM contra HPV-16, como também encontramos duas tendências de associação dessa imunoglobulina muito interessantes, com os tipos de HPV de baixo risco e com a detecção de baixa carga viral nos esfregaços. Isto se deveu possivelmente por termos optado por normalizar os dados de absorbância bruta através das fórmulas NAR e NAD, diminuindo o impacto das variações intra e inter-ensaios na detecção dessa imunoglobulina como um todo. A maioria dos estudos que não foram capazes de detectar a IgM sérica através de ELISA utilizaram os valores brutos nas análises. O mais próximo de uma normalização a que esses estudos chegaram, foi a subtração dos valores

de absorbância bruta gerados por poços cobertos com VLP desnaturadas ou por poços sem o antígeno, efetuada em todos os valores de absorbância das amostras em teste, com o intuito de descontar eventuais reações inespecíficas. Além disso, é possível que outras diferenças entre o protocolo utilizado em nosso estudo e os protocolos destes outros estudos pudessem também ser responsáveis por essa disparidade de dados, além das diferenças inerentes às populações analisadas. Deve ser levado em conta, entretanto, que essas diferenças mínimas entre os protocolos utilizados aparentemente não surtiram efeito na detecção e análise de IgG sérica, possivelmente por ser esta uma imunoglobulina persistente e de títulos séricos mais elevados, visto que os nossos dados concordaram com aqueles previamente publicados.

Em virtude de tudo o que foi exposto aqui, ainda permanece a pergunta sobre a utilidade da análise de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16 no soros de pacientes assintomáticas. Serão necessários outros estudos para corroboração dos dados, mas a pesquisa de IgM no soros pode ser uma ferramenta importante na elucidação da história natural das infecções por tipos de HPV de baixo risco, mais frequentemente transitórias que, embora dificilmente evoluam para lesões mais severas, são extremamente comuns na população em geral.

Finalmente, a existência de um grande número de indivíduos infectados pelo HPV, apesar da baixa parcela (menos de 1%) que efetivamente desenvolvem o carcinoma cervical, não importando o quão antecipado seja o diagnóstico citológico das lesões HPV-induzidas, tem convencido as agências fomentadoras de pesquisa no mundo inteiro a investir recursos e a pesquisadores renomados a investir tempo e

conhecimentos no desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HPV. Estas vacinas seriam capazes de controlar a infecção pelo vírus nos seus estágios iniciais, visando impedir o posterior surgimento do carcinoma cervical. Além disso, o estudo de vacinas terapêuticas também tem sido aprofundado na tentativa de aumentar a resposta desempenhada pelo sistema imune das pacientes e auxiliar na erradicação de lesões já estabelecidas. Assim, é fundamental, e necessário, que se conheça em profundidade as respostas imunológicas dos indivíduos infectados, não só com o intuito de monitorar a eficácia destas vacinas, como auxiliar na proposição de alternativas imunoterapêuticas visando o controle dessa neoplasia.

6. - CONCLUSÕES

A normalização dos valores de absorbância bruta obtidos em ensaios do tipo ELISA, através das fórmulas NAR e NAD mostra-se mais adequada do que os valores brutos para analisar as associações entre soropositividade de anticorpos das classe IgG e IgM contra HPV-16 e a detecção do DNA de HPV, de lesões cervicais e de diversas variáveis epidemiológicas.

Quanto às reatividades sorológicas médias de anticorpos da classe IgG contra VLP de HPV-16:

1. são mais elevadas em mulheres infectadas por HPV de alto risco, de maneira persistente, e nas que apresentam lesões cervicais.
2. soropositividade em duas ocasiões durante o seguimento está fortemente associada à presença de DNA de HPV de alto risco.
3. soropositividade correlacionou-se com infecções persistentes pelo HPV e apresenta um risco mais elevado nos casos de soropositividade desses anticorpos em duas ocasiões.
4. pacientes soropositivas em duas ocasiões apresentam um risco três vezes maior de desenvolver lesões de alto grau.

Quanto às reatividades sorológicas médias de anticorpos da classe IgM contra VLP de HPV-16:

1. são mais elevadas em mulheres portadoras de infecções por tipos de HPV de baixo risco.
2. não há correlação entre soropositividade destes anticorpos e infecções persistentes.
3. soropositividade correlaciona-se com baixa carga viral.

As variáveis epidemiológicas que associam-se de maneira positiva com a detecção de anticorpos da classe IgG contra HPV-16 foram idade superior a 35 anos, detecção prévia de DST, número de parceiros sexuais superior a 2 (tanto durante a vida quanto nos últimos cinco anos) e número de gravidezes (4-6).

As variáveis epidemiológicas que associam-se de maneira negativa com a detecção de anticorpos da classe IgG contra HPV-16 foram escolaridade em nível primário, tabagismo, e idade ao primeiro coito superior a 18 anos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen P, Pedersen OF, Bach B, Bonde GJ. Serum antibodies and immunoglobulins in smokers and nonsmokers. **Clin Exp Immunol** 1982; 47:467-73.

Andersson-Ellström A, Dillner J, Hagmar B, Schiller JT, Sapp M, Forssman L, Milson. I. Comparison of development of serum antibodies to HPV-16 and HPV-33 and acquisition of cervical HPV DNA among sexually experienced and virginal girls: a longitudinal cohort study. **Sex Trans Dis** 1996; 23:234-8.

Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:2930-5.

Baay MFD, Duk JM, Groenier KH, Burger MPM, De Bruijin HWA, Hollema H, Stolz E, Herbrink P. Relation between HPV-16 serology and clinico-pathological data in cervical carcinoma patients: prognostic value of anti-E6 and/or anti-E7 antibodies. **Cancer Immunol Immunother** 1997; 44: 211-5.

Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. **Diag Mol Pathol** 1992; 6:131-52.

Bontkes HJ, De Gruijl TD, Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Scheper RJ, Meijer CJ. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II systemic but not local IGA responses correlate with clearance of HPV-16. **J Gen Virol** 1999; 80:409-7.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective: International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:796-802.

Bosch FX, De Sanjosé S, Castellsagué X, Muñoz N. Geographical and social patterns of cervical cancer incidence. In: Franco E, Monsonago J, editors. **New developments in cervical cancer screening and prevention**. Boston: Blackwell Science; 1997. p.23-33.

Brentani MM. Ciclo celular. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iveyasu H, Kowalski LP. editores. **Bases da oncologia**. São Paulo: Lemar; 1998. p.81-9.

Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, Gaitan E, Tenorio F, De Briton RC, Garcia M, Rawls WE. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. **Int J Cancer** 1989; 44:199-203.

Burk RD, Ho GYF, 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; 174:679-89.

Caballero OL, Villa LL, Simpson AJ. Low stringency PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. **Nucleic Acids Res** 1995; 23:192-3.

Candeias JMG, Franco EL, Villa LL, Schiller JT, Ferenczy A, Rohan TE. Serological reactivity to HPV-16 capsids antigens is predictive of persistent HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia. In: **Abstracts of the 16th International Papillomavirus Conference**; 1997. September, 5-11; Siena, Italy. Tipografia Senese; 1997.

Candeias JMG, Thomann P, Villa LL, Pintos J, Ferenczy A, Franco EL. Persistent HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia can be predicted by serology to HPV-16 capsid antigens. In: **Abstracts of the 17th International Papillomavirus Conference**; 1999. Jan 9-15; Charleston, SC, USA; 1999.

