



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Flora Vaginal e Neoplasia Intra-epitelial do Colo do Útero

**Sarah Catarina Rodrigues Cardoso**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professor Doutor José Alberto Moutinho

**Covilhã, Junho de 2011**



# Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram, ao longo da minha vida. Que me transmitiram valores importantes e me ensinaram a ser justa, humilde e a dedicar-me de corpo e alma na conquista dos meus sonhos.

A todos os que me inspiraram e me apoiaram nos momentos bons e nos maus, por nunca terem desistido de mim.

Aos doentes e médicos que me transmitiram conhecimentos, mas, também, que me ajudaram a compreender melhor o mundo da Medicina e o significado da palavra “curar”...



# Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos às pessoas que, de diversas formas, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, o Professor Doutor José Alberto Fonseca Moutinho, pela sua ajuda, apoio, disponibilidade e paciência em todos os passos da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Sara Morgado Nunes pela sua colaboração e disponibilidade na realização da parte estatística.

À Dr<sup>a</sup> Rosa Saraiva, responsável pelo Departamento de Investigação do CHCB, pela orientação dada, em relação aos protocolos e formalidades hospitalares e, também, na aquisição de artigos científicos usados para apoio teórico.

Aos meus pais, por todo o carinho e pelos valores que me transmitiram, ao longo de 23 anos de vida. Agradeço-vos por me terem permitido e incentivado a seguir o caminho do coração.

Ao Tiago, pelo amor, apoio e gargalhadas que me proporcionas. Consegues animar todos os meus dias e fazer-me sorrir. Espero ser a tua “sininho” para sempre.

Aos meus avós, meus segundos pais, que me criaram com muito amor e para os quais sempre serei a “menina”.

A minha Xana, grande amiga que estará para sempre no meu coração. Graças a ti ultrapassei momentos muito difíceis e, sem ti, a permanência nesta cidade tornou-se mais triste. Obrigado por tudo.

Agradeço, também, a alguns amigos, que conheci nestes 6 anos, com os quais vivi momentos divertidos.



## Resumo

**Introdução:** O Cancro do Colo do Útero é o 2º cancro mais frequente, no sexo feminino (nos grupos etários dos 40-50 anos), e representa, aproximadamente, 10% de todas as neoplasias nas mulheres. A nível nacional, atinge 13 a 14 mulheres por cada 100 000, com cerca de 1 000 novos casos anuais e é responsável pela morte de, aproximadamente, 350 mulheres/ano. A persistência da infecção pelo HPV de alto risco constitui o principal factor epidemiológico para o cancro do colo do útero, no entanto, apenas um pequeno número de mulheres infectadas desenvolve a doença. A infecção do colo uterino, por este tipo de vírus, constitui um factor necessário, mas não suficiente para a sua carcinogénese. É necessária a acção de co-factores para o desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial e do carcinoma invasivo.

**Objectivo:** Através da avaliação de características das mulheres e de factores de risco associados, determinar a influência da flora vaginal no desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial do colo do útero.

**Material e Métodos:** Avaliaram-se, retrospectivamente, os processos clínicos de todas as doentes referenciadas à Unidade de Patologia Cervical do Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do CHCB, Covilhã, por alteração citológica do colo do útero sugestiva de Inflamação, ASC-US e LSIL, de 01 de Janeiro a 31/12/2010. Para análise, foram excluídas mulheres grávidas, na menopausa e com sinais clínicos de infecção vulvo-vaginal. Foram seleccionados 62 processos clínicos, nos quais foi avaliada a idade da menarca, idade das primeiras relações sexuais, o número de parceiros sexuais, os métodos contraceptivos utilizados, à data da consulta, o número de gestações, o resultado da citologia do colo do útero colhida no Centro de Saúde, a impressão colposcópica, o resultado da biópsia, a análise microbiológica do exsudado vaginal e o tratamento realizado no CHCB.

Utilizou-se SPSS versão 17.0.

**Resultados:** A amostra era constituída por 62 mulheres, com idades compreendidas entre 19 e 52 anos (média = 35,89; desvio padrão=8,361). A idade mínima da menarca foi 9 e a máxima 17 anos (média=12,84; desvio padrão=1,652). Relativamente às citologias realizadas, no Centro de Saúde, 77,4% tinham resultado de ASC-US/LSIL e 22,6% inflamatório. A maioria das mulheres era assintomática (75,8% vs 24,2%). A idade da PRS mais frequentemente relatada foi 18 anos, seguindo-se os 19 anos e, em relação ao número de parceiros sexuais, 43,5% tiveram um parceiro e 56,5% mais do que um. Como método anticoncepcional, 74,2% das mulheres usavam estroprogestativo e 25,8% usavam um método não-hormonal. Na amostra analisada 22,6% das mulheres não tinham filhos, enquanto 77,4% tinham. Quanto ao consumo de tabaco, 67,7% das mulheres negaram ter hábitos tabágicos. Na colposcopia, 6,5% das mulheres apresentavam LAG e 93,5% apresentavam LBG e, na biópsia,

74% apresentavam diagnóstico histológico de CIN 1 e 26% sem displasia. O HPV estava presente em 58,1% das amostras e ausente em 41,9%.

**Conclusão:** no presente estudo, 21% das doentes foram referenciadas por resultado citológico de Inflamação, 53,2% por LSIL e 25,8% por ASC-US. Microbiologicamente, em 16,1% de todas as doentes foram encontrados muitos Lactobacilos, em 27,4% alguns, 17,7% raros e 38,7 ausentes, o que nos sugere que o resultado do estudo histológico pode ser influenciado pelo estado da flora vaginal. Encontraram-se associações entre o diagnóstico histológico de CIN 1 e algumas variáveis estudadas.

## Palavras chave

Neoplasia do colo do útero, CIN 1, flora vaginal, *Lactobacillus sp.*, co-factores etiopatogénicos



## Abstract

**Introduction:** Cervical Cancer is the 2nd most common cancer in females (in age groups of 40-50 years-old) and represents approximately 10% of all cancers in women. In this country, it affects 13 to 14 women per 100,000 with about 1000 new cases annually and is responsible for approximately 350 deaths per year. Persistent infection with high risk HPV is the major epidemiological factor for cervical cancer, however only a small number of infected women develop the disease. . The infection of the cervix by this type of virus is a necessary factor, but not sufficient for its carcinogenicity. The influence of co-factors is necessary for the development of intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma.

**Objective:** Through the evaluation of characteristics of women and associated risk factors, determine the influence of vaginal flora in the development of cervical intraepithelial cancer.

**Methods:** Retrospectively, we assessed the clinical files of all patients referred to the Cervical Pathology Unit of the Department of Obstetrics and Gynecology in CHCB, Covilhã, by altered cervical cytology suggestive of inflammation, ASC-US and LSIL, from January 1<sup>st</sup> 2010 to 31/12/2010. For analysis, we excluded pregnant women, in menopause and with clinical signs of vulvo-vaginal infection. We selected 62 clinical cases in which we revised the age at menarche, age of first intercourse, number of sexual partners, type of contraceptive method used at the time of consultation, number of pregnancies, the results of cervical cytology harvested at the Center for Health, the colposcopic impression, the biopsy results, the microbiological analysis of the vaginal swab and the treatment performed in CHCB. It was used SPSS version 17.0.

**Results:** The sample included 62 women, aged between 19 and 52 years (mean = 35,89; SD = 8,361). The minimum age at menarche was 9 and the maximum 17 years (mean = 12,84; SD = 1,652). Regarding the results of cytology performed at the Health Center, 77.4% were the result of ASC-US/LSIL and 22.6% inflammatory. Most women were asymptomatic (75,8% vs 24,2%). The age of the first intercourse most frequently reported was 18 years, followed by 19 years, and concerning the number of sexual partners, 43,5% had one partner and 56,5% had more than one. As contraceptive methods, 74,2% of women used hormonal (estrogen and progesterone) and 25,8% used a non-hormonal method. In the sample 22,6% of women had no children, while 77,4% had. As for tobacco, 67,7% of women denied smoking. At colposcopy, 6,5% of women had High Grade Lesions and 93,5% had Low Grade Lesions. At biopsy, 74% had CIN 1 and 26% without dysplasia. HPV was present in 58,1% of samples and absent in 41,9%.

**Conclusion:** In this study, 21% of patients were referred because cytological results of inflammation, 53,2% for LSIL and 25,8% for ASC-US. Microbiologically, in 16,1% of all patients were found many Lactobacilli, some in 27.4%, rare in 17.7% and absent in 38,7%, which suggests that the result of histological study may be influenced by the conditions of the vaginal flora. Associations were found between the histological diagnosis of CIN 1 and some of the variables that were analysed.

## Keywords

Cervical cancer, CIN 1, vaginal flora, *Lactobacillus sp.*, etiopathogenic cofactors.



# Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos .....	v
Resumo + Palavras chave .....	vii
Abstract + Keywords.....	x
Índice.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xix
Introdução.....	1
Objectivos.....	5
Metodologia.....	6
Resultados.....	8
Discussão .....	22
Conclusão.....	30
Bibliografia.....	33



# Lista de Figuras

## Figuras

Figura 1 - Diferentes nomenclaturas nas lesões malignas do colo uterino .....	4
---	---

## Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das idades da amostra.....	8
Gráfico 2 - Distribuição das idades da menarca da amostra estudada .....	8
Gráfico 3 - Distribuição da idade da primeira relação sexual.....	10
Gráfico 4 - Frequência dos resultados das biópsias na amostra .....	11
Gráfico 5 - Distribuição do número de parceiros sexuais consoante a idade da menarca .....	14
Gráfico 6 - Hábitos tabágicos e diagnósticos de biópsias, nas mulheres com flora vaginal com Lactobacillus sp. ausentes .....	20
Gráfico 7 - Hábitos tabágicos e diagnósticos de biópsias, nas mulheres com flora vaginal com Lactobacillus sp. presentes .....	20



# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sistema Bethesda para a classificação das alterações citológicas .....	3
Tabela 2 - Caracterização dos resultados da citologia .....	9
Tabela 3 - Apresentação da sintomatologia das mulheres estudadas. ....	9
Tabela 4 - Distribuição do número de parceiros sexuais da amostra .....	10
Tabela 5 - Resultados dos hábitos tabágicos.....	10
Tabela 6 - Resultados da análise microbiológica aos <i>Lactobacillus sp.</i> da flora vaginal .....	11
Tabela 7 - Apresentação dos resultados da biópsia pelos diversos intervalos de idades.....	12
Tabela 8 - Representação da idade da primeira relação sexual das mulheres estudadas e dos respectivos resultados na biópsia do colo do útero .....	12
Tabela 9 - Distribuição do número de parceiros sexuais e dos resultados da biópsia .....	13
Tabela 10 - Representação do tipo de método anticoncepcional utilizado pelas mulheres avaliadas .....	13
Tabela 11 - Apresentação da distribuição do número de parceiros sexuais consoante a idade da PRS .....	14
Tabela 12 - Apresentação da distribuição do método anticoncepcional utilizado (estrogenético/outro) consoante a idade da PRS .....	15
Tabela 13 - resultados obtidos para as variáveis biópsia e idade, em função método anticoncepcional usado (estrogenético/outro).....	15
Tabela 14 - Representação da infecção por HPV na amostra .....	16
Tabela 15 - Apresentação dos hábitos tabágicos e as lesões CIN na amostra .....	16
Tabela 16 - Apresentação dos resultados obtidos na análise microbiológica .....	17
Tabela 17 - Resultados obtidos para as variáveis biópsia e menarca, em função da presença ou ausência de <i>Lactobacillus sp.</i> ....	17
Tabela 18 - Resultados obtidos para as variáveis biópsia e PRS, em função da presença ou ausência de <i>Lactobacillus sp.</i> .....	18
Tabela 19 - Resultados obtidos para as variáveis diagnóstico por biópsia e método contraceptivo, em função da presença ou ausência de <i>Lactobacillus sp.</i> .....	18
Tabela 20 - Resultados obtidos para as variáveis biópsia e infecção por HPV, em função da presença ou ausência de <i>Lactobacillus sp.</i> .....	19



