



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ELAINE GIACOBBO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
INFECÇÕES CERVICAIS NO ESTADO DE RORAIMA**

Boa Vista/RR

2015

ELAINE GIACOBBO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
INFECÇÕES CERVICAIS NO ESTADO DE RORAIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Vigilância Epidemiológica e Indicadores de Agravos à Saúde na Fronteira Pan-Amazônica.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta.

Co-orientador: Prof. MSc. Alex Jardim da Fonseca.

Boa Vista/RR

2015

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

G429c Giacobbo, Elaine.

Caracterização genotípica do papilomavírus humano em infecções cervicais no Estado de Roraima / Elaine Giacobbo. – Boa Vista, 2015.

86 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta.

Co-orientador: Prof. MSc. Allex Jardim da Fonseca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

ELAINE GIACOBBO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
INFECÇÕES CERVICAIS NO ESTADO DE RORAIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Vigilância Epidemiológica e Indicadores de Agravos à Saúde na Fronteira Pan-Amazônica. Defendida em 13 de março de 2015 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta
Orientador/PROCISA – UFRR

Prof^a. Dr^a. Jackeline da Costa Maciel
PROCISA - UFRR

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ferreira
UERR

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade e pela força de vontade concedida, dia após dia, para a realização deste trabalho.

Ao meu pai, *in memoriam*, por não ter medido esforços para minha educação e ter me incentivado a vencer os desafios.

À minha filha Gabriela, por ter suportado a subtração do convívio e ter passado dos 2 aos 4 anos ouvindo “a mamãe precisa estudar”.

Ao meu marido, por aguentar o meu estresse.

Ao meu orientador professor Pablo, pela paciência e persistência para me ensinar a fazer pesquisa.

Ao meu co-orientador professor Alex, pelas sugestões e ajuda.

Ao médico ginecologista Paulo Roberto, pela presteza na colheita do material biológico.

À amiga Renata, pela disposição de me ensinar as técnicas laboratoriais.

À Fundação de Medicina Tropical de Manaus, pelo apoio laboratorial.

Aos funcionários do LAPER, pela ajuda nos laudos histopatológicos.

Às mulheres que gentilmente aceitaram participar desse estudo.

Por fim, aos colegas e professores do PROCISA que me ajudaram nessa caminhada.

Não existe melhor cura que a prevenção.

(Sandro Kretus)

RESUMO

O câncer do colo do útero (CCU) é uma neoplasia maligna das células do epitélio da cérvix uterina e está associado ao papilomavírus humano (HPV). Atualmente, no Brasil, são esperados mais de 15 mil novos casos de CCU a cada ano. São, molecularmente, conhecidos mais de 160 tipos de HPV e cerca de 40 deles acometem a região anogenital. O objetivo deste estudo é caracterizar o perfil genotípico da infecção pelo HPV nas amostras cervicais obtidas de mulheres submetidas à biópsia do colo do útero, no Estado de Roraima, no período de janeiro a outubro de 2014. Para a determinação genotípica foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores MY09/11 e GP5+/6+ e o sequenciamento pelo método de Sanger. Foram colhidas 71 amostras com alteração no exame citológico e colposcópico. Dessas, o HPV foi detectado em 69 amostras e identificado em 64 (8 carcinomas, 22 lesões intraepiteliais de alto grau, 12 lesões intraepiteliais de baixo grau e 22 cervicites). Os tipos mais frequentes foram HPV 16 (51,6%), HPV 58 (10,9%), HPV 18 (4,7%), HPV 33 (4,7%), HPV 45 (4,7%), HPV 35 (3,1%), HPV 61 (3,1%), HPV 6 (3,1%), HPV 11 (3,1%), HPV 39 (1,6%), HPV 52 (1,6%), HPV 53 (1,6%), cand HPV 85 (1,6%), NT HPV 82 (1,6%), NT HPV 54 (1,6%) e HPV 66 (1,6%). Conclui-se que o estudo inseriu 60% dos casos de CCU estimados para Roraima no ano de 2014 e, considerando somente esses resultados e apesar de o HPV 16 ser o tipo mais frequente, a vacina anti-HPV, disponível no Brasil e que está sendo aplicada nas meninas adolescentes pelo Ministério da Saúde, evitará menos de 60% dos casos de CCU neste Estado.