Candeias JMG. **Detecção de anticorpos contra HPV-16 em um estudo de história natural de infecções por papilomavírus humanos e sua relação com neoplasia cervical**. São Paulo; 1998 [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

Carrillo T, Rodriguez De Castro F, Cuevas M, Diaz F, Cabrera P. Effect of cigarette smoking on the humoral response in pigeon fanciers. **Allergy** 1991; 46:241-4.

Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. The natural history of human papillomavirus type 16 capsids antibodies among a cohort of university women. **J Infect Dis** 1996; 174:927-36.

Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju KS, Best JM. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. **J Med Virol** 1995; 47:209-18.

Castellsague X, Ghaffari A, Daniel RW, Bosch FX, Muñoz N, Shah KV. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. **J Infect Dis** 1997; 176:353-61.

Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. **Nature** 1982; 299:529-34.

Chen YH, Huang LH, Chen TM. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. **Biochem Biophys Res Commun** 1996; 224:651-9.

Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:5799-803.

Chua K, Wiklund F, Lenner P, Angström T, Hallmans G, Bergman F, Sapp M, Schiller JT, Wadell G, Hjerpe A, Dillner J. A prospective study on the risk of cervical intra-epithelial neoplasia among healthy subjects with serum antibodies to HPV compared with HPV DNA in cervical smears. **Int J Cancer** 1996; 68:54-9.

Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Hybrid capture II: a new sensitive test for human papillomavirus detection comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. **J Clin Pathol** 1998; 51:737-40.

De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Stukart MJ, Robbesom AAJP, Von Blomberg-Van Der Flier, BME, Herbrink P, Remmink AJ, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Scheper RJ. Analysis of IGG reactivity against human papillomavirus type-16 E7 in patients with cervical intraepithelial neoplasia indicates an association with clearance of viral infection: results of a prospective study. **Int J Cancer** 1996; 68:731-8.

De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Schiller JT, Stukart MJ, Groot BS, Chabaud MM, Remmink AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ. Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:630-8.

De Sanjose S, Hamsíková E, Muñoz N, Bosch FX, Hofmannová V, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Muñoz MT, Ascunce N, Tafur L, Shah KV, Vonka V. Serological response to HPV-16 in CIN-III and cervical cancer patients: case control studies in Spain and Colombia. **Int J Cancer** 1996; 66:70-4.

Dillner J, Wiklund F, Lenner P, Eklund C, Fredriksson-Shanazarian V, Schiller JT, Hibma M, Hallmans G, Stendahl U. Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer. **Int J Cancer** 1995; 60:377-82.

Dillner J, Kallings I, Brihmer C, Sikström B, Koskela P, Lehtinen M, Schiller JT, Sapp M, Mardh PA. Soropositivities to human papillomavirus types 16, 18 or 33 capsids and to chlamydia trachomatis are markers of sexual behavior. **J Infect Dis** 1996; 173:1394-8.

Dixon EP, Pahel GL, Rocque WJ, Barnes JA, Lobe DC, Hanlon MH, Alexander KA, Chao SF, Lindley K, Phelps WC. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. **Virology** 2000; 270:345-57.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJA, Gallimore PH. Identification of the human papillomavirus virus 1A E4 gene products. **Embo J** 1986; 5:355-62.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, Crawford L. Specific interaction between HPV16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature** 1991; 352:824-7.

Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. **J Gen Virol** 1985; 66:1515-22.

Durst M, Glitz D, Schneider A, Zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) gene expression and dna replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hibridization. **Virology** 1992; 189:132-40.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma product. **Science** 1989; 243:934-7.

Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus e1a and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. **J Virol** 1992; 66:6893-902.

Elfgren K, Bistoletti P, Dillner L, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Dillner J. Conization for cervical intraepithelial neoplasia is followed by disappearance of human papillomavirus deoxyribonucleic acid and a decline in serum and cervical mucus antibodies against human papillomavirus antigens. **Am J Obstet Gynecol** 1996; 174:937-42.

Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. **J Clin Pathol** 1994; 47:649-52.

Fisher SG, Benítez-Bribiesca L, Nindl I, Stockfleth E, Müller M, Wolf H, Perez-García F, Guzman-Gaona J, Gutierrez-Delgado F, Irwin W, Gissmann L. The association of human papillomavirus type 16 E6 and E7 antibodies with stage of cervical cancer. **Gynecol Oncol** 1996; 61:73-8.

Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **J Infect Dis** 1995; 172:756-63.

Franco EL. Epidemiology in the study of cancer. In: Bertino JR, editor. **Encyclopedia of cancer**. New York: Academic Press; 1997. p.621-41.

Franco EL, Villa LL, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. **Pan Am J Public Health** 1999a; 6:223-32.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, Rohan T. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **J Infect Dis** 1999b; 180:1415-23.

Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999c; 91:506-11.

Frazer IH. Immunology of papillomavirus infection. **Curr Opin Immunol** 1996; 8:484-91.

Galloway DA. Serological assays for the detection of hpv antibodies. In: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, editors. **The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus**. Lyon: Iarc, 1992, p.147-61.

Galloway DA. HPV serology: another update. In: Lacey C, editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. London. Leeds University Press; 1996. p.113-9.

Goodman JW. Função e estrutura das imunoglobulinas. In: Stites DP, Terr AI, editors. **Imunologia básica**. São Paulo: Prentice Hall do Brasil; 1992. p.83-94.

Hagensee ME, Carter JJ, Wipf GC, Galloway DA. Immunization of mice with HPV vaccinia virus recombinants generates serum IGG, IGM and mucosal IGA antibodies. **Virology** 1995; 206:174-82.

Hagensee ME, Galloway DA. Growing human papillomavirus and virus-like particles in the laboratory. In: Lacey C, editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. London: Leeds University Press; 1996. p.85-92.

Hagensee ME, Kiviat N, Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers J, Holte S, Galloway DA. Seroprevalence of human papillomavirus types 6 and 16 capsid antibodies in homosexual men. **J Infect Dis** 1997; 176:625-31.

Hagensee ME, Slavinsky J, Gaffga CM, Suros J, Kissinger P, Martin DH. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 in pregnant women. **Obstet Gynecol** 1999; 94:653-8.

Hagensee ME, Koutsky LA, Lee SK, Grubert T, Kuypers J, Kiviat NB, Galloway DA. Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. **J Infect Dis** 2000; 181:1234-9.

Hamsikova E, Smahel M, Sapp M, Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Vonka V. Correlation between the presence of anti HPV-33 VLP antibodies and HPV DNA in cervical neoplasia patients. **Arch Virol** 1997; 142:413-6.

Hamsikova E, Ludvikova V, Tachezy R, Kovarik J, Brouskova L, Vonka V. Longitudinal follow-up of antibody response to selected antigens of human papillomaviruses and herpesviruses in patients with cervical invasive carcinoma. **Int J Cancer**. 2000; 86:351-5.

Heim K, Christensen ND, Hoepfl R, Wartusch B, Pinzger G, Zeimet A, Baumgartner P, Kreider JW, Dapunt O. Serum IGG, IGM and IGA reactivity to human papillomavirus types 11 and 6 virus-like particles in different gynecologic patient groups. **J Infect Dis** 1995; 172:395-402.

Heino P, Eklund C, Fredriksson-Shanazarian V, Goldman S, Schiller JT, Dillner J. Association of serum immunoglobulin g antibodies against human papillomavirus type 16 capsids with anal epidermoid carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:437-40.