# Lista de Abreviaturas

- AchCV - Anticorpo Anti-virus Hepatite C
- AgHbs - Antígeno de Superfície da Hepatite B
- ASC - Células Escamosas Atípicas
- ASC-US - Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
- ASC-H- Não pode ser excluída HSIL
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- AGC - Células Glandulares Atípicas
- AIS - Adenocarcinoma *in situ* endocervical
- CHCB - Centro Hospitalar Cova da Beira
- CIN - Neoplasia Intra-epitelial Cervical
- CIS - Carcinoma *in situ*
- HIV - Human Immunodeficiency Virus
- HLA - Human Leukocyte Antigen
- HPV - Human Papillomavirus
- HSIL - Lesão pavimentosa intra-epitelial de alto grau
- LAG - Lesão de alto grau
- LBG - Lesão de baixo grau
- LSIL - Lesão pavimentosa intra-epitelial de baixo grau
- PRS - Primeira relação sexual
- SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida



# Introdução

No saber científico não há certezas absolutas.

O desejo de compreender melhor o que rodeia o Homem levou a grandes avanços e descobertas em áreas diversas, como a Medicina, a Antropologia, a Astronomia, Biologia, entre outras.

A Medicina é, simultaneamente, uma ciência e uma arte, consegue conjugar o saber exacto com a habilidade do médico. Tem como objectivos manter e restaurar a saúde, utilizando técnicas de prevenção e tratamento.

Há teorias e investigações na procura constante de respostas e de soluções para as patologias que afectam a sociedade actual. Um foco importante, na compreensão e tratamento, é o conhecimento da etiologia das doenças, muitas vezes multifactorial. A identificação dos factores etiológicos principais e dos factores de risco ou predisponentes permite desenvolver estratégias para prevenir ou retardar o desenvolvimento e progressão de diversas patologias.

A nível mundial, o Cancro do Colo do Útero é o 2º cancro mais frequente no sexo feminino e representa, aproximadamente, 10% de todas as neoplasias nas mulheres. No ano de 2002, estimaram-se 493 000 novos casos de carcinoma cervical invasivo, sendo 83% em países em desenvolvimento, com uma taxa de mortalidade de 50%. Anualmente, esperam-se 273 000 mortes por neoplasia do colo uterino, dos quais 75% nos países mais pobres. (1)

Em Portugal, este carcinoma tem uma incidência de 13-14 casos/100 000 mulheres, com, aproximadamente, 1000 novos casos anuais. A taxa de mortalidade é de 350/100 000 mulheres, em cada ano. (1)

A capacidade de detectar e tratar lesões pré-malignas e carcinomas nos estadios iniciais pode alterar a evolução da doença e, conseqüentemente, o seu impacto, na sociedade.

Estudos iniciais sugeriram uma relação causal directa entre a actividade sexual (traduzida pelo número de parceiros sexuais e pelo início da actividade sexual em idades jovens) e o desenvolvimento de carcinoma do colo uterino. (2)

Na década de 70, com a identificação, por Zur Hausen, do HPV (Human Papillomavirus), foi pela primeira vez associado o risco de cancro do colo do útero com a infecção por esse vírus.

Através de estudos epidemiológicos e técnicas de biologia molecular, foi possível estabelecer uma relação causa-efeito entre a infecção pelo HPV de alto risco e a neoplasia do colo do útero. Este agente patogénico foi considerado um factor necessário, mas não suficiente ao desenvolvimento desta patologia, dado que, a infecção por este vírus tem alta prevalência no sexo feminino, contudo apenas um pequeno número desenvolve carcinoma. É

de salientar que a maioria das neoplasias do colo do útero apresenta evidências de infecção pelo HPV. (3,4)

Como Castellsague (5) sugeriu, os co-factores podem ser classificados em 3 grupos: 1) co-factores exógenos, tais como alimentares, traumatismos, tabagismo, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e outras doenças sexualmente transmissíveis; 2) co-factores relacionados com o próprio vírus, tais como estirpe específica, variantes do tipo, carga viral, integração no ADN (Ácido Desoxirribonucleico) das células hospedeiras e co-infecção com outros vírus; 3) co-factores endógenos, tais como hereditariedade e imunidade.

Guijon et al (6), 1991, refere que as mulheres com lesões neoplásicas intra-epiteliais cervicais apresentavam uma flora vaginal alterada (coloração de Gram de secreções vaginais), quando comparadas com mulheres sem CIN (Neoplasia Intra-epitelial Cervical). Admite-se a existência de outros agentes/co-factores que favoreçam o crescimento do cancro cervical e que podem ser intrínsecos ou extrínsecos à mulher. Entre os primeiros encontram-se o tipo HLA ("Human Leukocyte Antigen"), patologias imunossupressoras, idade de início da actividade sexual, número de partos e a localização da zona de transformação no colo do útero - a metaplasia escamosa é, significativamente, vulnerável às alterações oncogénicas provocadas pela infecção pelo HPV. Os factores extrínsecos são a utilização prolongada de anticoncepcionais hormonais, os fármacos imunossupressores, as infecções genitais prévias (Herpes Vírus, *Clamidia*, *Gardnrella Vaginalis*), as alterações da flora vaginal normal, os múltiplos parceiros sexuais e/ou parceiros de alto risco e os hábitos tabágicos. (2,6,7)

J.T. Cox (8) declara que existe um aumento do número de mulheres, medicadas com contraceptivos orais, com lesões neoplásicas e pré-neoplásicas do colo do útero. Este facto pode dever-se a comportamentos sexuais ou a um efeito directo das hormonas. Também, as mulheres que utilizam esta forma de contracepção são submetidas, mais frequentemente, a citologias, o que pode influenciar o número de lesões detectadas, neste grupo.

Como é considerado um método anticoncepcional eficaz, pode acarretar um uso menor de métodos de barreira, aumentando o risco de contrair doenças sexualmente transmissíveis. Este autor refere que a utilização prolongada (superior a 6 anos) destes fármacos aumenta, em duas vezes, o risco de desenvolver carcinoma cervical, no entanto, existem dúvidas quanto ao seu papel no aparecimento de lesões CIN. Os efeitos fisiológicos destas hormonas estão a ser estudados, nomeadamente, no epitélio metaplásico cervical. Pode haver uma activação do processo de eversão do epitélio colunar, comprovadamente mais sensível aos efeitos oncogénicos do HPV. (8)

O consumo de tabaco aumenta em, pelo menos, duas vezes o risco de desenvolver neoplasia do colo uterino e, de acordo com uma investigação realizada por M. J. Arends et al, as nitrosaminas (constituente do fumo do tabaco), demonstradas no muco cervical, têm um efeito no ADN das células do epitélio cervical. Há, também, um envolvimento do citocromo P450 na activação de nitrosaminas e glutathione S transferase e este facto pode explicar a susceptibilidade individual a estes carcinógenos. (2)

Alterações da flora vaginal podem facilitar a transformação neoplásica das células do colo do útero, por induzirem um estado de inflamação, que é um importante e conhecido factor promotor da carcinogénese. (4)

A flora vaginal predominante é constituída por *Lactobacillus sp.* que estabelecem o pH ácido que inibe o crescimento de diversas bactérias nocivas. Patricia J. McNicol et al (9), 1998, admite que, nas doentes com CIN, os *Lactobacillus sp* estão diminuídos ou ausentes. O equilíbrio entre este grupo de bactérias, outros microrganismos, as hormonas e a resposta imunitária determina a protecção contra diversas patologias.

Todos estes factores referidos têm um papel importante no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e, conseqüentemente, no carcinoma cervical. Logo, a sua identificação pode ser uma etapa importante na diminuição do impacto desta patologia na saúde das mulheres.

Em diversos países foi implementado o método de rastreio de citologia do colo do útero, criado por George Papanicolau, em 1928. (10) As alterações celulares, encontradas com a utilização deste teste, são classificadas segundo o sistema Bethesda, que inclui as alterações de baixo e alto grau (tabela 1). (11)

Tabela 1 - Sistema Bethesda para a classificação das alterações citológicas (11)

Negativa para lesão intra-epitelial ou malignidade
Células epiteliais anormais
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Células escamosas</u></li> </ul>
I. Células escamosas atípicas (ASC):
- Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US );
- Não pode ser excluída HSIL (ASC-H);
II. Lesão pavimentosa intra-epitelial de baixo grau (LSIL) (inclui alterações por HPV /displasia leve/CIN 1);
III. Lesão pavimentosa intra-epitelial de alto grau (HSIL) (inclui alterações por displasia moderada e grave, carcinoma <i>in situ</i> , CIN 2 e CIN 3);
IV. Carcinoma pavimentoso ou espinocelular
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Células glandulares</u></li> </ul>
I. Células glandulares atípicas (AGC) (especificar endocervical, endometrial ou sem especificar);
II. Células glandulares atípicas, possível neoplasia (especificar endocervical ou sem especificar);
III. Adenocarcinoma <i>in situ</i> endocervical (AIS);
IV. Adenocarcinoma

• <u>Outros</u>
I. Sem evidência de lesão intra-epitelial, com presença de células endometriais, em mulher com mais de 40 anos

A designação CIN é uma classificação histopatológica. Existem diversos graus de displasia/CIN:

- CIN-1: displasia ligeira. As células anormais predominam no 1/3 basal do epitélio;
- CIN-2: displasia moderada. Maioria das células alteradas está presente nos 2/3 basais.
- CIN-3: displasia grave e carcinoma *in situ* (CIS).

Com a evolução das alterações celulares, há diferenciação progressiva do citoplasma, aumento do tamanho do núcleo e do pleomorfismo celular, hiper cromasia nuclear e aumento do número de mitoses anormais. (10)

A figura 1 expõe, esquematicamente, as zonas afectadas consoante a evolução dos graus e as diferentes nomenclaturas utilizadas na sua classificação.