Palavras-chaves: Câncer do colo do útero. Papilomavírus humano. HPV. Genótipo. Mulheres. Roraima. Brasil.

ABSTRACT

Cancer of the cervix is a malignancy neoplasm of epithelial cells of the uterine cervix and is associated with human papillomavirus (HPV). Currently in Brazil, are expected more than 15,000 new cases of cervical cancer each year. Molecularly are known more than 160 types of HPV and about 40 of them affect the anogenital region. The objective of this study is to characterize the genotypic profile of HPV infection in cervical samples obtained from women undergoing biopsy of the cervix, in the State of Roraima, in the period from January to October 2014. Genotypic determination was made by Polymerase chain reaction (PCR) with the primers MY09 / 11 and GP5 + / 6 + and sequenced by the Sanger method. 71 samples with abnormal cytology and colposcopy were harvested. Of these, HPV was detected in 69 samples and identified in 64 (8 carcinomas, 22 intraepithelial lesions of highgrade, 12 low-grade intraepithelial lesions and 22 cervicitis). The most frequent HPV types were 16 (51.6%), HPV 58 (10.9%), HPV 18 (4.7%), HPV 33 (4.7%), HPV 45 (4.7%) HPV 35 (3.1%), HPV 61 (3.1%), HPV 6 (3.1%), HPV 11 (3.1%), HPV 39 (1.6%), HPV 52 (1.6%), HPV 53 (1.6%), HPV 85 cand (1.6%) NT HPV 82 (1.6%) NT HPV 54 (1.6%) and HPV 66 (1.6%). It follows that the study entered 60% of estimated cases of cervical cancer to Roraima in 2014, and only considering these results and even though the HPV 16 is the most common type, the anti-HPV vaccine available in Brazil, which is being applied in adolescent girls by the Ministry of Health, avoid less than 60% of cervical cancer in this State.

Keywords: Cancer of the cervix. Human papillomavirus. HPV. Genotype. Women. Roraima. Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Árvore filogenética dos PVs mostrando os gêneros, espécies e seus respectivos tipos.....	21
Figura 2 -	Relação de evolução entre os papilomavírus humanos.....	22
Figura 3 -	Organização do genoma viral do HPV 16.....	25
Figura 4 -	História natural da infecção pelo HPV. Probabilidade de progressão das lesões pré- malignas de colo do útero. As probabilidades de regressão e persistência não estão ilustradas.....	28
Figura 5 -	Histologia das lesões pré-neoplásicas do colo do útero.....	29
Figura 6 -	Ciclo do HPV no epitélio cervical	31
Figura 7 -	Interação das oncoproteínas E6 e E7 do HPV com proteínas celulares supressoras de tumor.....	32
Figura 8 -	Representação espacial das taxas brutas de incidência de CCU estimadas para os anos de 2014/2015, por unidade da Federação.....	40
Figura 9 -	Fluxograma do processamento das amostras de raspado da cérvix uterina, colhidas de janeiro a outubro de 2014, no Estado de Roraima.....	45
Figura 10 -	Tamanho do produto amplificado pelos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+.....	46
Figura 11 -	Gel representativo dos produtos da PCR para o gene da globina.....	56
Figura 12 -	Gel representativo dos produtos da PCR com iniciadores MY09/11 (fragmento 450 pb) para o gene L1 do HPV.....	56
Figura 13 -	Gel representativo dos produtos da PCR com iniciadores GP5+/6+ (fragmento 150 pb) para o gene L1 do HPV.....	57
Figura 14 -	Eletroferograma obtido do sequenciamento de fragmento de aproximadamente 450 pb	58