Herbst AL. The bethesda system for cervical/vaginal cytologic diagnosis. **Clin Obstet Gynecol** 1992; 35:22-7.

Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, Kurman RJ, Barnes W, Jones S, Tchabo JG, Brinton LA, Copeland C, Epp J, Mannos M. Determinants of genital human papillomavirus infection in low income women in washington dc. **Sex Trans Dis** 1993; 20:279-85.

Ho GYF, Burk RD, Fleming I, Klein RS. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. **Int J Cancer** 1994; 56:788-92.

Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1365-71.

Howley PM. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. **Fundamental virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.947-77.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Human papillomavirus**. Lyon: IARC; 1995. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 64).

Jeckell JF, Elmore JG, Katz DL. Describing variation in data. In: Jeckell JF, Elmore JG, Katz DL, editors. **Epidemiology, biostatistics and preventive medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996. p.121.

Kell B, Jewers RJ, Cason J, Pakarian F, Kaye JN, Best JM. Detection of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides. **J Gen Virol** 1994; 75:2451-6.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of P53 as a sequence-specific DNA binding protein. **Science** 1991; 252:1708-11.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assemble into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:12180-4.

Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Dürst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **J Virol** 1993; 67:6929-36.

Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:494-9.

Kjaer SK, Van Den Brule AJC, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, Walboomers JMM, Meijer CJLM. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1997; 6:799-805.

Krcmár M, Sucánková A, Kanka J, Vonka V. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex 2 virus. III. presence of herpes simplex type 2 antibody in sera of subjects who developed cervical neoplasia later in the study. **Int J Cancer** 1986; 38:161-5.

Kurman RJ, Solomon D. Epithelial Cell Abnormalities. In: Kurman RJ, Solomon, D. editors. **The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: definitions, criteria, and explanatory notes for terminology and specimen adequacy**. Nova Iorque: Springer-Verlag; 1994. P.30-6.

Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Sauer G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. **J Gen Virol** 1988; 69:187-96.

Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in escherichia coli: characterization of proteins domains involved in DNA binding and capsid assembly. **J Virol** 1997; 71:2988-95.

Lin D, Shields MT, Ulrich SJ, Appella E, Mercer WE. Growth arrest induced by wild type P53 proteins blocks cells prior to or near the restriction point in the late G1 phase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:9210-4.

Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild type P53. **Cell** 1992; 70:923-5.

Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of common anogenital types. **Obstet Gynecol** 1992; 79:328-37.

Lowe RS, Brown DR, Bryan JT, Cook JC, George HA, Hofmann KJ, Hurni WM, Joyce JG, Lehman ED, Markus HZ, Neeper MP, Schultz LD, Shaw AR, Jansen KU. Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. **J Infect Dis** 1997; 176:1141-5.

Maciag P, Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32:915-22.

Magalhães O. Verruga dos bovídeos. **Brasil-Medico** 1920; 34:430-1.

Marais D, Rose RC, Williamson AL. Age distribution of antibodies to human papillomavirus in children, women with cervical intraepithelial neoplasia and blood donors from South Africa. **J Med Virol** 1997; 51:126-31.

Marazzo JM, Koutsky LA, Stine KL, Kuypers JM, Grubert TA, Galloway DA, Kiviat NB, Handsfield HH. Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women. **J Infect Dis** 1998; 178:16604-9.

Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix II cytologic, colposcopic and histopathologic study. **Acta Cytol** 1977; 21:379-90.

Meurman O. Detection of antiviral igm antibodies and its problems: a review.
Curr Top Microbiol Immunol 1982; 104:101-31.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil-2000**. Rio de Janeiro: INCa; 2000.

Motulsky H. Correlation. In: Motulsky H. editor. **Intuitive biostatistics**. New York.: Oxford University Press; 1995. p.158.

Muñoz N, Kato I, Bosch FX, Eluf-Neto J, De San Jose S, Ascunce N, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Gonzalez LC, Tafur L, Walboomers JMM, Shah KV. risk factors for HPV DNA detection in middle-aged women. **Sex Trans Dis** 1996; 23:504-10.

Muñoz N, Bosch FX. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. **Bull Pan Am Health Organ** 1996; 30:362-77.

Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Shah KV, Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Viscidi R, Lowy DR, Schiller JT. Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-DNA- positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. **J Infect Dis** 1995; 172:19-24.

Nonnenmacher B, Kruger-Kjaer S, Svare EI, Scott JD, Hubbert NL, Van Den Brule AJC, Kirnbauer R, Walboomers JMM, Lowy DR, Schiller JT. Seroreactivity to HPV-16 virus-like particles as a marker for cervical cancer risk in high-risk populations. **Int J Cancer** 1996; 68:704-9.

Olsen AO, Dillner J, Gjoen K, Sauer T, Orstavik I, Magnus PA. Population-based case-control study of human papillomavirus-type-16 seropositivity and incident high-grade dysplasia of the uterine cervix. **Int J Cancer** 1996; 68:415-9.

Olsen AO, Dillner J, Gjoen K, Magnus P. Seropositivity against HPV-16 capsids: a better marker of past sexual behaviour than presence of HPV DNA. **Genitourin Med** 1997; 73:131-5.

Papanicolaou GN, Traut HF. **Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear**. New York: Commonwealth Fund; 1943.

Park JS, Park DC, Kim CJ, Ahn HK, Um SJ, Park SN, Kim SJ, Namkoong SE. HPV-16-related proteins as the serologic markers in cervical neoplasia. **Gynecol Oncol** 1998; 69:47-55.

Pater MM, Mittal R, Pater A. Role of hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. **Trends Microbiol** 1994; 2:229-34.

Perez J, Mozos E, Martin MP, Day MJ. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with equine squamous cell carcinoma. **J Comp Pathol** 1999a; 121:385-97.

Perez J, Day MJ, Martin MP, Gonzalez S, Mozos E. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). **Vet Immunol Immunopathol** 1999b; 69:33-46.

Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Köchel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kühnle H, Schedel I. Celular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. **Int J Cancer** 1994; 57:836-40.

Petter A, Heim K, Guger M, Ciresa-Ko Nig A, Christensen N, Sarcletti M, Wieland U, Pfister H, Zangerle R, Hopfl R. Specific serum IGG, IGM and IGA antibodies to human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 and 31 virus-like particles in human immunodeficiency virus-seropositive women. **J Gen Virol** 2000; 81:710-708.

Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. Functional and sequence similarities between HPV16 E7 and adenovirus E1A. **Curr Top Microbiol Immunol** 1989; 144:153-66.

Reagan JW, Harmonic MJ. The cellular pathology in carcinoma in situ: a citohistopathologic correlation. **Cancer** 1956; 9:385-402.

Rice PS, Cason J, Best JM, Banatvala JE. High risk genital papillomavirus infections are spread vertically. **Rev Med Virol** 1999; 9:15-21.

Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia: a review. **Pathol Annu** 1973; 8:302-28.

Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet Gynecol** 1990; 75:131-3.

Roden RBS, Hubbert NL, Kirnbauer R, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT. Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. **J Virol** 1996; 70:3298-301.

Roden RBS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. **J Infect Dis** 1997; 176:1076-9.

Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1992; 89:3159-63.

Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM, Rohan TE. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:469-76.

Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L, Tommasino M. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Virology** 1995; 206:126-35.