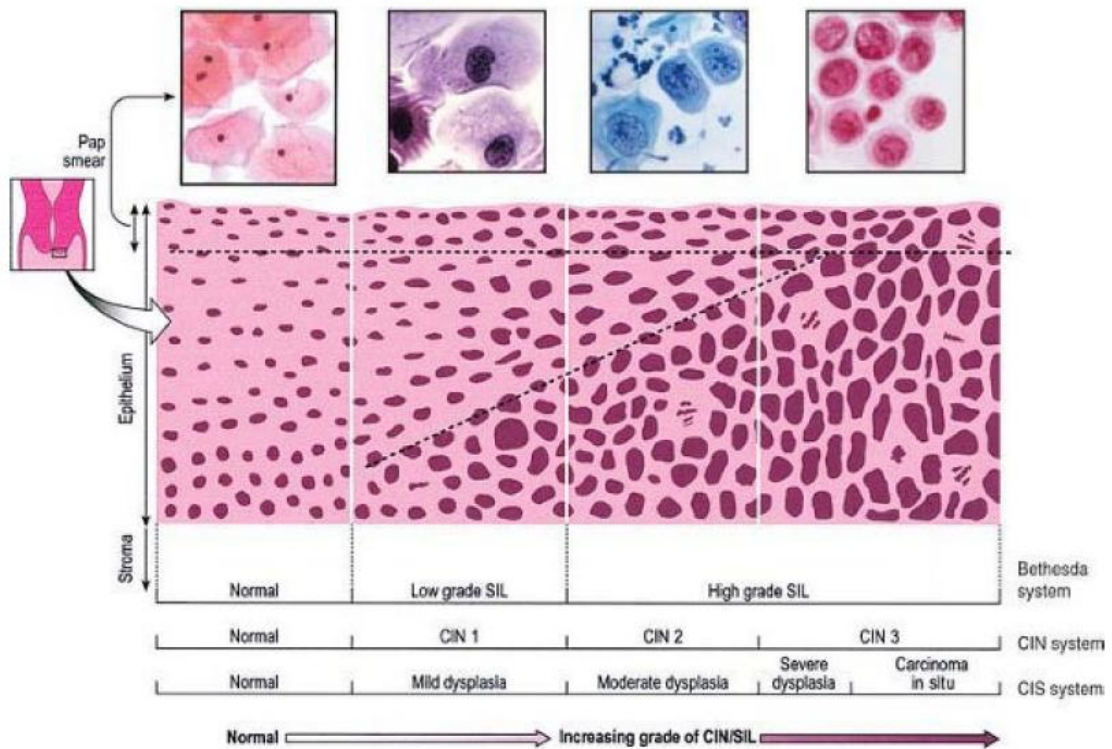


Figura 1 - Diferentes nomenclaturas nas lesões malignas do colo uterino (retirado de Essentials of Rubin's Pathology. 5th ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2009) (10)

Na avaliação da história natural destas lesões, M. J. Arends (2) (em 1997) afirma que CIN 1 tem uma probabilidade de regressão de 60%, persistência de 30%, evolução para CIN 3 de 10% e invasão de 10%. Para CIN 2, estes valores são 40%, 40%, 20% e 5%, respectivamente. Quanto a CIN 3, a possibilidade de regressão é de 33% e invasão superior a 12%.

Não são conhecidos os factores que levam a regressão, persistência ou progressão das lesões de CIN1. Colocou-se a hipótese que a alteração da flora vaginal pudesse estar associada às alterações citológicas consideradas minor (Inflamação, ASC-US e LSIL) e à presença das lesões de CIN 1, pelo que se conduziu um estudo no sentido de avaliar a possibilidade de tal associação.

## Objectivos

Definiram-se como principais objetivos, do presente estudo, os seguintes:

1. Compreender melhor o comportamento da neoplasia intra-epitelial de baixo grau do colo do útero;
2. Avaliar, num grupo de doentes residentes na Beira Interior, pré-menopáusicas e não grávidas, a importância de alguns co-factores, na carcinogénese cervical;
3. Perceber a importância que a flora vaginal pode ter na etiologia das alterações citológicas minor (Inflamação, ASC-US e LSIL);
4. Verificar uma eventual associação da alteração da flora vaginal com o diagnóstico de CIN 1.

# Metodologia

## Material:

Foram avaliados todos os processos clínicos correspondentes a doentes enviadas à Unidade de Patologia Cervical do Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do CHCB (Centro Hospitalar Cova da Beira), entre 01/01/2010 e 31/12/2010, por alteração citológica de Inflamação, ASC-US ou LSIL. Todos os estudos citológicos eram provenientes do actual programa de Rastreio do Cancro do Colo do Útero da Região Centro do país e todas as doentes foram enviadas através do seu médico de família.

O estudo dessas mulheres seguiu o protocolo em vigor no Serviço, que incluía a colposcopia, com eventual biópsia, marcadores serológicos da hepatite B e C e do HIV1 e HIV2 (Human Immunodeficiency Virus) e o estudo bacteriológico, micológico e parasitário do exsudado vaginal.

Foram considerados critérios de exclusão:

1. Gravidez;
2. Menopausa (definida como, no mínimo, 2 anos de amenorreia);
3. Positividade para o AgHbs (Antigénio de Superfície da Hepatite B), AchCV (Anticorpo Anti-virus Hepatite C) ou HIV1 e HIV2;
4. Sinais clínicos sugestivos de infecção vulvo-vaginal;
5. Ausência de biópsia do colo do útero;

Foram, assim, seleccionados 62 casos clínicos para análise.

Trata-se de um estudo de carácter transversal. Após a obtenção das autorizações necessárias, foram retirados e analisados os seguintes dados dos processos clínicos:

1. Idade;
2. Menarca;
3. Sintomas ginecológicos;
4. Idade da primeira relação sexual (PRS);
5. Número de parceiros sexuais;
6. Métodos contraceptivos utilizados,
7. Número de gestações;
8. Número de partos;
9. Hábitos tabágicos;
10. Diagnóstico citológico;
11. Aspectos histológicos compatíveis com infecção pelo HPV;
12. Impressão colposcópica;

13. Diagnóstico histológico;
14. Resultado do estudo microbiológico do exsudado vaginal.

Dos resultados obtidos, procedeu-se a uma análise estatística descritiva dos dados demográficos e a uma análise estatística comparativa univariada e multivariada. Recorreu-se ao teste do Qui-Quadrado para avaliar a existência de relações de dependência entre as variáveis em estudo (rejeitou-se a hipótese nula de independência para valores de p inferiores a 0,05).

## Resultados

A amostra estudada incluía 62 mulheres com idades compreendidas entre 19 e 52 anos (média = 35,89; desvio padrão=8,361). O gráfico número 1 apresenta o número de mulheres correspondente a cada idade.

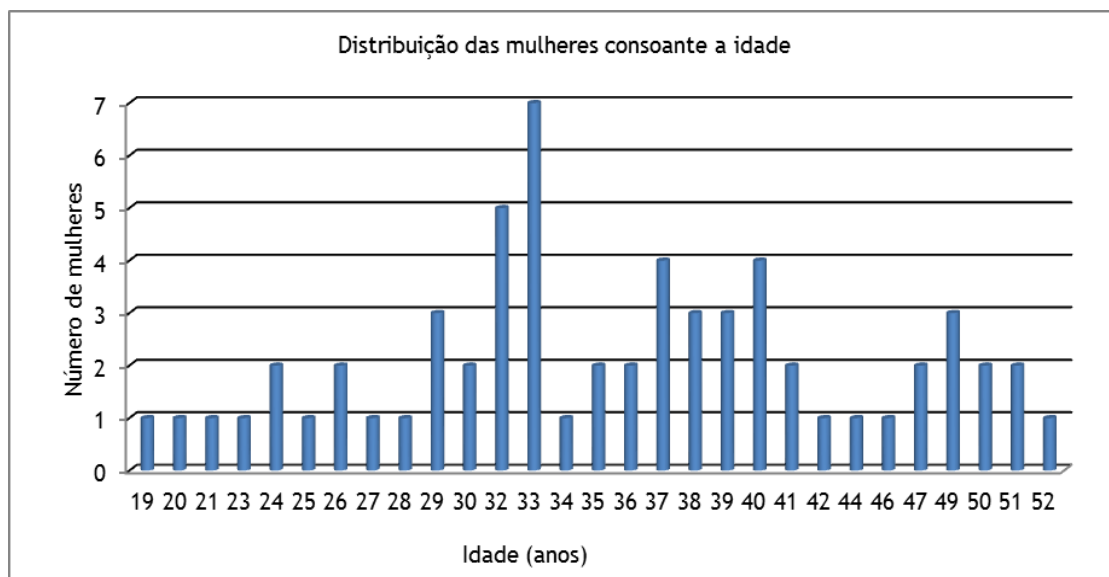


Gráfico 1 - Distribuição das idades da amostra

Quanto à menarca, a idade mínima foi 9 e a máxima 17 anos (média=12,84; desvio padrão=1,652) e a sua distribuição está representada no gráfico 2.

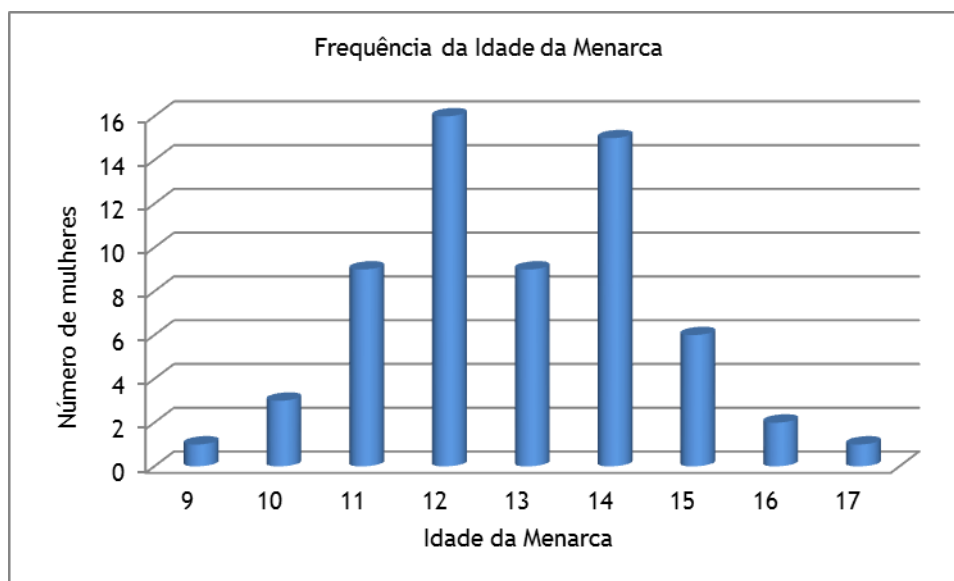


Gráfico 2 - Distribuição das idades da menarca da amostra estudada

Na amostra, a idade mínima da primeira relação sexual foi 14 anos e máxima 34 anos (média=19,06; desvio padrão=2,885)

A tabela seguinte (número 2) apresenta os resultados da citologia realizada nos Centros de Saúde.

Tabela 2 - Caracterização dos resultados da citologia

	Frequência	Percentagem (%)
ASC-US	16	25,8
LSIL	33	53,2
Inflamatório	13	21,0
Total	62	100,0

A tabela 3 expõe a sintomatologia apresentada pelas mulheres estudadas.