Figura 15 -	Reconstrução filogenética de sequências nucleotídicas correspondentes a 450 pb do gene L1 do HPV, usando o método estatístico de <i>Neighbor-Joining</i> , de 29 amostras que apresentaram lesão neoplásica ou pré-neoplásica no período de janeiro a outubro de 2014, em Roraima.....	60
Figura 16 -	Tipos e percentagens dos HPVs das 64 amostras de cérvix uterina do Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014.....	62
Figura 17 -	Tipos e frequências dos HPVs de 30 amostras da cérvix uterina com exame histopatológico compatível com lesão intraepitelial de alto grau ou carcinoma, no Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Dados demográficos e características comportamentais e clínicas das 71 mulheres participantes do estudo, atendidas nos ambulatórios de patologia cervical e unidade de oncologia, no período de janeiro a outubro de 2014, em Roraima.....	54
Quadro 2	Classificação dos tipos de HPVs das 64 amostras da cérvix uterina em relação ao grupo de alto risco oncogênico e aos tipos imunizáveis pela vacina anti-HPV tetravalente – Roraima – janeiro a outubro de 2014.....	66
Quadro 3	Classificação dos tipos de HPVs das 30 amostras da cérvix uterina, compatíveis lesão intraepitelial de alto grau ou carcinoma, em relação ao grupo de alto risco oncogênico e aos tipos imunizáveis pela vacina anti-HPV tetravalente – Roraima – janeiro a outubro de 2014.....	66
Quadro 4	Análise univariada da associação entre variáveis sociodemográficas e comportamentais e HPV 16 e 18 - Roraima - janeiro a outubro de 2014.....	68
Quadro 5	Análise univariada da associação entre variáveis comportamentais das 64 mulheres com HPVs identificados e a positividade para HPV 16 ou 18 – Roraima, janeiro a outubro de 2014.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Doenças associadas aos papilomavírus do gênero Alfa.....	23
Tabela - 2	Funções das proteínas do papilomavírus humano.....	26
Tabela - 3	Iniciadores utilizados para a detecção do gene da globina.....	47
Tabela - 4	Sequência dos iniciadores usados nas reações de PCR.....	48
Tabela - 5	Tipos de HPVs identificados e grau de similaridade (%), obtidos do <i>Genbank</i> por meio da ferramenta BLAST, das 64 amostras da cérvix uterina do Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014.....	58
Tabela - 6	Resultados laboratoriais das 71 amostras da cérvix uterina do Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool - Ferramenta Básica de Busca de Alinhamento Local
CCU	Câncer do colo do útero
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DST	Doença sexualmente transmissível
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
GP	Iniciador GP5+/GP6+
HC2	Captura híbrida de segunda geração
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HPVs	Papilomavírus humanos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICVT	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISH	Hibridação molecular <i>in situ</i>
JEC	Junção escamo-colunar
LAPER	Laboratório de Patologia do Estado de Roraima
LIEAG	Lesão intraepitelial de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial de baixo grau
LCR	Longa região de controle
MY	Iniciador MY09/MY11
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – quadro aberto de leitura
p53	Proteína 53
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
pRb	Proteína do retinoblastoma
SUS	Sistema Único de Saúde
PVs	Papilomavírus
RFLP	Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
RPM	Rotações por minuto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VLPs	Partículas semelhantes a vírus