Sasagawa T, Inoue M, Lehtinen M, Zhang W, Gschmeissner SE, Nasser Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L. Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions. **Clin Diag Lab Immunol** 1996; 3:403-10.

Sasagawa T, Yamazaki H, Dong YZ, Satake S, Tateno M, Inoue M. Immunoglobulin-A and – G responses against virus like particles (VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intraepithelial lesions. **Int J Cancer** 1998; 75:529-35.

Scheffner M, Werness BA, Huibregste JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of P53. **Cell** 1990; 63:1129-36.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of P53. **Cell** 1993; 75:495-505.

Schiller JT, Roden RBS. Papillomavirus-like particles: basic and applied studies. In: Lacey C, editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. London: Leeds University Press; 1996. p.101-11.

Schwarz E, Durst M, Demankowski C, Latterman O, Wolfsperger E, Suhai S, Zur Hause H. Dna Sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6B. **Embo J** 1983; 2:2341-8.

Schwarz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, Zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature** 1985; 314:111-4.

Shah KV, Viscidi RP, Alberg AJ, Helzlsouer KJ, Comstock GW. Antibodies to human papillomavirus 16 and subsequent in situ or invasive cancer of the cervix. **Cancer Epidem Biom Prev** 1997; 6:233-7.

Shattner A. The origin of autoantibodies. **Immunol Lett** 1987; 14:143-53.

Shope RE. Infectious papillomatosis of rabbits. **J Exp Med** 1933; 58:607-27.

Stern PL. Immunity to human papillomavirus-associated cervical neoplasia. **Adv Cancer Res** 1996; 69:175-211.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of P53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature** 1998; 393:229-34.

Strickler HD, Hildesheim A, Viscidi RP, Shah KV, Goebel B, Drummond J, Waters D, Sun Y, Hubbert NL, Wacholder S, Brinton LA, Han C, Nasca PC, Mcclimens R, Turk K, Devairakkam V, Leitman S, Martin C, Schiller JT. Interlaboratory agreement among results of human papillomavirus type 16 enzyme-linked immunosorbent assays. **J Clin Microbiol** 1997; 35:1751-6.

Strickler HD, Kirk GD, Figueroa JP, Ward E, Braithwaite AR, Escoferry C, Drummond J, Goebel B, Waters D, Mcclimens R, Manns A. HPV-16 antibody prevalence in Jamaica and the united states reflects differences in cervical cancer rates. **Int J Cancer** 1999; 80:339-44.

Strober W, James SP. O sistema imune das mucosas. In: Stites DP, Terr AI, editors. **Imunologia básica**. São Paulo: Prentice Hall do Brasil; 1992. p.136-44.

Svare EI, Kjaer SK, Nonnenmacher B, Worm AM, Moi H, Christensen RB, Van Den Brule AJC, Walboomers JMM Meijer CJL, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. Seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus like particles is lower among high-risk men than in high-risk women. **J Infect Dis** 1997; 176:876-83.

Syrjänen KJ. Natural history of genital human papillomavirus infections. In: Lacey C, editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. London: Leeds University Press; 1996. p.189-206.

Van Doornum G, Prins M, Pronk L, Coutinho RA, Dillner J. A prospective study of antibody responses to defined epitopes of human papillomavirus (HPV) type 16 in relationship to genital and anorectal presence of HPV DNA. **Clin Diag Lab Immunol** 1994; 1:633-9.

Van Doornum G, Prins M, Andersson-Ellström A, Dillner J. Immunoglobulin A.G and M responses to L1 and L2 capsids of human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 and 33 L1 after newly acquired infection. **Sex Transm Inf** 1998; 74:354-60.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee On Taxonomy Of Virus**. Academic Press, 1999.

Viladiou P, Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, Escrivà JM, Hamsikova E, Hofmannová V, Guerrero E, Izquierdo A, Navarro C, Moreo P, Izarzugaza I, Ascunce N, Gili M, Muñoz MT, Tafur L, Shah KV, Vonka V. Human papillomavirus DNA and antibodies to human papillomaviruses 16 E2, L2 and E7 peptides as predictors of survival in patients with squamous cell cervical cancer. **J. Clin. Oncology** 1997; 15(2): 610-9.

Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. **Adv Cancer Res** 1997; 71:321-42.

Villa LL. Vírus e câncer. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iveyasu H, Kowalski LP, editores. **Bases da oncologia**. São Paulo: Lemar; 1998. p.71-80.

Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K, Shapiro S, Shah KV. Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in relation to cervical HPV infection among college women. **Clin Diag Lab Immunol** 1997; 4:122-6.

Vonka V, Hamsikova E, Kanka J, Ludvikova V, Sapp M, Smahel M. Prospective study on cervical neoplasia. IV: presence of HPV antibodies. **Int J Cancer** 1999; 80:365-8.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JÁ, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. Type-Specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cancer. **N Engl J Med** 1999; 341:1633-8.

Wang ZH, Hansson BG, Forslund O, Dillner L, Sapp M, Schiller JT, Bjerre B, Dillner J. Cervical mucus antibodies against human papillomavirus type 16, 18, and 33 capsids in relation to presence of viral DNA. **J Clin Microbiol** 1996; 34:3056-62.

Wang ZH, Konya J, Avall-Lundkvist E, Sapp M, Dillner J, Dillner L. Human papillomavirus antibody response among patients with incident cervical carcinoma. **J Med Virol** 1997; 52:436-40.

Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Eklund C, Knekt P, Lehtinen M, Kallings I, Lenner P, Hallmans G, Mählck CG, Wadell G, Schiller JT, Dillner J. Type Specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. **J Infect Dis** 2000; 181:456-62.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with P53. **Science** 1990; 248:76-9.

Wideroff L, Schiffman MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kirnbauer R, Greer CE, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG, Scott DR, Sherman ME, Buckland J, Lowy D, Schiller JT. Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA- positive and -negative women. **J Infect Dis** 1996; 174:937-43.

Wideroff L, Schiffman M, Haderer P, Armstrong A, Greer CE, Manos MM, Burk RD, Scott DR, Sherman ME, Schiller JT, Hoover RN, Tarone RE, Kirnbauer R. Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31 and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. **J Infect Dis** 1999; 180:1424-8.

Wikström A, Van Doornum GJJ, Kirnbauer R, Quint WGV, Dillner J. Prospective study on the development of antibodies against human papillomavirus type 6 among patients with condyloma acuminata or new asymptomatic infection. **J Med Virol** 1995; 46:3668-74.

Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson A, Frisch M, Sparén P, Pontén J, Gyllensten U, Melbye M, Adami H. Smoking and oral contraceptives as risks factors for cervical carcinoma in situ. **Int J Cancer** 1999; 81:357-65.

Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY, Frazer IH. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. **J Gen Virol** 1993; 74:763-8.

Zhou J, Frazer IH. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. in: Lacey C, editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. London: Leeds University Press; 1996. p. 93-100.

Zinkernagel RM, Kelly J. How antigens influences immunity. **Immunologist** 1997; 5:114-20.

Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr Top Microbiol Immunol** 1977; 78:1-30.

Zur Hausen H. Viruses in human tumors: reminiscences and perspectives. **Adv Cancer Res** 1996a; 68:1-22.

Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996b; 1288:55-78.

Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:690-8.

ANEXO 1 : TABELAS DE IgG

Tabela 26: Reatividade sorológica* média de amostras coletadas à admissão, segundo grupos de positividade para infecção por HPV de diferentes riscos de oncogenicidade durante um ano de seguimento.