Tabela 3 - Apresentação da sintomatologia das mulheres estudadas

	Frequência	Percentagem (%)
Assintomática	47	75,8
Outros sintomas ginecológicos	15	24,2
Total	62	100,0

Salienta-se que a maioria das mulheres, encaminhadas para a consulta de Ginecologia do CHCB, devido a citologia alterada, não apresentava sintomas. As restantes apresentavam outros sintomas, especialmente relacionados com alterações menstruais.

Como método contraceptivo, 74,2% das mulheres usavam estroprogestativo e 25,8% usavam um método não-hormonal.

A idade da primeira relação sexual e o número de parceiros sexuais são considerados co-factores importantes para o desenvolvimento de lesões escamosas de baixo grau, no cólo do útero. O gráfico 3 mostra a distribuição deste factor de risco, na amostra estudada. Observa-se que a idade mais frequente foi 18 anos (27,4%; n=17), sendo a seguinte, 19 anos (17,7%; n=11).

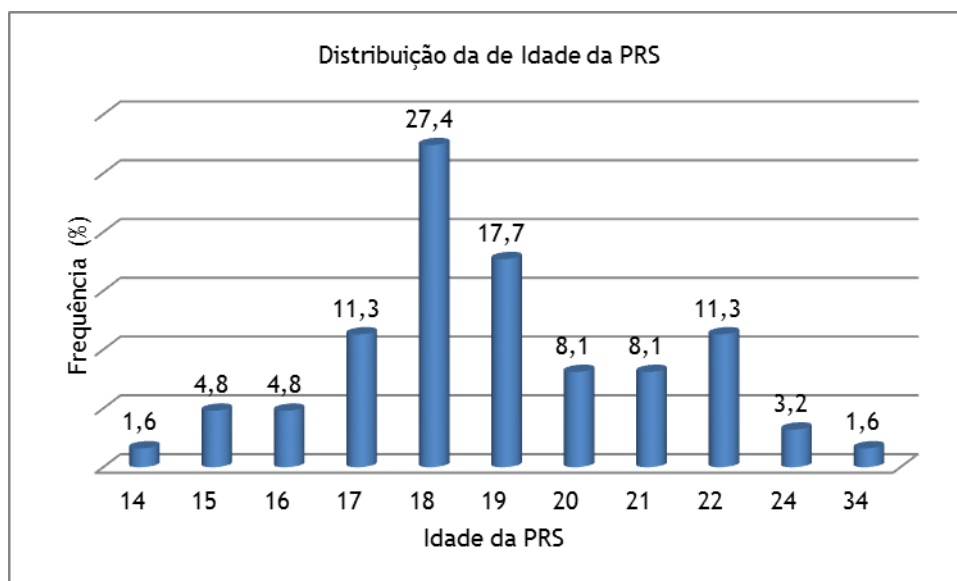


Gráfico 3 - Distribuição da idade da primeira relação sexual

A tabela 4 mostra que a maioria das mulheres, analisada neste trabalho, teve mais do que um parceiro sexual.

Tabela 4 - Distribuição do número de parceiros sexuais da amostra

Número de parceiros sexuais	Frequência	Porcentagem (%)
Um	27	43,5
Mais do que um	35	56,5
Total	62	100,0

Em relação às gestações, 22,6% (n=14) não tinham filhos, enquanto 77,4% (n=48) tinham.

Como foi referido, anteriormente, o consumo de tabaco aumenta o risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. Assim, este item, também, foi analisado na amostra. Os resultados obtidos estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos hábitos tabágicos

Hábitos tabágicos	Frequência	Porcentagem (%)
Sim	20	32,2
Não	42	67,7
Total	62	100,0

A colposcopia era sugestiva de lesão de alto grau (LAG) em 6,5% (n=4) das mulheres e de lesão de baixo grau (LBG) em 93,5% (n=58).

As lesões observadas com o meio complementar de diagnóstico, anteriormente referido, foram sujeitas a biópsia e os resultados estão expressos no gráfico 4.

Salienta-se que a maioria das mulheres da amostra apresentava lesões pré-neoplásicas CIN 1.

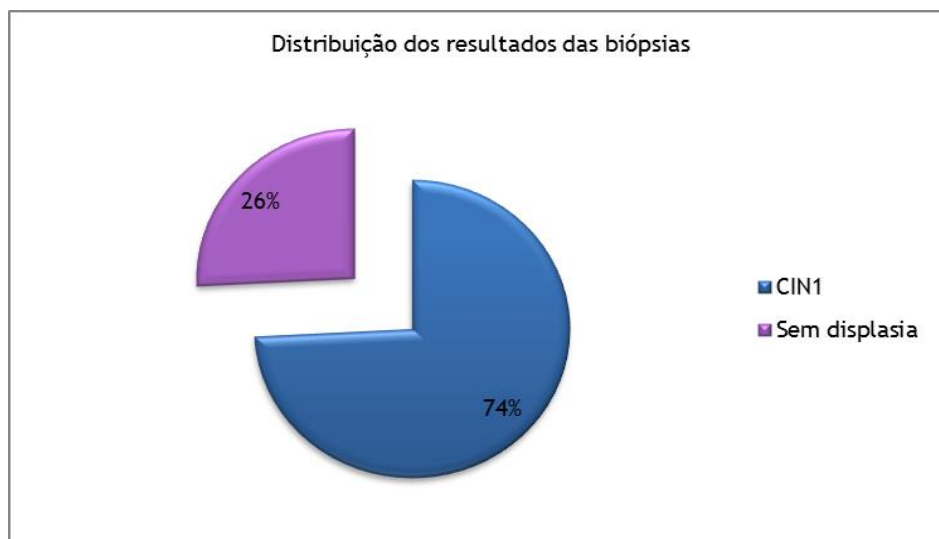


Gráfico 4 - Frequência dos resultados das biópsias na amostra

Os aspectos histológicos sugestivos de infecção por HPV estavam presentes em 58,1% (n=36) das doentes e ausentes em 41,9% (n=26).

A análise microbiológica foi executada para os *Lactobacillus sp.* presentes na flora vaginal e os resultados estão expressos na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da análise microbiológica aos *Lactobacillus sp.* da flora vaginal

	Frequência	Porcentagem (%)
Muitos	10	16,1
Alguns	17	27,4
Raros	11	17,7
Ausentes	24	38,7
Total	62	100,0

Dependendo da patologia e das características individuais, 62,9% (n=39), 6,5% (n=4) e 30,6% (n=19), foram submetidas a vaporização laser, conização ou não realizaram tratamento, respectivamente.

Quanto às variáveis idade e biópsia os resultados estatísticos estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 - Apresentação dos resultados da biópsia pelos diversos intervalos de idades

Faixa etária	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
19 - 29	11	3	14	0,619
	78,6%	21,4%	100,0%	
30 - 39	23	6	29	
	79,3%	20,7%	100,0%	
40 - 49	9	5	14	
	64,3%	35,7%	100,0%	
Igual ou superior a 50	3	2	5	
	60,0%	40,0%	100,0%	

Verificou-se, também, que o resultado CIN 1 na biópsia era mais prevalente no grupo 30 a 39 anos (50%), seguido pelo grupo 19 a 29 anos (23,9%). A faixa etária 40 a 49 representava 19,6% e as mulheres com idade igual ou superior a 50 apresentavam 6,5%.

Neste trabalho, observou-se que, nas mulheres com idade da menarca inferior a 15 anos (n=53), 71,7% tiveram resultado CIN 1 na biópsia e 28,3% sem displasia. No grupo com menarca superior ou igual a 15 anos (n=8), 88,9% apresentavam CIN 1 e 11,1% sem displasia. O valor p = 0,276.

Quando se analisou a idade da primeira relação sexual e os resultados histológicos obtidos na biópsia do colo uterino, obtiveram-se os dados representados na tabela 8.

Tabela 8 - Representação da idade da primeira relação sexual das mulheres estudadas e dos respectivos resultados na biópsia do colo do útero

Idade da primeira relação sexual	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
Inferior a 20 anos	35	7	42	0,017
	83,3%	16,7%	100,0%	
Igual ou superior a 20 anos	11	9	20	
	55,0%	45,0%	100,0%	

Verificou-se que no grupo que iniciou a vida sexual antes dos 20 anos, a diferença de resultados de biópsia é mais significativa do que no outro grupo.

Na análise da possível relação entre estas duas variáveis, também se observou que, para o diagnóstico CIN 1, 76,1% das mulheres estavam incluídas no grupo de idade de PRS

inferior a 20 anos e 23,9% do grupo de PRS igual ou superior a 20 anos. No grupo que não apresentava displasia das células do colo do útero, os valores foram 43,8% e 56,2%, respectivamente.

A tabela 9 expõe a relação entre o diagnóstico histopatológico e o número de parceiros sexuais.

Tabela 9 - Distribuição do número de parceiros sexuais e dos resultados da biópsia

Número de parceiros sexuais	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
Um	19	8	27	0,546
	70,4%	29,6%	100,0%	
Mais do que um	27	8	35	
	77,1%	22,9%	100,0%	

Realça-se que, em ambos os grupos, o diagnóstico de CIN 1 predominou, porém alcançou valores mais elevados nas mulheres que tiveram mais do que um parceiro sexual.

Observou-se, também, que no grupo de mulheres com resultado CIN1, 41,3% tiveram um parceiro e 58,7% mais do que um. Para os resultados sem displasia, os valores foram equitativos (50%/50%).

A tabela seguinte (nº 10) expressa uma possível relação entre os contraceptivos orais e as lesões presente no colo do útero

Tabela 10 - Representação do tipo de método anticoncepcional utilizado pelas mulheres avaliadas

Tipo de anticoncepcional	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
Estroprogestativo	37	9	46	0,057
	80,4%	19,6%	100,0%	
Outro	9	7	16	
	56,2%	43,8%	100,0%	

A diferença entre diagnósticos foi maior no grupo de mulheres que utilizam contraceptivos orais (80,4% vs 19,6%).

Quando se analisam os valores específicos para cada resultado de biópsia, obtém-se que, entre as mulheres com CIN 1 (n=46), 80,4% faziam estroprogestativos e as restantes (19,6%; n=16) utilizavam um método não hormonal. Para o grupo sem displasia (n =16) a distribuição era 56,2% e 43,8%, respectivamente.

O gráfico seguinte (nº 5) apresenta a distribuição das mulheres da amostra consoante o número de parceiros sexuais a idade da menarca.