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ng	Nanograma

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
1.1	PAPILOMAVÍRUS (PVS) – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
1.2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	20
1.2.1	Estrutura e organização do papilomavírus humano.....	24
1.2.2	Transcrição dos genes virais.....	25
1.2.3	Proteínas do HPV.....	26
1.3	INFECCÃO PELO HPV.....	27
1.3.1	História natural da infecção.....	27
1.3.2	HPV no processo carcinogênico.....	31
1.4	FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O CÂNCER CERVICAL.....	33
1.5	TRANSMISSÃO DO HPV.....	34
1.6	MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV.....	35
1.6.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e HPV.....	36
1.7	VACINAS.....	37
1.8	PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	38
1.9	DISTRIBUIÇÃO DO CCU NO BRASIL.....	39
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	OBJETIVO GERAL	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	MODELO DO ESTUDO.....	42
3.2	LOCAL DO ESTUDO.....	42
3.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	42
3.4	POPULAÇÃO DE ESTUDO	43
3.4.1	Critérios de inclusão	43
3.4.2	Critérios de exclusão	43
3.5	PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO DAS PACIENTES	43
3.6	COLHEITA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	44
3.7	PROCESSAMENTO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS.....	44
3.7.1	Extração do DNA	46
3.7.2	Reação em cadeia da polimerase.....	47
3.7.2.1	Amplificação do gene da globina.....	47
3.7.2.2	Amplificação do DNA para detecção do HPV.....	48
3.7.3	Sequenciamento.....	49
3.7.3.1	Purificação e quantificação dos produtos da PCR.....	49
3.7.3.2	Reação de sequenciamento.....	50
3.7.3.3	Purificação pela precipitação em EtOH/EDTA/Acetato de Sódio.....	51
3.7.3.4	Análise das sequências.....	51
3.7.3.5	Análise filogenética.....	52
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	PERFIL DEMOGRÁFICO, COMPORTAMENTAL E CLÍNICO DA AMOSTRA.....	53
4.2	DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO HPV.....	55
4.3	HPVs IDENTIFICADOS EM RORAIMA X VACINA ANTI-HPV.....	65

4.4	HPV 16 E HPV 18 X DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS.....	67
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXOS.....	81

INTRODUÇÃO

Os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que, a partir de 2030, serão registrados 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer a cada ano no planeta em virtude do crescimento e do envelhecimento da população. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que também é válida para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer (BRASIL, 2014).

O câncer do colo do útero (CCU) é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo, com cerca de 530.000 novos casos a cada ano. Em torno de 86% desses casos ocorrem em países em desenvolvimento, onde constitui a segunda maior causa de morte por câncer na população feminina (de SANJOSE et al., 2012). No Brasil, são esperados, para o corrente ano, 15.590 casos novos de CCU, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCU é o mais incidente na região Norte (23,57/100 mil). Para o Estado de Roraima, são esperados, para o mesmo período, 50 casos novos (21,29/100 mil) (BRASIL, 2014).

O desenvolvimento do CCU tem como causa principal a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (ZUR HAUSEN, 1999). A principal via de transmissão do HPV é a sexual e estima-se que mais de 50% das mulheres sexualmente ativas são infectadas em algum momento de sua vida (BASEMAN, KOUTSKY, 2005; HELLNER, MÜNGER, 2011). A infecção pelo HPV geralmente é assintomática e os parceiros não tratados são potenciais reservatórios desse patógeno (FRANCO, DUARTE-FRANCO, FERENCZY, 2001; WELLINGS et al., 1994). Além do CCU, o DNA do HPV já foi encontrado em amostras de outros tumores como de pênis, ânus, vulva, cabeça e pescoço, entre outros (CARPAGNANO et al., 2011; de SANJOSE et al., 2012). Estima-se que cerca de 5% de todos os cânceres são atribuídos à presença desse vírus (CUTTS et al., 2007).

Mais de 160 tipos de papilomavírus humanos (HPVs) são molecularmente conhecidos e cerca de 40 tipos infectam o trato genital (BURK, HARARI, CHEN, 2013; MUÑOZ et al., 2006). Estudos epidemiológicos apontam variações regionais na prevalência e distribuição dos tipos de HPVs (GARCIA-ESPINOSA, MORO-RODRIGUES, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, 2012). No Brasil, considerando os HPVs de

alto risco oncogênico, o HPV 16 é o mais prevalente em todas as regiões, todavia, há variações em relação aos outros tipos (RABELO-SANTOS et al., 2003).