Reatividade por grupo**					Significância***	
Fórmula	Diluição	Negativo (N=631)	Baixo risco (N=113)	Alto risco (N=182)	Global#	Tendência##
NAR	1:50	0,739	0,755	0,834	0,0978	0,0376
NAD	1:10	-0,193	-0,102	-0,055	<0,0001	<0,0001
	1:50	-0,073	-0,056	0,020	0,0006	0,0002

* Média geométrica segundo grupo e expressão da reatividade.

** Negativo: nenhum resultado positivo para DNA de HPV durante as visitas 1-4.

Baixo risco: pelo menos uma visita com positividade para DNA de HPV de baixo risco oncogênico, mas não de alto risco.

Alto risco: pelo menos uma visita com resultado positivo para DNA de HPV de alto risco oncogênico, tendo ou não positividade para DNA de HPV de baixo risco oncogênico na mesma ou em outras visitas.

*** valores de p para as comparações entre grupos.

pelo menos uma das médias era diferente das outras.

relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo e a magnitude das médias.

Tabela 27: Reatividade sorológica* média de amostras coletadas à admissão, segundo grupos de positividade para infecção transiente ou persistente pelo HPV durante um ano de seguimento.

Reatividade por grupo**					Significância***	
Diluição	Negativo (N=631)	Transiente (N=170)	Persistente 2+ (N=78)	Persistente 3+/4+(N=47)	Global#	Tendência##
1:50	0,739	0,727	0,938	0,889	0,0067	0,0053
1:10	-0,193	-0,124	0,015	0,019	<0,0001	<0,0001
1:50	-0,073	-0,057	0,059	0,054	0,0001	<0,0001

* Média geométrica segundo grupo e expressão da reatividade.

** Negativo: nenhum resultado positivo para DNA de HPV durante as visitas 1-4.

Transiente: menos que duas visitas positivas para o mesmo tipo de HPV.

Persistente2+: duas visitas positivas para o mesmo tipo de HPV.

Persistente3+/4+: pelo menos três visitas positivas para o mesmo tipo de HPV.

*** Valores de p para as comparações entre grupos.

Pelo menos uma das médias era diferente das outras.

Relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo e a magnitude das médias.

Tabela 28: Reatividade sorológica* média de amostras coletadas à admissão, segundo risco cumulativo de lesões cervicais durante um ano de seguimento.

Reatividade por grupo**						Significância***	
Fórmula	Diluição	Negativo (N=930)	ASCUS (N=42)	LSIL (N=84)	HSIL (N=29)	Global#	Tendência##
NAR	1:50	0,758	0,739	0,896	1,204	0,0004	0,0001
NAD	1:10	-0,167	-0,230	-0,044	0,088	0,0003	0,0002
	1:50	-0,058	-0,090	0,031	0,178	<0,0001	<0,0001

* Média geométrica segundo grupo e expressão da reatividade.

** Negativo: nenhum resultado de citologia anormal durante as visitas 1-4.

ASCUS: citologia atípica de significado indeterminado.

LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

*** Valores de p para as comparações entre grupos.

Pelo menos uma das médias era diferente das outras.

Relação dose-resposta entre a categorização ordinal de cada grupo e a magnitude das médias.

Tabela 29: Riscos relativos (RR) de lesão cervical (SIL), segundo a resposta sorológica ao início do estudo: lesões diagnosticadas durante um ano de seguimento.

Tipo de lesão	Fórmula	RR (IC 95%)*		
		Bruto	Ajustado por HPV	Ajustado por HPV e idade
LSIL e HSIL	NAD	2,21 (1,36-3,60)	1,90 (0,96-3,75)	1,88 (0,95-3,73)
HSIL	NAD	4,09 (1,85-9,03)	2,74 (1,11-6,75)	2,74 (1,10-6,82)

* Categoria de referência para o cálculo foi um grupo soronegativo. RR = 1,0.

Tabela 30: Riscos relativos (RR) de lesão cervical (SIL), diagnosticadas a partir do quarto mês até três anos do seguimento, segundo a resposta sorológica de amostras durante os dois períodos de coleta (à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo) na coorte.

Tipo de lesão	Fórmula	Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)		
			Bruto	Ajustado por HPV	Ajustado por HPV e idade
LSIL e HSIL	NAD	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
		1	1,07 (0,41-2,76)	0,77 (0,25-2,36)	0,77 (0,25-2,38)
		2	2,20 (1,18-4,11)	1,78 (0,75-4,24)	1,91 (0,80-4,60)
HSIL	NAD	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
		1	2,56 (0,55-1,85)	1,64 (0,33-8,14)	1,65 (0,33-8,22)
		2	4,72 (1,60-13,96)	3,13 (0,91-10,74)	3,16 (0,92-10,91)

* Número visitas com positividade sorológica para HPV.

Tabela 31: Riscos relativos (RR) de infecção por HPVs de alto e baixo risco de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo.

Definição de positividade		Diluição	Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)	
				Baixo risco	Alto risco
Percentil 75%	NAR	1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	2,38 (1,46-3,87)	1,16 (0,72-1,89)
			2	1,45 (0,85-2,50)	1,82 (1,21-2,75)
	NAD	1:10	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	2,15 (1,26-3,69)	1,46 (0,89-2,42)
			2	1,91 (1,16-3,14)	2,17 (1,46-3,24)
		1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	2,47 (1,52-4,01)	1,21 (0,75-1,95)
			2	1,49 (0,87-2,57)	1,86 (1,23-2,80)

* Número de visitas com positividade sorológica para HPV.

Tabela 32: Riscos relativos (RR) de infecção por HPVs de alto e baixo risco de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)	
				Baixo risco	Alto risco
Percentil 90%	NAR	1:10	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	2,19 (1,12-4,30)	2,75 (1,58-4,81)
			2	1,22 (0,55-2,68)	2,37 (1,36-4,13)
		1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,76 (0,93-3,34)	1,85 (1,07-3,21)
			2	0,96 (0,39-2,34)	2,35 (1,33-4,16)
	NAD	1:10	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	2,02 (0,95-4,28)	2,71 (1,48-4,99)
			2	0,95 (0,42-2,18)	1,93 (1,10-3,38)
		1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,66 (0,84-3,27)	1,55 (0,84-2,84)
			2	0,45 (0,14-1,48)	1,99 (1,11-3,55)

* Número de visitas com positividade sorológica para HPV

Tabela 33: Riscos relativos (RR) de infecção transiente ou persistente pelo HPV de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)	
				Transiente	Persistente
Percentil 75%	NAR	1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,55 (0,99-2,45)	1,70 (1,01-2,85)
			2	1,32 (0,83-2,09)	2,23 (1,40-3,56)
	NAD	1:10	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,52 (0,93-2,50)	2,06 (1,19-3,55)
			2	1,62 (1,05-2,49)	2,80 (1,78-4,39)
		1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,60 (1,02-2,51)	1,78 (1,06-2,97)
			2	1,35 (0,85-2,13)	2,29 (1,44-3,65)

* Número de visitas com positividade sorológica para HPV.