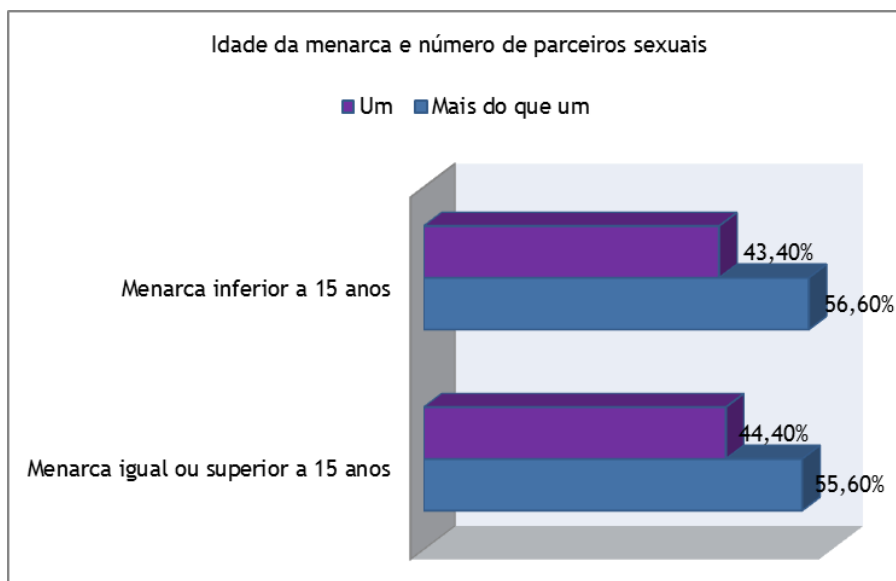


Gráfico 5 - Distribuição do número de parceiros sexuais consoante a idade da menarca

A tabela 11 apresenta os resultados obtidos para a idade da PRS, o número de parceiros sexuais e o diagnóstico histológico por biópsia, considerados co-factores importantes na etiopatogenia das lesões pré-neoplásicas do colo do útero.

Tabela 11 - Apresentação da distribuição do número de parceiros sexuais consoante a idade da PRS

Idade da PRS	Número de parceiros sexuais		Total	Valor p
	Um	Mais do que um		
Inferior a 20 anos	14	28	42	0,019
	33,3%	66,7%	100,0%	
Igual ou superior a 20 anos	13	7	20	
	65,0%	35,0%	100,0%	

Na perspectiva de enriquecer este trabalho, também, se relacionaram os métodos anticoncepcionais e a idade da PRS (tabela nº12) e o diagnóstico histológico feito por biópsia e a idade das doentes (tabela nº 13).

Tabela 12 - Apresentação da distribuição do método anticoncepcional utilizado (estroprogestativo/outro) consoante a idade da PRS

Idade da PRS	Método anticoncepcional		Total	Valor p
	Estroprogestativo	Outro		
Inferior a 20 anos	32	10	42	0,603
	76,2%	23,8%	100,0%	
Igual ou superior a 20 anos	14	6	10	
	70,0%	30,0%	100,0%	

Tabela 13 - resultados obtidos para as variáveis biópsia e idade, em função método anticoncepcional usado (estroprogestativo/outro)

Método anticoncepcional	Biópsia	Idade (anos)				Total	Valor p
		19-29	30-39	40-49	Igual ou superior a 50		
Estroprogestativo	CIN 1	10	18	7	2	37	0,883
		27,0%	48,6%	18,9%	5,4%	100,0%	
	Sem displasia	2	5	2	0	9	
		22,2%	55,6%	22,2%	0,0%	100,0%	
Outro	CIN 1	1	5	2	1	9	0,392
		11,1%	55,6%	22,2%	11,1%	100,0%	
	Sem displasia	1	1	3	2	7	
		14,3%	14,3%	42,9%	28,6%	100,0%	

Nas mulheres analisadas, verificou-se que, no grupo sem filhos (n=14), 71,4% apresentavam CIN 1 e as restantes (28,6%) tinham biópsia sem displasia. No grupo com filhos (n=48), 75,0% tinham CIN 1 e 25,0% sem displasia, na biópsia do cólo do útero.

Nas biópsias com CIN 1, 78,3% tinham tido pelo menos um parto enquanto as restantes 21,7% não tinham descendência. Para as biópsias sem displasia, os valores obtidos, respectivamente, foram 75,0% e 25,0%. O valor p alcançado foi 0,788.

A tabela 14 demonstra os resultados obtidos para as variáveis HPV e diagnóstico histológico por biópsia.

Tabela 14 - Representação da infecção por HPV na amostra

Presença de HPV	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
Sim	27	9	36	0,864
	75,0%	25,0%	100,0%	
Não	19	7	26	
	73,1%	26,9%	100,0%	

Relativamente aos valores apresentados na tabela 11, não se observam diferenças consideráveis entre os dois grupos.

Para o diagnóstico de CIN 1, obteve-se 58,7% de mulheres com infecção por HPV e 41,3% negativas para este patógeno. Nas biópsias sem displasia, os valores foram 56,3% e 43,8%, respectivamente.

A tabela 15 representa os valores atingidos para os hábitos tabágicos e o diagnóstico histológico do colo do útero.

Tabela 15 - Apresentação dos hábitos tabágicos e as lesões CIN na amostra

Hábitos tabágicos	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
Sim	17	3	20	0,180
	85,0%	15,0%	100,0%	
Não	29	13	42	
	69,0%	31,0%	100,0%	

Realça-se o facto de, apesar do diagnóstico de CIN ser mais prevalente em ambos os grupos, a diferença é mais significativa no grupo de mulheres com hábitos tabágicos.

Considerando os diferentes diagnósticos, no grupo com CIN 1 (n=46), 37,0% tinham hábitos tabágicos e 63,0% não. Em relação ao grupo sem displasia (n=16), os valores foram 18,8% e 81,3%, respectivamente.

Para a avaliação da variável *Lactobacillus sp.* agruparam-se as categorias muitos e alguns e as categorias raros e ausentes e assumiu-se a nomenclatura presentes e ausentes, respectivamente. A tabela 16 expõe os resultados.

Tabela 16 - Apresentação dos resultados obtidos na análise microbiológica

<i>Lactobacillus sp.</i>	Biópsia		Total	Valor p
	CIN 1	Sem displasia		
Presentes	22	5	27	0,249
	81,5%	18,5%	100,0%	
Ausentes	24	11	35	
	68,6%	31,4%	100,0%	

No diagnóstico de CIN 1 (n=46), 47,8% das mulheres tinham flora vaginal com *Lactobacillus sp.* predominantes e 52,2% tinham flora alterada. Nas biópsias sem displasia (n=16), os valores foram 31,3% e 68,8%, respectivamente.

Considerando os objectivos propostos, também se correlacionou a variável *Lactobacillus sp.* (presentes ou ausentes) com diversos factores de risco, com a propósito de demonstrar possíveis relações de dependência mais específicas. Ou seja, tentar identificar factores que influenciam a flora vaginal e as alterações histológicas associadas.

Tabela 17 - Resultados obtidos para as variáveis biópsia e menarca, em função da presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

<i>Lactobacillus sp.</i>	Biópsia	Menarca		Total	Valor p
		Inferior a 15 anos	Igual ou superior a 15 anos		
Ausentes	CIN 1	18	6	24	0,275
		75,0%	25,0%	100,0%	
	Sem displasia	10	1	11	
		90,9%	9,1%	100,0%	
Presentes	CIN 1	20	2	22	0,484
		90,9%	9,1%	100,0%	
	Sem displasia	5	0	5	
		100,0%	0,0%	100,0%	

Do grupo de mulheres com *Lactobacillus sp.* ausentes, na colheita microbiológica vaginal e com CIN 1, 75,0% tiveram a menarca antes dos 15 anos e 25,0% aos 15 ou mais anos. No subgrupo sem displasia, a idade da menarca inferior a 15 anos, também predominou (90,9% vs 9,1%).

No grupo com *Lactobacillus sp.* presentes, as mulheres com menarca abaixo dos 15 anos, também predominavam, em ambos os resultados de biópsia.

A tabela seguinte (nº 18) apresenta a distribuição da amostra consoante o resultado da biópsia, em função da presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

Tabela 18 - Resultados obtidos para as variáveis biópsia e PRS, em função da presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

<i>Lactobacillus sp.</i>	Biópsia	PRS		Total	Valor p
		Inferior a 20 anos	Igual ou superior a 20 anos		
Ausentes	CIN 1	18	6	24	0,028
		75,0%	25,0%	100,0%	
Ausentes	Sem displasia	4	7	11	0,426
		36,4%	63,6%	100,0%	
Presentes	CIN 1	17	5	22	0,426
		77,3%	22,7%	100,0%	
Presentes	Sem displasia	3	2	5	0,426
		60,0%	40,0%	100,0%	

Do grupo de mulheres com *Lactobacillus sp.* ausentes e com CIN 1, 75,0% (n=18) iniciaram a vida sexual antes dos 20 anos e 25,0% (n=6) depois dos 20 anos de idade. No subgrupo sem displasia, a maior percentagem de mulheres iniciou a vida sexual depois dos 20 anos (36,4% vs 63,6%).

No grupo com *Lactobacillus sp.* presentes e com CIN 1 (n=22), 77,3% iniciaram a relações sexuais antes do 20 anos e as restantes 22,7% depois dessa idade. Nas mulheres sem displasia incluídas (n=5), 60,0% começaram a actividade sexual antes dos 20 anos.

As hormonas esteróides podem alterar o pH vaginal e, conseqüentemente, predispor a alteração da flora vaginal comensal e a infecções, como candidíases.

Assim, analisou-se a distribuição das mulheres consoante os resultados microbiológicos vaginais, diagnóstico por biópsia e tipo de método contraceptivo (tabela 19).

Tabela 19 - Resultados obtidos para as variáveis diagnóstico por biópsia e método contraceptivo, em função da presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

<i>Lactobacillus sp.</i>	Biópsia	Anticoncepcional		Total	Valor p
		Estroprogestativo	Outro		
Ausentes	CIN 1	20	4	24	0,021
		83,3%	16,7%	100,0%	
Ausentes	Sem displasia	5	6	11	0,895
		45,5%	54,5%	100,0%	
Presentes	CIN 1	17	5	22	0,895
		77,3%	22,7%	100,0%	
Presentes	Sem displasia	4	1	5	0,895
		80,0%	20,0%	100,0%	

Das mulheres com *Lactobacillus sp.* ausentes na colheita microbiológica vaginal e com CIN 1, 83,3% utilizavam contraceptivos hormonais e 16,7% utilizavam um método não hormonal. No subgrupo sem displasia, os valores obtidos foram opostos, a maior percentagem (54,5%) era utilizadora de métodos não hormonais.

No grupo com *Lactobacillus sp.* presentes, 22 mulheres foram diagnosticadas com CIN 1. Destas, 77,3% estavam medicadas com estroprogestativos e 22,7% com outro método. No subgrupo sem displasia (n=5), os valores eram 80,0% e 20,0%, respectivamente.

Estudou-se, também, a distribuição do HPV consoante o resultado da biópsia e da análise microbiológica do muco vaginal.

Tabela 20 - Resultados obtidos para as variáveis biópsia e infecção por HPV, em função da presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

<i>Lactobacillus sp.</i>	Biópsia	Infecção por HPV		Total	Valor p
		Não	Sim		
Ausentes	CIN 1	11	13	24	0,983
		45,8%	54,2%	100,0%	
	Sem displasia	5	6	11	
		45,5%	54,5%	100,0%	
Presentes	CIN 1	8	14	22	0,879
		36,4%	63,6%	100,0%	
	Sem displasia	2	3	5	
		40,0%	60,0%	100,0%	

Do grupo de mulheres com *Lactobacillus sp.* ausentes e com CIN 1, 45,8% (n=11) não estavam infectadas pelo HPV e 54,2% (n=13) tinham este vírus presente, nas amostras celulares. No subgrupo sem displasia, a distribuição foi semelhante (45,5% vs 54,5%), ou seja, predominou a infecção pelo HPV.