A clara associação entre o HPV e o CCU permitiu o desenvolvimento de vacinas profiláticas e constitui uma promissora ferramenta no combate dessa neoplasia. O Brasil, em 2014, implantou, no Sistema Único de Saúde (SUS), a vacinação gratuita de meninas pré-adolescentes com a vacina tetravalente, que protege contra dois tipos oncogênicos de HPV (16 e 18) e dois tipos responsáveis por papilomas benignos (6 e 11) (BRASIL, 2014). Considerando que a vacina contra o HPV é tipo-específica, o conhecimento dos dados de distribuição geográfica dos tipos virais é importante para a questão custo-efetividade das políticas públicas para o controle do CCU (BRASIL, 2011; de SANJOSE et al., 2012).

Roraima encontra-se entre os Estados brasileiros de alta incidência de CCU. Localiza-se no extremo norte brasileiro, é região de fronteira internacional com a Guiana (nordeste) e com a Venezuela (noroeste). Uma parcela significativa da população é indígena que pertence a diferentes etnias, destacando-se entre elas a *Macuxi*. Parte da população indígena encontra-se aldeada, com grandes dificuldades de acesso aos programas de rastreio de CCU (exame de Papanicolaou) devido as barreiras físicas, culturais e linguísticas (FONSECA, 2010). O processo de migração é uma característica do Estado, haja visto que existe parte considerável da população oriunda de outros Estados brasileiros e dos países fronteiriços. Existe, por fatores socioeconômicos e culturais, um fluxo transfronteiriço entre os povos indígenas, pequenas vilas, da Venezuela e da Guiana. Esse fluxo é pouco controlado e formado por grupos altamente vulneráveis às situações de saúde, especialmente às doenças sexualmente transmissíveis (DST).

Nesse contexto, esta pesquisa tem como objetivo geral caracterizar o perfil genotípico da infecção pelo HPV na cérvix uterina no Estado de Roraima. Para isso, foram realizadas análises, por técnicas de biologia molecular, em material biológico proveniente da colaboração voluntária de mulheres selecionadas nos serviços de saúde especializados do Estado.

A magnitude do CCU em Roraima, um dos poucos Estados brasileiros em que a incidência de CCU supera o de câncer de mama, justifica este estudo. Além disso, o conhecimento da distribuição dos tipos oncogênicos mais prevalentes nas diferentes regiões geográficas e nas distintas populações contribui para o planejamento de estratégias de vacinas e, conseqüentemente, possibilita avaliar os

benefícios da implementação das mesmas, já que a vacina é tipo-específica. Destarte, esse estudo espera contribuir no conhecimento dos tipos de HPVs circulantes no Estado de Roraima, uma vez que ainda não existem estudos publicados. Trata-se, portanto, de um estudo inédito.

Esta dissertação está estruturada em quatro capítulos. No capítulo 1 é apresentada uma abordagem geral sobre o HPV, considerando sua estrutura, a relação com o CCU e os métodos de detecção e identificação. No capítulo 2 são apresentados os objetivos do estudo. No capítulo 3 é descrita a metodologia. No capítulo 4 os resultados são apresentados e discutidos.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 PAPILOMAVÍRUS – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Originalmente, os Papilomavírus (PVs) e os Poliomavírus, por apresentarem capsídeo não envelopado e genoma constituído de DNA circular de dupla fita, estavam agrupados na mesma família – *Papovaviridae*. No entanto, o reconhecimento dos diferentes tamanhos e organizações genômicos e da pouca similaridade nas sequências de aminoácidos desses vírus, permitiu ao Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICVT – International Committee on the Taxonomy of Viruses) a reorganização em duas famílias distintas: *Polyomaviridae*, que compreende os Poliomavírus, e a *Papillomaviridae*, que inclui os Papilomavírus distribuídos em 16 gêneros denominados pelas letras do alfabeto grego (Figura 1) (BERNARD et al., 2010; de VILLIERS et al., 2004).