Tabela 34: Riscos relativos (RR) de infecção transiente ou persistente pelo HPV de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após quatro meses de seguimento do estudo

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Visitas soropositivas*	RR (IC 95%)	
				Transiente	Persistente
Percentil 90%	NAR	1:10	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	2,20 (1,22-3,97)	3,00 (1,62-5,58)
			2	1,04 (0,51-2,14)	3,18 (1,78-5,70)
		1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,56 (0,88-2,78)	2,19 (1,20-3,98)
			2	1,10 (0,54-2,28)	2,78 (1,50-5,15)
	NAD	1:10	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,94 (1,00-3,77)	3,17 (1,63-6,14)
			2	0,84 (0,40-1,77)	2,56 (1,42-4,64)
		1:50	0	1,00 (ref.)	1,00 (ref.)
			1	1,35 (0,71-2,54)	1,96 (1,03-3,73)
			2	0,83 (0,38-1,82)	2,11 (1,10-4,044)

* Número visitas com positividade sorológica para HPV.

Tabela 35: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis sociodemográficas e tabagismo e a reatividade sorológica anti-HPV-16 combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAD.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Idade (anos)	18-24 (211)	Referência		Referência	
	25-34 (440)	0,0218	0,5784	0,0342	0,3806
	35-44 (295)	0,0632	0,1350	0,0838	0,0460
	45-70 (106)	0,0824	0,1395	0,0994	0,0735
Raça	Branca (690)	Referência		Referência	
	Não Branca (362)	0,0197	0,5172	0,0176	0,5613
Escolaridade	Primário incompleto (253)	Referência		Referência	
	Primário (617)	-0,0734	0,0361	-0,0760	0,0313
	Ginásio (152)	-0,0857	0,0749	-0,0737	0,1320
	Colegial/Universidade (29)	-0,0896	0,3278	-0,0785	0,3878
Tabagismo	Nunca fumou (527)	Referência		Referência	
	Ainda fuma (357)	-0,0652	0,0421	-0,0847	0,0080
	Já fumou (168)	0,0430	0,2998	0,0364	0,3730

*valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (transformação de Student).

Tabela 36: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis de higiene e doenças sexualmente transmissíveis e a reatividade sorológica anti-HPV combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAD.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Coceira genital	Não (882)	Referência		Referência	
	Sim (170)	0,0244	0,5339	0,0239	0,5392
Desconforto vaginal	Não (662)	Referência		Referência	
	Sim (390)	-0,0153	0,6103	-0,0106	0,7214
Desconforto vaginal nos últimos 2 dias	Não (675)	Referência		Referência	
	Sim (377)	-0,0365	0,2254	-0,0341	0,2521
Ducha vaginal	Nunca/Ocasional(952)	Referência		Referência	
	Frequentemente (100)	0,0199	0,6858	0,0078	0,8741
Uso de absorvente higiênico	Não usa (925)	Referência		Referência	
	Usa (127)	0,0301	0,4981	0,0365	0,4090
Uso de absorvente higiênico não comercial	Não usa (628)	Referência		Referência	
	Usa (424)	0,0506	0,0857	0,0394	0,1936
DSTs	Não teve (819)	Referência		Referência	
	DST-HPV (53)	0,1567	0,0184	0,1428	0,0319
	Outras DST (177)	0,0343	0,3762	0,0275	0,4759

* valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (transformação de Student).

Tabela 37: Correlação bruta e ajustada entre diferentes variáveis de comportamento sexual e a reatividade sorológica anti-HPV combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAD.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Idade à 1ª relação	15 anos ou menos (280)	Referência		Referência	
	De 16 a 17 anos (291)	-0,0441	0,2580	-0,0433	0,2594
	De 18 a 19 anos (209)	-0,1327	0,0018	-0,1396	0,0010
	20 anos ou mais (272)	-0,1466	0,0002	-0,1758	<0,0001
Nº de parceiros durante a vida	1 (478)	Referência		Referência	
	2-3 (360)	0,1994	<0,0001	0,1886	<0,0001
	4-5 (132)	0,2369	<0,0001	0,2154	<0,0001
	6 ou + (86)	0,2709	<0,0001	0,2663	<0,0001
Nº de parceiros nos últimos 5 anos	0-1 (809)	Referência		Referência	
	2 ou + (242)	0,1227	0,0003	0,1070	0,0022
Nº de parceiros no último ano	0-1 (988)	Referência		Referência	
	2 ou + (55)	0,0686	0,2908	0,0584	0,3712
Coito anal	Nunca fez (648)	Referência		Referência	
	1 ou mais (404)	-0,0033	0,9120	-0,0004	0,9879
Sexo oral	Nunca fez (493)	Referência		Referência	
	1 ou mais (559)	-0,0144	0,6191	-0,0043	0,8823
Uso de preservativo	Nunca/Ocasional (1009)	Referência		Referência	
	Sempre (43)	0,0317	0,6641	0,0298	0,6806

* valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (transformação de Student).

Tabela 38: Correlação bruta e ajustada (pela infecção pelo HPV e idade) entre diferentes variáveis de saúde reprodutiva e a reatividade sorológica anti-HPV combinada nas visitas de admissão e primeiro retorno medida pela fórmula NAD.

Variável	Categorias(N)	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV e idade	
		Coeficiente	Valor de p*	Coeficiente	Valor de p*
Idade na menarca	Menos de 12 (234)	Referência		Referência	
	12-19 (816)	0,0136	0,6938	0,0105	0,7607
Gravidez	0-1 (161)	Referência		Referência	
	2-3 (469)	0,0329	0,4424	0,0355	0,4109
	4-6 (308)	0,1048	0,0217	0,0978	0,0391
	7 ou + (104)	0,1020	0,0841	0,0835	0,1855
Uso de pílula	Nunca usou (158)	Referência		Referência	
	Menos de 6 anos (593)	0,0456	0,2767	0,0453	0,2747
	6 ou mais anos (301)	0,0699	0,1288	0,0565	0,2215

* valor de p obtido representando a razão entre o coeficiente e seu erro padrão (transformação de Student).