No grupo com *Lactobacillus sp.* presentes e com CIN 1 (n=8), 36,4% não apresentava sinais de infecção pelo HPV e 63,6% estavam infectadas. Nas mulheres com biópsia sem displasia, a distribuição era, respectivamente, 40,0% e 60,0%.

Os gráficos seguintes (números 6 e 7) representam a distribuição dos hábitos tabágicos, consoante as alterações detectadas pela biópsia e em função da presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

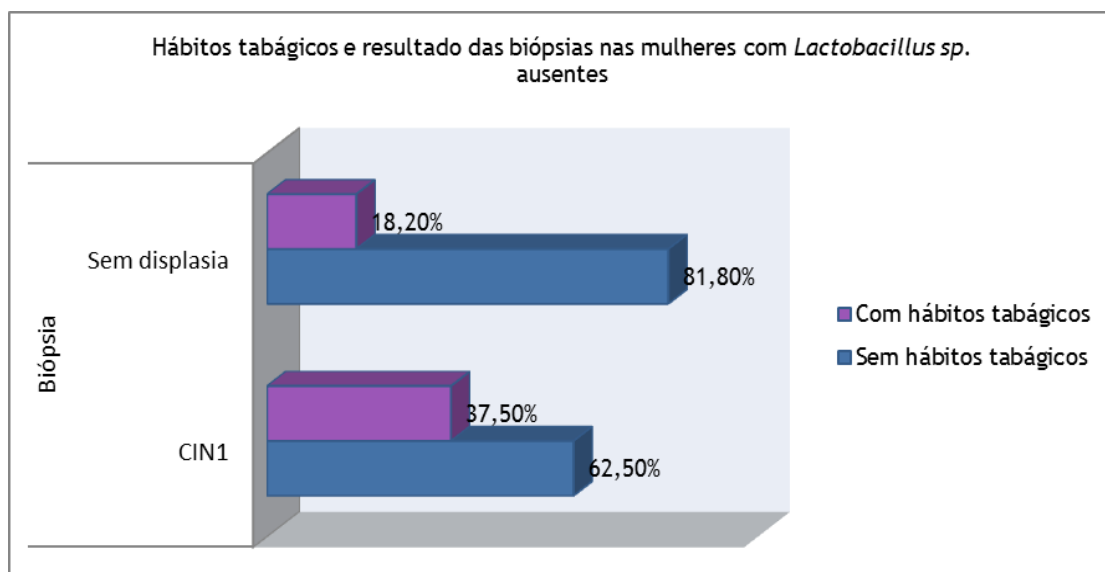


Gráfico 6 - Hábitos tabágicos e diagnósticos de biópsias, nas mulheres com flora vaginal com *Lactobacillus sp.* ausentes

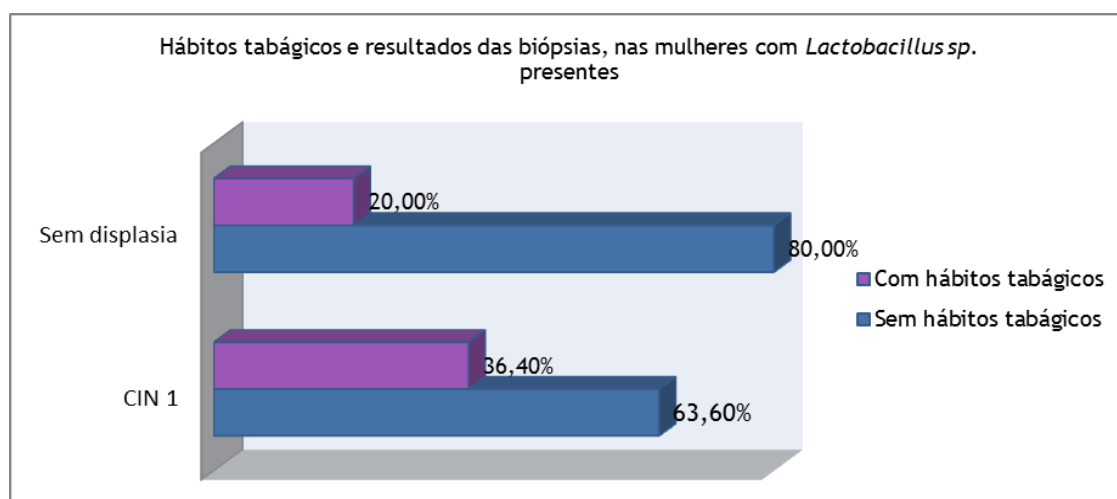


Gráfico 7 - Hábitos tabágicos e diagnósticos de biópsias, nas mulheres com flora vaginal com *Lactobacillus sp.* presentes

Verificou-se que, no grupo com flora vaginal alterada, 62,5% das mulheres com CIN 1 não fumava e 37,5% tinham hábitos tabágicos. No subgrupo sem displasia, a maioria das mulheres, também, não tinha hábitos tabágicos (81,8% vs 18,2%), porém a diferença é mais considerável do que no subgrupo com diagnóstico CIN 1.

No grupo com *Lactobacillus sp.* presentes e com CIN 1 (n=22), 63,6% consumiam tabaco e 36,4 % não. Nas mulheres sem displasia (n=5), os valores foram 80,0% e 20,0%, respectivamente.

O valor  $p$ , para o grupo com *Lactobacillus sp.* ausente, foi 0,253 e, para o grupo com análise microbiológica positiva para este microrganismo, foi 0,484.

## Discussão

Nos programas de Rastreio do Cancro do Colo do Útero organizados, as alterações citológicas consideradas minor (Inflamação, ASC-US e LSIL) correspondem a, aproximadamente, 4% de todos os resultados dos exames citológicos. O estudo ALTS veio demonstrar que o risco subjacente, de neoplasia intra-epitelial de alto grau ou de doença invasiva, é mínimo nestas doentes, pelo que está indicada uma conduta expectante, reservando-se as terapêuticas agressivas para casos particulares. (12)

Considera-se que as lesões citológicas minor, na maioria dos casos, correspondem a infecções cervicais transitórias, geralmente, provocadas pelo HPV. Porém, em 25-40% das doentes não tem sido possível detectar a presença do genoma de HPV. Outros factores poderão estar presentes na génese dessas alterações citológicas. Como outros autores, colocou-se a hipótese que a alteração do equilíbrio da flora vaginal possa estar associada às alterações de Inflamação, ASC-US e LSIL. A ausência dos *Lactobacillus sp.* no exsudado vaginal é considerada um marcador do desequilíbrio da flora vaginal, pelo que a presente investigação se centrou nos referidos microorganismos.

O estudo foi realizado na população da Beira Interior, que apresenta características diferentes da dos estudos elaborados em grandes meios urbanos ou em países sub-desenvolvidos, como os da América Latina, pelo que interessou avaliar alguns factores epidemiológicos associados à alterações citológicas minor e à displasia cervical de baixo grau.

Pouco mais de metade das doentes tinham tido mais do que um parceiro sexual ao longo da sua vida, e apenas 32,2% eram fumadoras, o que sugere uma especificidade própria da população estudada.

É de referir que a maioria das mulheres incluídas neste estudo era assintomática, no entanto, 24,2% apresentavam sintomatologia, principalmente, relacionada com alterações menstruais, o que não pode deixar de sensibilizar para universalidade e importância da assistência médica ginecológica.

No presente estudo, não se documentou, histologicamente, nenhuma neoplasia intra-epitelial de alto grau, talvez devido ao pequeno número de doentes incluídas, mas, também, à alta especificidade que o método citológico tem demonstrado na detecção dessas lesões. Em 26% dos casos, a biopsia dirigida por colposcopia não documentou neoplasia intra-epitelial, contudo em 74% foi demonstrada a presença de CIN 1, o que confirma a necessidade de avaliação colposcópica de todos os casos de alteração citológica minor, procedimento defendido por estudos prévios.

Tendo em conta que o objectivo definido era determinar a influência da flora vaginal no desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial do colo do útero, foram estudados dados epidemiológicos, com a intenção de identificar uma possível relação.

Tem sido descrito que diversos factores, como o consumo de tabaco e o uso de anticoncepcionais hormonais, afectam a flora vaginal, com consequências nem sempre visíveis. Neste estudo, procurou avaliar-se o impacto da flora vaginal no diagnóstico de neoplasia intra-epitelial do colo do útero.

Assim, na discussão deste trabalho, procura-se interpretar os resultados e a comparação, se possível, com estudos anteriormente realizados. Também, serão referidas possíveis explicações para os dados obtidos.

No que diz respeito à idade e diagnóstico feito por biópsia (tabela 7) verifica-se que o diagnóstico de CIN 1 foi efectuado em todos os grupos, especialmente, nos 30-39 anos, porém não se encontrou significado estatístico, entre as várias faixas etárias

Segundo Emanuel Rubin (10), a idade média de desenvolvimento de CIN 1 é mais frequente entre os 24 e 27 anos. J. Thomas Cox (8) verificou que houve um aumento das lesões CIN 1 em mulheres com idades compreendidas entre 20 e 29 anos.

Uma possível explicação para a discrepância poderá ser o pequeno número da amostra, o que influencia o impacto de cada faixa etária.

Tal como seria de esperar, não se obteve uma relação estatisticamente significativa entre a idade mais precoce da menarca e o diagnóstico de CIN feito pela biópsia.

Porém, deve considerar-se que a zona de metaplasia cervical é vulnerável ao HPV, e que a sua susceptibilidade é maior durante a adolescência. Isoladamente, não se pode considerar um co-factor, mas, associado a um início mais jovem de relações sexuais, maior número de parceiros sexuais e infecção por HPV, pode propiciar as alterações oncogénicas provocadas pelo HPV. (7,8)

Estudos prévios não analisaram, individualmente, o impacto da menarca na fisiopatologia de lesões pré-neoplásicas, mas consideram-na um factor de risco, devido à sua associação ao início mais precoce de actividade sexual. Também, uma menarca mais precoce ocasiona um maior período de tempo em que o epitélio metaplásico do colo uterino está mais susceptível a alterações oncogénicas. (7,8)

Na avaliação de uma possível influência da idade da PRS no desenvolvimento de CIN 1, observou-se que o risco aumenta com o início mais precoce da actividade sexual. A dependência observada neste trabalho é corroborada por diversas investigações. M.J. Arends et al (2) declara que estudos epidemiológicos apoiam uma relação causal directa entre a actividade sexual e o desenvolvimento de neoplasia do colo uterino J. Thomas Cox (7) afirma que as mulheres mais novas, nas quais a infecção por HPV é mais prevalente, apresentam

taxas mais elevadas de lesões pré-cancerígenas. Pelo menos 37% das adolescentes têm uma citologia anormal, porém a maioria regride. Considera, também, que o risco é maior para as mulheres com início da vida sexual perto da menarca e que este diminuiu quando a actividade sexual se iniciou entre os 20 e 23 anos. (2)

A convergência de factores de risco, como idade precoce do início da vida sexual e inflamação crónica do epitélio, pode aumentar o risco de aparecimento de CIN1, dado que a cronicidade da reacção inflamatória pode levar a alterações citológicas persistentes que, em casos mais graves, podem torna-se malignas.

Outro co-factor considerado importante na etiopatogenia do carcinoma do colo do útero tem sido o número de parceiros sexuais, ao longo da vida (tabela 9), porém, numa análise comparativa, este factor não se mostrou relevante.

No estudo SUCCEED, observou-se uma associação entre o número de parceiros sexuais e lesões CIN 3, mas não para lesões em estadios inferiores a CIN 2, nas mulheres infectadas por estirpes oncogénicas do HPV. (13) F. Guijon et al (6) verificou que o risco de desenvolver neoplasia intra-epitelial do colo uterino estava associado ao número de parceiros sexuais, contudo não fez análise comparativa entre CIN 1 e sem displasia. J. Thomas Cox (8) afirmou que o número de parceiros sexuais aumenta o risco de aquisição da infecção por HPV, com consequente aumento do risco de desenvolvimento de lesões pré e neoplásicas no colo do útero. Este autor aponta para que a idade da menarca possa estar relacionada com o número de parceiros sexuais e com um maior risco para doenças sexualmente transmissíveis.

O início da actividade sexual próximo da menarca parece influenciar o aparecimento de displasia cervical, dado que o epitélio do colo está mais vulnerável ao HPV. Nesta amostra, verificou-se uma diferença média de 7 anos entre a menarca e o início da atividade sexual. A idade média da menarca foi 12,84 anos (desvio padrão=1,652) e da primeira relação sexual foi 19,06 anos (desvio padrão=2,885). Este intervalo de tempo pode auxiliar a compreensão das diferenças notadas neste trabalho. O início da vida sexual, após a adolescência, diminui o tempo de exposição de um epitélio mais susceptível a agentes de risco.

Estes valores podem dever-se a características culturais da amostra estudada. Sendo mulheres de uma zona do interior do país, a sua educação tende a ser mais conservadora e a sua atividade sexual a iniciar-se após o casamento. De notar que as características do parceiro sexual poderão influenciar o contágio pelo HPV, porém, neste estudo, este aspecto não foi avaliado.

Obteve-se uma relação de dependência entre a idade da PRS e o número de parceiros sexuais. Na amostra, a maioria das mulheres com início de vida sexual antes dos 20 anos teve mais do que um parceiro sexual, enquanto no grupo com idade de PRS igual ou superior a 20 anos a situação inverte-se. Um início mais jovem de relações sexuais está relacionado com um maior número de parceiros ao longo da vida. Este trabalho está de acordo com estudos

prévios que defendem a existência de uma relação causal entre o início de relações sexuais em idades mais jovens, um número mais elevado de parceiros sexuais e o desenvolvimento de lesões CIN. Referem, também, que a associação entre as alterações histológicas e a idade da PRS pode ser explicada pelo número de parceiros sexuais. (7,8) É importante referir, novamente, a influência da cultura e sociedade em que a amostra está inserida.

Os estroprogestativos são considerados um método anticoncepcional eficaz e são utilizados por muitas mulheres. No entanto, produzem alterações no epitélio do colo do útero, no pH e na flora vaginal.

Verificou-se uma tendência, embora não estatisticamente significativa, para o diagnóstico histológico de CIN de baixo grau, nas mulheres que faziam contraceptivos orais.

As incertezas relativas ao impacto deste co-factor estão em concordância com resultados ambíguos anteriores. J. Thomas Cox (8) constatou, num estudo de revisão exaustiva de estudos caso-controlo e de cohort, um risco aumentado de desenvolver neoplasia invasiva do colo do útero, em relação ao uso prolongado de anticoncepcionais orais. Contudo, a associação com as lesões CIN não é clara, dado que a associação com o carcinoma *in situ* não é clara.

A avaliação da possível influência dos contraceptivos orais não é fácil de realizar, pois devem considerar-se o tempo de utilização destes fármacos, a dosagem hormonal e a idade de início de utilização. Os anticoncepcionais orais têm um efeito de eversão do epitélio colunar do colo do útero, assim, uma utilização mais prolongada poderá causar uma exposição mais prolongada, destas células, a agentes inflamatórios e infecciosos. A dosagem e idade de início de utilização poderão ter um impacto semelhante na etiologia de lesões CIN 1. Como a amostra era reduzida, não foi possível uma avaliação específica destes factores.

Os comportamentos sexuais são um componente importante, no desenvolvimento de CIN, e os diversos agentes podem influenciá-lo, de múltiplas formas. A idade da menarca, da PRS e a utilização de contraceptivos hormonais são factores considerados importantes e que podem estar interligados. Assim, também, se avaliaram possíveis relações entre eles.

Apesar de, na amostra, não se observar dependência entre a idade da primeira relação sexual e os anticoncepcionais, a maioria das mulheres, de ambos os grupos, utilizava estroprogestativos. Sugere uma preferência na utilização dos contraceptivos hormonais, independentemente, da idade do início da vida sexual.

Também, não foi possível estabelecer uma associação entre a idade e tipo de anticoncepcional utilizado. O tamanho da amostra pode ter influenciado estes resultados, pois existem poucas mulheres em cada subgrupo, o que poderá subestimar o impacto do fármaco e distribuição do diagnóstico histológico, pelas diferentes faixas etárias.

Não se encontrou relação entre a paridade e os diagnósticos histológicos de CIN 1 ou ausência de displasia do colo uterino.

O estudo SUCCEED verificou que a multiparidade é um fator de risco para o desenvolvimento de CIN 3, mas não encontrou associação, estatisticamente significativa, para graus de CIN inferiores a 2. (13)

A relação de independência obtida, no presente estudo, está em desacordo com os resultados obtidos por outros trabalhos. J. Thomas Cox (8) afirma que existe uma relação entre o número de partos e o desenvolvimento de CIN, porém existem dúvidas quanto ao mecanismo fisiopatológico subjacente. Em 1993, De Britton et al (8) demonstrou que mulheres com seis ou mais partos têm um risco 2,5 vezes superior de falecer por cancro cervical, do que as mulheres com menos de 3 partos. Este estudo contestou a proposição feita por Bosch et al (8), que considerava a idade do primeiro parto como o factor de risco principal para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial do colo do útero. Guijon et al (6) admite uma relação de dependência entre a paridade e o desenvolvimento de CIN.

A gravidez, ao provocar a eversão do epitélio colunar, sujeitaria o epitélio metaplásico às alterações citológicas causadas pelo HPV. Também, é defendida a hipótese que a progesterona induziria a instabilidade de um oncogene do HPV, o que facilitaria a integração do DNA viral no genoma das células do colo, promovendo a progressão oncológica (Mittal et al, 1993). (8)

Tem de se considerar que, nos estudos citados, foram avaliados todos os graus de neoplasia intra-epitelial do colo do útero, enquanto neste trabalho avaliou-se, apenas, CIN 1.

A infecção pelo HPV é o fator epidemiológico mais importante no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. No presente trabalho, por dificuldades económicas, não foi possível realizar a avaliação molecular do vírus, porém valorizaram-se os aspectos histológicos das amostras colhidas por biópsia. Não se observou associação entre os aspectos histológicos e a presença de CIN de baixo grau.

Segundo o estudo ALTS, mais de 70% das mulheres com citologia LSIL tinham infecção pelo HPV. (12) Como a infecção por este microrganismo é muito prevalente nas alterações do colo do útero, provavelmente, não se iria encontrar uma associação estatisticamente significativa entre CIN 1 e presença de HPV nas amostras.

O fumo do tabaco tem sido considerado um factor na carcinogénese do carcinoma do colo do útero. No presente estudo não se encontrou relação entre o diagnóstico histológico de CIN 1 e os hábitos tabágicos, o que está de acordo com trabalhos prévios, nomeadamente o de Schiffman et al, 1993, que não documentou um aumento na incidência de CIN 1 em fumadoras. (8) O mesmo trabalho permitiu afirmar que o tabaco pode ser um co-factor no desenvolvimento CIN de alto grau, no entanto, Koutsky et al (1992) (8) e Eluf-Neto (1994) (8) não observaram uma associação entre hábitos tabágicos e CIN 2/3.

Deve ponderar-se a duração do consumo tabaco, pois é a acumulação de nitrosaminas e outras alterações enzimáticas que levam a anomalias celulares. A amostra era de 62, mulheres o que não permitiu uma estratificação válida da duração dos hábitos tabágicos e, também, não existiam lesões CIN 2 e 3, o que não permitiu avaliar o impacto no desenvolvimento de lesões de alto grau.

Diversos co-factores referidos, previamente, nesta discussão influenciam as características da flora vaginal. É a harmonia entre as diversas variáveis biológicas, características imunológicas e factores externos que determina quais os microorganismos predominantes na flora vaginal. Estes têm um papel essencial na estabilidade e protecção das estruturas que os rodeiam.

Apenas em 16,1% dos casos estudados foi possível demonstrar a normal presença de Lactobacilos na flora vaginal. Esta ocorrência sugere que as alterações citológicas minor estão, frequentemente, associadas à perturbação da flora vaginal. No entanto, não foi possível estabelecer uma associação estatisticamente significativa. Patricia J. McNicol et al (9), ao tentar analisar o efeito de diversos microorganismos na expressão de genes do HPV, demonstrou que, em mulheres sem displasia e com CIN 1, os *Lactobacillus sp.* predominavam, em detrimento de *Bacteroides sp.*

Esta conclusão diverge de estudos anteriores. Guijon et al (6) realizou um estudo caso-controlo e concluiu que as mulheres com patologia do colo uterino tinham uma flora vaginal com menos Lactobacillus, quando comparadas com as mulheres sem patologia.

As discrepâncias podem ser explicadas pela existência de apenas lesões CIN 1 na amostra analisada. A influência da flora vaginal pode abranger a prevenção da evolução e/ou a regressão de lesões de baixo grau e não, apenas, do seu desenvolvimento.

Na tentativa de identificar uma eventual associação da alteração da flora vaginal com o diagnóstico das CIN 1, correlacionaram-se diferentes variáveis, consoante a presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

Na correlação da menarca e do resultado da biópsia, em função da flora vaginal, não se observou associação para ambos os grupos (*Lactobacillus sp.* ausentes e *Lactobacillus sp.* presentes).

A independência e a diferença entre valores obtidos, pode ser explicada pela desigualdade entre número de mulheres com idade da menarca inferior e superior/igual a 15 anos, devido ao número de mulheres da amostra.

Para os *Lactobacillus sp.* ausentes, histologia da biópsia e idade da primeira relação sexual obteve-se uma relação de dependência. Pode afirmar-se que as lesões pré-neoplásicas, nas mulheres com flora vaginal alterada, predominam quando a vida sexual se iniciou antes dos 20 anos e os resultados normais prevalecem se o início foi depois ou aos 20 anos. Quando

há um desequilíbrio da flora vaginal, aumenta a prevalência de lesões de baixo grau em mulheres sexualmente activas desde idades mais jovens.