ANEXO 2 : TABELAS DE IgM

Tabela 39: Riscos relativos (RR) da associação entre a presença de HPV de alto risco e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Risco	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	0,812 (0,354-1,861)	0,894 (0,384-2,082)
			Após 1 ano	0,922 (0,369-2,304)	0,813 (0,317-2,088)
	NAD	1:10	Admissão	0,787 (0,356-1,742)	0,798 (0,360-1,770)
			Após 1 ano	0,892 (0,369-2,151)	0,742 (0,296-1,860)
		1:50	Admissão	0,789 (0,344-1,806)	0,885 (0,380-2,063)
			Após 1 ano	1,106 (0,459-2,668)	0,987 (0,401-2,431)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 40: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de HPV de baixo risco e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Risco	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	1,776 (0,700-4,505)	1,691 (0,661-4,329)
			Após 1 ano	3,549 (0,713-17,661)	3,296 (0,655-16,576)
	NAD	1:10	Admissão	3,087(1,064-8,955)	3,006 (1,032-8,753)
			Após 1 ano	1,945 (0,468-8,078)	1,725 (0,406-7,329)
		1:50	Admissão	1,725 (0,681-4,372)	1,626 (0,636-1,093)
			Após 1 ano	3,549 (0,713-17,661)	3,270 (0,648-16,501)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 41: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de HPV de alto risco e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Risco	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	0,618 (0,225-1,692)	0,618 (0,225-1,693)
			Após 1 ano	0,859 (0,292-2,532)	0,814 (0,273-2,425)
		1:50	Admissão	0,640 (0,244-1,676)	0,750 (0,279-2,014)
			Após 1 ano	0,891 (0,302-2,629)	0,763 (0,248-2,349)
	NAD	1:10	Admissão	0,640 (0,245-1,672)	0,642 (0,245-1,679)
			Após 1 ano	0,750 (0,244-2,305)	0,551 (0,164-1,846)
		1:50	Admissão	0,627 (0,240-1,642)	0,737 (0,275-1,978)
			Após 1 ano	0,891 (0,302-2,629)	0,764 (0,248-2,348)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 42: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de HPV de baixo risco e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Risco	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	3,176 (0,962-10,489)	3,111 (0,937-10,331)
			Após 1 ano	1,964 (0,346-11,164)	1,612 (0,273-9,505)
		1:50	Admissão	2,701 (0,898-8,131)	2,536 (0,833-7,721)
			Após 1 ano	2,037 (0,358-11,586)	1,971 (0,343-11,328)
	NAD	1:10	Admissão	3,118 (0,944-10,300)	3,047 (0,917-10,122)
			Após 1 ano	2,498 (0,465-13,426)	2,122 (0,379-11,869)
		1:50	Admissão	2,243 (0,728-6,910)	1,932 (0,611-6,109)
			Após 1 ano	2,544 (0,473-13,680)	2,525 (0,467-13,647)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 43: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de HPV de alto risco e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Risco	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	0.400 (0,070-2.297)	0,402 (0,069-2,329)
			Após 1 ano	0.952 (0,172-5,284)	0,948 (0,169-5,302)
		1:50	Admissão	0,698 (0,106-4,607)	0,699 (0,106-4,610)
			Após 1 ano	2,100 (0,346-12,759)	1,605 (0,241-10,702)
	NAD	1:10	Admissão	0.317 (0,057-1.761)	0,317 (0,057-1,761)
			Após 1 ano	0,955 (0,123-7,408)	0,844 (0,104-6,849)
		1:50	Admissão	0,550 (0,091-3,334)	0,549 (0,090-3,333)
			Após 1 ano	1,500 (0,227-9,916)	0,916 (0,114-7,378)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 44: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de HPV de baixo risco e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR(IC95%)*	
				Baixo Risco	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	2,500 (0,435-14,355)	2,455 (0,424-14,214)
			Após 1 ano	0,952 (0,122-7,423)	0,773 (0,092-6,464)
		1:50	Admissão	5,237 (0,564-48,639)	4,371 (0,437-43,738)
			Após 1 ano	1,050 (0,135-8,184)	1,134 (0,141-9,113)
	NAD	1:10	Admissão	2,381 (0,414-13,707)	2,316 (0,398-13,467)
			Após 1 ano	0,955 (0,123-7,408)	0,784 (0,095-6,480)
		1:50	Admissão	6,596 (0,730-59,622)	5,819 (0,621-54,505)
			Após 1 ano	1,000 (0,129-7,777)	1,085 (0,134-8,779)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 45: Riscos relativos (RR) da associação de detecção transiente do HPV e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Transiente	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	1,136(0,532-2,423)	1,123(0,525-2,400)
			Após 1 ano	0,933(0,413-2,110)	0,922(0,407-2,089)
	NAD	1:10	Admissão	1,530(0,689-3,400)	1,527(0,687-3,394)
			Após 1 ano	0,965(0,440-2,117)	0,935(0,423-2,063)
		1:50	Admissão	1,097(0,514-2,340)	1,081(0,505-2,312)
			Após 1 ano	1,018(0,455-2,227)	0,995(0,443-2,238)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV. RR = 1,0.

Tabela 46: Riscos relativos (RR) da associação de detecção persistente do HPV e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)	
				Persistente	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	2,145(0,378-12,181)	2,111(0,371-12,017)
			Após 1 ano	2,498(0,466-13,407)	2,497(0,465-13,417)
	NAD	1:10	Admissão	3,868(0,772-19,388)	3,827(0,757-19,362)
			Após 1 ano	1,930(0,460-8,100)	1,837(0,431-7,827)
		1:50	Admissão	2,071(0,365-11,760)	2,014(0,353-11,483)
			Após 1 ano	2,543(0,474-13,651)	2,545(0,473-13,699)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 47: Riscos relativos (RR) da associação de detecção transiente do HPV e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Transiente	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	1,709 (0,696-4,199)	1,705 (0,692-4,196)
			Após 1 ano	0,911 (0,357-2,325)	0,868 (0,337-2,239)
		1:50	Admissão	1,351 (0,580-3,146)	1,337 (0,571-3,130)
			Após 1 ano	1,136 (0,421-3,064)	1,104 (0,407-2,993)
	NAD	1:10	Admissão	1,596 (0,660-3,859)	1,598 (0,661-3,866)
			Após 1 ano	0,953 (0,385-2,362)	0,899 (0,357-2,260)
		1:50	Admissão	1,156 (0,486-2,749)	1,106 (0,461-2,656)
			Após 1 ano	1,279 (0,482-3,391)	1,257 (0,473-3,345)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV. RR = 1,0.

Tabela 48: Riscos relativos (RR) da associação de detecção persistente do HPV e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Persistente	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	2,279 (0,200-26,017)	2,094 (0,171-25,688)
			Após 1 ano	1,367 (0,217-8,593)	1,260 (0,196-8,098)
		1:50	Admissão	2,195 (0,192-25,117)	2,213 (0,191-25,609)
			Após 1 ano	1,023 (0,138-7,584)	1,044 (0,140-7,769)
	NAD	1:10	Admissão	2,341 (0,205-26,762)	2,197 (0,179-27,031)
			Após 1 ano	1,430 (0,227-9,002)	1,316 (0,203-8,520)
		1:50	Admissão	2,146 (0,187-24,569)	2,157 (0,187-24,898)
			Após 1 ano	1,570 (0,250-9,858)	1,597 (0,253-10,065)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV. RR = 1,0.

Tabela 49: Riscos relativos (RR) da associação de detecção transiente do HPV e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Transiente	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	1,417 (0,340-5,910)	1,495 (0,345-6,476)
			Após 1 ano	0,625 (0,120-3,242)	0,533 (0,096-2,964)
		1:50	Admissão	2,969 (0,506-17,421)	3,529 (0,503-24,760)
			Após 1 ano	0,625 (0,147-2,659)	0,510 (0,110-2,365)
	NAD	1:10	Admissão	1,133 (0,291-4,413)	1,145 (0,289-4,536)
			Após 1 ano	0,889 (0,190-4,150)	0,805 (0,166-3,894)
		1:50	Admissão	3,167 (0,537-18,667)	3,401 (0,485-23,853)
			Após 1 ano	0,471 (0,114-1,942)	0,354 (0,076-1,653)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 50: Riscos relativos (RR) da associação de detecção persistente do HPV e de IgM contra HPV-16 de acordo com a definição de resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Persistente	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	0,944 (0,055-16,327)	0,886 (0,049-16,132)
			Após 1 ano	0,001 (0,000-∞)	0,000 (0,000-∞)
		1:50	Admissão	1593,306 (0,000-∞)	6195,978 (0,000-∞)
			Após 1 ano	1257,873 (0,000-∞)	11172,565 (0,000-∞)
	NAD	1:10	Admissão	0,944 (0,055-16,327)	0,880 (0,048-16,077)
			Após 1 ano	N.C.	N.C.
		1:50	Admissão	1699,526 (0,000-∞)	9398,937 (0,000-∞)
			Após 1 ano	1104,955 (0,000-∞)	11516,559 (0,000-∞)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.
N.C.: Valores não calculáveis.

Tabela 51: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de alta carga viral dos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	0,338 (0,104-1,100)	0,350 (0,107-1,140)
			Após 1 ano	1,521 (0,412-5,616)	1,586 (0,427-5,892)
	NAD	1:10	Admissão	0,720 (0,260-1,997)	0,733 (0,263-2,046)
			Após 1 ano	0,778 (0,201-3,016)	0,728 (0,185-2,871)
		1:50	Admissão	0,329 (0,101-1,068)	0,344 (0,105-1,124)
			Após 1 ano	2,028 (0,585-7,031)	2,120 (0,606-7,413)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 52: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de baixa carga viral dos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	1,775 (0,811-3,886)	1,955 (0,874-4,369)
			Após 1 ano	1,239 (0,484-3,170)	1,048 (0,393-2,790)
	NAD	1:10	Admissão	1,582 (0,731-3,424)	1,575 (0,725-3,421)
			Após 1 ano	1,149 (0,483-2,735)	0,933 (0,375-2,317)
		1:50	Admissão	1,725 (0,789-3,773)	1,911 (0,854-4,275)
			Após 1 ano	1,239 (0,484-3,170)	1,023 (0,384-2,725)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 53: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de alta carga viral dos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	0,405 (0,102-1,610)	0,402 (0,101-1,601)
			Após 1 ano	0,982 (0,190-5,078)	1,053 (0,200-5,547)
		1:50	Admissão	0,471 (0,136-1,628)	0,478 (0,138-1,658)
			Após 1 ano	2,544 (0,473-13,680)	2,780 (0,510-15,168)
	NAD	1:10	Admissão	0,471 (0,136-1,628)	0,464 (0,134-1,607)
			Após 1 ano	1,000 (0,193-5,173)	1,083 (0,205-5,726)
		1:50	Admissão	0,462 (0,134-1,595)	0,470 (0,136-1,630)
			Após 1 ano	2,544 (0,473-13,680)	2,120 (0,606-7,413)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 54: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de baixa carga viral dos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	1,917 (0,779-4,721)	1,910 (0,775-4,707)
			Após 1 ano	0,982 (0,344-2,802)	0,858 (0,290-2,538)
		1:50	Admissão	1,590 (0,654-3,866)	1,855 (0,736-4,677)
			Após 1 ano	0,764 (0,248-2,349)	0,610 (0,184-2,025)
	NAD	1:10	Admissão	1,882 (0,764-4,638)	1,868 (0,757-4,610)
			Após 1 ano	1,000 (0,350-2,854)	0,694 (0,222-2,169)
		1:50	Admissão	1,351 (0,544-3,355)	1,522 (0,590-3,929)
			Após 1 ano	0,891 (0,302-2,629)	0,757 (0,243-2,361)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 55: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de alta carga viral dos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	0,500 (0,083-3,031)	0,503 (0,080-3,150)
			Após 1 ano	1,429 (0,216-9,467)	1,537 (0,225-10,499)
		1:50	Admissão	0,548 (0,046-6,489)	0,553 (0,047-6,582)
			Após 1 ano	2,100 (0,176-25,006)	3,136 (0,230-42,780)
	NAD	1:10	Admissão	0,381 (0,066-2,194)	0,380 (0,065-2,207)
			Após 1 ano	1,909 (0,161-22,653)	1,730 (0,139-21,567)
		1:50	Admissão	0,367 (0,035-3,817)	0,380 (0,065-2,207)
			Após 1 ano	1,000 (0,059-17,065)	1,730 (0,139-21,567)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 56: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de baixa carga viral dos esfregaços cervicais e IgM contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	1,667 (0,352-7,883)	1,651 (0,348-7,832)
			Após 1 ano	0,476 (0,078-2,894)	0,393 (0,057-2,689)
		1:50	Admissão	1,825 (0,388-8,590)	1,708 (0,356-8,192)
			Após 1 ano	1,050 (0,231-4,778)	0,758 (0,147-3,914)
	NAD	1:10	Admissão	1,587 (0,335-7,530)	1,564 (0,328-7,456)
			Após 1 ano	0,477 (0,079-2,886)	0,399 (0,059-2,689)
		1:50	Admissão	1,833 (0,387-8,674)	1,658 (0,340-8,094)
			Após 1 ano	1,000 (0,220-4,536)	0,701 (0,135-3,636)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 57: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de alta carga viral dos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	1,156 (0,402-3,328)	1,271 (0,436-3,709)
	NAD	1:10	Admissão	1,143 (0,397-3,290)	1,210 (0,417-3,515)
		1:50		1,000 (0,359-2,786)	1,088 (0,386-3,069)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV. RR = 1,0.

Tabela 58: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de baixa carga viral dos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão ao estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 66%	NAR	1:50	Admissão	1,070 (0,521-2,196)	1,025 (0,497-2,115)
	NAD	1:10	Admissão	1,286 (0,629-2,630)	1,266 (0,618-2,594)
		1:50		1,000 (0,491-2,038)	0,958 (0,468-1,963)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 59: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de alta carga viral dos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão ao estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	1,269 (0,326-4,934)	1,452 (0,366-5,758)
		1:50		1,466 (0,442-4,861)	1,598 (0,477-5,354)
	NAD	1:10	Admissão	0,681 (0,205-2,260)	0,743 (0,221-2,496)
		1:50		1,000 (0,331-3,017)	1,088 (0,356-3,323)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.

Tabela 60: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de baixa carga viral dos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão ao estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 75%	NAR	1:10	Admissão	1,673 (0,736-3,801)	1,594 (0,697-3,644)
		1:50		1,019 (0,463-2,240)	0,970 (0,439-2,147)
	NAD	1:10	Admissão	1,644 (0,723-3,738)	1,594 (0,699-3,637)
		1:50		1,000 (0,454-2,201)	0,947 (0,427-2,098)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV. RR = 1,0.

Tabela 61: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de alta carga viral dos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão ao estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Alto Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	5867,269 (0,000-∞)	20771,857 (0,000-∞)
		1:50		2,160 (0,184-25,315)	3,207 (0,235-43,721)
	NAD	1:10	Admissão	0,213 (0,022-2,042)	0,244 (0,025-2,395)
		1:50		0,333 (0,032-3,426)	0,314 (0,030-3,291)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV. RR = 1,0.

Tabela 62: Riscos relativos (RR) da associação de detecção de baixa carga viral dos esfregaços cervicais e IgG contra HPV-16 de acordo com a definição da resposta sorológica em amostras coletadas à admissão ao estudo.

Definição de positividade	Fórmula	Diluição	Período	RR (IC95%)*	
				Baixo Número de Cópias	
				Bruta	Ajustada por Idade
Percentil 90%	NAR	1:10	Admissão	1,045 (0,266-4,116)	1,099 (0,271-4,461)
		1:50		1,364 (0,324-5,735)	1,272 (0,295-5,474)
	NAD	1:10	Admissão	1,200 (0,319-4,518)	1,110 (0,289-4,264)
		1:50		1,984 (0,423-9,296)	1,874 (0,394-8,907)

* Categoria de referência para o cálculo foi o grupo negativo para infecção pelo HPV, RR = 1,0.