Esta relação pode ser explicada pelo efeito “protector” de uma idade mais tardia para o início da vida sexual. Apesar da flora vaginal estar alterada, as células não sofreram alterações, possivelmente, pela não exposição a factores de risco no período de maior susceptibilidade (adolescência).

Nas mulheres com *Lactobacillus sp.* presentes não foi possível estabelecer relação de dependência.

Como já foi afirmado, anteriormente, diversos autores afirmam que as hormonas podem ter uma acção potenciadora dos efeitos oncogénicos do HPV. (8)

O grupo com flora vaginal alterada (*Lactobacillus sp.* ausentes), o diagnóstico da biópsia (CIN 1 e sem displasia) e os anticoncepcionais (estroprogestativo/outro) podem considerar-se dependentes. Ou seja, as lesões pré-neoplásicas, nas mulheres com flora vaginal alterada, predominam nas usuárias de contraceptivos hormonais e os resultados normais prevalecem nas mulheres que preferem outro método. Quando existe um desequilíbrio da flora vaginal, aumenta a prevalência de lesões de baixo grau em mulheres medicadas com hormonas sexuais, como método de contracepção. Possivelmente, nas mulheres com uma alteração microbiológica vaginal, as células podem estar mais vulneráveis aos efeitos dos microrganismos prejudiciais, potenciados pelos contraceptivos hormonais.

No grupo das mulheres com *Lactobacillus sp.* presentes não foi possível estabelecer uma associação. Pode ser justificado pelo menor número de indivíduos com flora normal, o que impediu uma investigação de real prevalência das alterações histológicas.

As manifestações iniciais de infecção pelo HPV consistem em lesões CIN, muito comuns em mulheres jovens sexualmente activas. Porém, lesões de alto grau e neoplasia do colo do útero são raras em idades jovens e mais comuns em mulheres mais velhas. (8) A maioria das lesões de baixo grau regride, espontaneamente, como foi comprovado por Mosciki et al, num estudo prospectivo publicado em 2004, no qual 90% dos casos de LSIL, no grupo de mulheres com 13 a 22 anos, regrediram sem tratamento. (14) Isto sugere a existência de um factor que estimula a normalização do epitélio afectado. Uma hipótese seria as características vaginais, o meio propício à infecção contínua pelo HPV, regulado pelos *Lactobacillus sp.*

Com base nos resultados obtidos, não é possível afirmar a existência de uma relação de dependência entre a infecção pelo HPV e os *Lactobacillus sp.* na flora vaginal. Segundo este estudo, o aparecimento de lesões pré-neoplásicas não depende da flora vaginal, ou seja, os efeitos oncogénicos do HPV prevalecem sobre o equilíbrio ou desequilíbrio dos *Lactobacillus sp.* Salienta-se, também, que nos subgrupos sem displasia a infecção por HPV predomina. Esta ocorrência pode dever-se à estirpe de HPV presente, pois se a mulher estiver

infectada por uma de baixo risco, pode ter este vírus na sua flora vaginal, mas não desenvolver lesões.

Como já foi dito, anteriormente, alguns autores afirmam que os constituintes do fumo do tabaco estão presentes no muco cervical e que têm um efeito ao nível do ADN e das enzimas do epitélio cervical. (2)

Um possível efeito destes químicos seria a alteração da flora vaginal, o que proporcionaria um ambiente mais favorável ao HPV e a outras infecções vaginais. Porém não se observou uma relação entre o consumo de tabaco, o diagnóstico histológico e a presença ou ausência de *Lactobacillus sp.*

Previamente, foram referidos estudos que demonstraram uma relação entre CIN de alto grau e hábitos tabágicos. O facto de a amostra incluir, apenas, lesões CIN 1 e mulheres sem displasia, pode explicar a independência das variáveis.

## Conclusão

O HPV é o factor etiológico do carcinoma do colo do útero, porém existem mulheres infectadas com este vírus que não desenvolvem lesões malignas. Admite-se a presença de factores associados que proporcionam as condições adequadas ao desenvolvimento de alterações oncogénicas.

As lesões minor são muito frequentes e constituem um dilema para os médicos que, no dia-a-dia, as enfrentam, o que, por vezes, leva a um sobrediagnóstico e sobretratamento. A avaliação de factores adicionais, que possam levar ao esclarecimento do comportamento biológico, tem grande interesse na prevenção da morbidade associada ao tratamento.

Neste estudo, tentou avaliar-se as alterações na flora vaginal, nas mulheres com lesões de baixo grau do colo do útero. Verificou-se que:

- As mulheres com flora vaginal alterada e idade da PRS inferior a 20 anos têm uma maior probabilidade de desenvolver CIN1.

- Em relação aos métodos contraceptivos hormonais e o diagnóstico histológico da biópsia, a interpretação é dúbia, porém, pode afirmar-se que existe uma influência dos contraceptivos hormonais no desenvolvimento de lesões de baixo grau.

- A maioria das mulheres, com início de actividade sexual antes dos 20 anos, teve mais do que um parceiro sexual, enquanto que, no grupo com idade de PRS igual ou superior a 20 anos, a situação inverte-se.

- Quando a flora vaginal está alterada, as lesões pré-neoplásicas predominam quando a actividade sexual se iniciou antes dos 20 anos e os resultados sem displasia predominam se o início foi após os 20 anos. A presença de lesões, quando há desequilíbrio da flora vaginal, pode ajudar a esclarecer a sua regressão, quando há o restabelecimento da flora comensal normal.

- No grupo de mulheres com *Lactobacillus sp* ausentes, na flora vaginal, e que utilizam anticoncepcionais orais, também, se observou uma associação com os resultados histológicos da biópsia. Quando existe um desequilíbrio da flora vaginal, aumenta a prevalência de lesões de baixo grau em mulheres medicadas com contraceptivos hormonais.

### Limitações do estudo

Existem limitações, neste estudo, que impedem ou limitam a sua generalização para a população universal e que podem esclarecer alguns resultados discordantes de trabalhos anteriores.

A amostra estudada era constituída por apenas 62 mulheres. Com uma amostra maior poderia obter-se uma maior diversidade de dados, nomeadamente, dos diagnósticos histológicos feitos por biópsia. O Programa de Rastreio da Região Centro está implementado há muitos anos, logo a citologia tem vindo a abranger mais mulheres, o que causa uma melhoria da sua qualidade. Também, com um acompanhamento mais regular, existem menos probabilidade de encontrar lesões CIN 2 e 3 nas citologias do colo do útero. As doentes estudadas tinham CIN 1, logo as conclusões não se podem generalizar para todos os graus de lesões pré-neoplásicas. Este factor pode ter restringido a correlação entre variáveis.

Na análise das amostras colhidas com biópsia existe uma variabilidade entre observadores. Ou seja, algumas lesões podem ser sub ou sobre-avaliadas, quanto ao grau de malignidade.

Na avaliação da influência de características como a idade da primeira relação sexual e o número de parceiros sexuais, deve ter-se em consideração o fator cultural. A sociedade em que as mulheres da amostra se inserem, a sua cultura e educação podem influenciar os seus comportamentos sexuais.

Um agente importante a considerar, neste estudo e em trabalhos semelhantes, é o parceiro sexual e os seus comportamentos. Se as mulheres avaliadas tiverem um parceiro com comportamentos de risco, vai aumentar a probabilidade de infecção, por diversas estirpes de HPV de alto e baixo risco e por outras doenças sexualmente transmissíveis.

### Propostas para estudos futuros

Trabalhos direccionados para a avaliação dos factores de risco trazem um contributo à prevenção e à detecção precoce de determinadas patologias. Na minha opinião, seria interessante e útil, para a prática clínica, realizar um estudo mais abrangente das lesões CIN. Poderiam observar-se os factores mais relevantes para os diferentes graus de lesões e quais teriam um maior impacto na carcinogénese da neoplasia do colo uterino.

Considerando a flora vaginal importante para o equilíbrio do pH vaginal e dos microrganismos nela existentes, seria interessante avaliar o impacto do tratamento com Lactobacilos na regressão ou evolução das neoplasias intra-epiteliais do colo uterino, nomeadamente, nas mulheres com idade da primeira relação sexual antes dos 20 anos e com displasia.

O papel das diferentes infecções genitais, como candidíase e vaginose bacteriana, poderia ser avaliado, pois evidencia um desequilíbrio da flora vaginal e pode ter algum efeito potenciador da oncogénese, nas células do colo do útero.

## Bibliografia

1. Morgado Alexandre, Félix Ana, Francisca Ana, Matos Ana, Alves António, Azinhais António et al. Cancro ginecológico. Proceedings of reunião de consenso nacional da sociedade portuguesa de ginecologia; 2007 Fev 16, 17; Coimbra, Portugal
2. Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998;51:96-103
3. Dolinsky Christopher, Hill-Kayser Christine. Cervical cancer: the basics. [online]. 2009 Apr 17 [cited 2010 Abr 19] ( ); Available from: URL:<http://www.oncolink.org/types/article.cfm?c=6&s=17&ss=129&id=8226>
4. Klomp Johanna M, Boon Mathilde E, Van Haaften Maarten, Heintz Peter M. Cytologically diagnosed gardnerella vaginalis infection and cervical preneoplasia as established in population-based cervical screening. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Nov;199:480e1-480e5
- 5- Castellsague X, Munõz, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31: 20-8
6. Guijon F, Paraskevas M, Rand F, Heywood E, Brunham R, McNicol P. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet* 1992,37:185-191
7. Cox J Thomas. Epidemiology and natural history of hpv. *The Journal of Family Practice* 2006 Nov;55(11 Suppl):3-9
8. Cox JT. Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. *Baillière's Clininal Obstetrics and Gynaecology* 1995 Mar;9(1):1-37
9. McNichol Patricia J, Paraskevas Maria, Guijon Fernando B. The effect of vaginal microbes on in vivo and in vitro expression of human papillomavirus 16 E6-E7 genes. *Cancer Detection and Prevention* 1999;23(1):13-21
10. Rubin Emanuel, Reisner Howard M, editors. *Essentials of Rubin's pathology*. 5th ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2009. p. 401-405,628,629.

11. Manual de procedimentos do rastreio do cancro do colo do útero [online]. Mar 2009 [cited 2011 Fev]; Available from: <http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte>
12. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group, The. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1393-1400
13. Wang Sophia S, Zuna Rosemary E, Wentzensen Nicolas, Dunn S Terence, Sherman Mark E, Golg Michael A et al. Human papillomavirus (hpv) cofactors by disease progression and hpv types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants (succeed). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 Jan;18(1):113-120
14. Joshi Jayashree, Affandi Mohd Zubair, Amin Prayag, Vaidya Rama, Shah Reeta. Persistence of cytologic abnormality after treatment of bacterial, parasitic and fungal infection in older women with low grade squamous intraepithelial lesion. *Acta Cytologica* 2010 Mar-Apr; 54(2):242-244