Genomas de PVs têm sido isolados e caracterizados em diversos vertebrados, como em espécies de aves (TERAI et al., 2002), de répteis (HERBST, 2008), de marsupiais (BENNETT, 2010) e em mais de 20 espécies de mamíferos, dentre estes, os humanos (BERNARD et al., 2010; DOORBAR, 2005). Entretanto, os PVs são considerados espécies-específicos (CAMPO, 2006), que infectam o epitélio podendo causar neoplasias ou permanecer na forma assintomática (BERNARD et al., 2010).

Tradicionalmente, os PVs são descritos como “tipos”. A partir do uso da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), do uso de iniciadores consensos e degenerados e do sequenciamento dos ácidos nucleicos, algumas centenas de novos tipos foram identificadas (de VILLIERS et al., 2004).

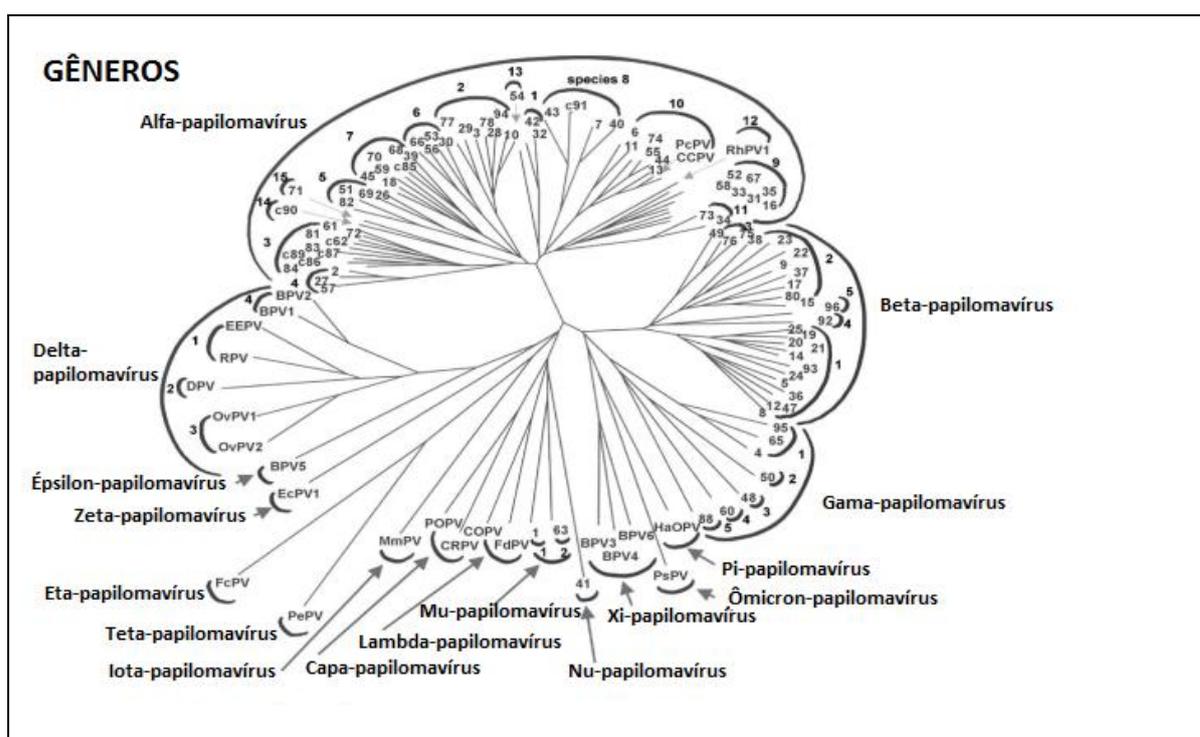
1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus humanos (HPVs) são os vírus, de transmissão sexual, mais comuns em pessoas jovens de ambos os sexos (de SANJOSE et al., 2012). Mais de 160 tipos de HPVs são molecularmente conhecidos e estão classificados em

gêneros (Figura 2) (DOORBAR et al., 2012; BURK, HARARI, CHEN, 2013). Aproximadamente 60 desses tipos são os de maior prevalência e pertencem ao gênero Alfa-papilomavírus (BERNARD et al., 2010).

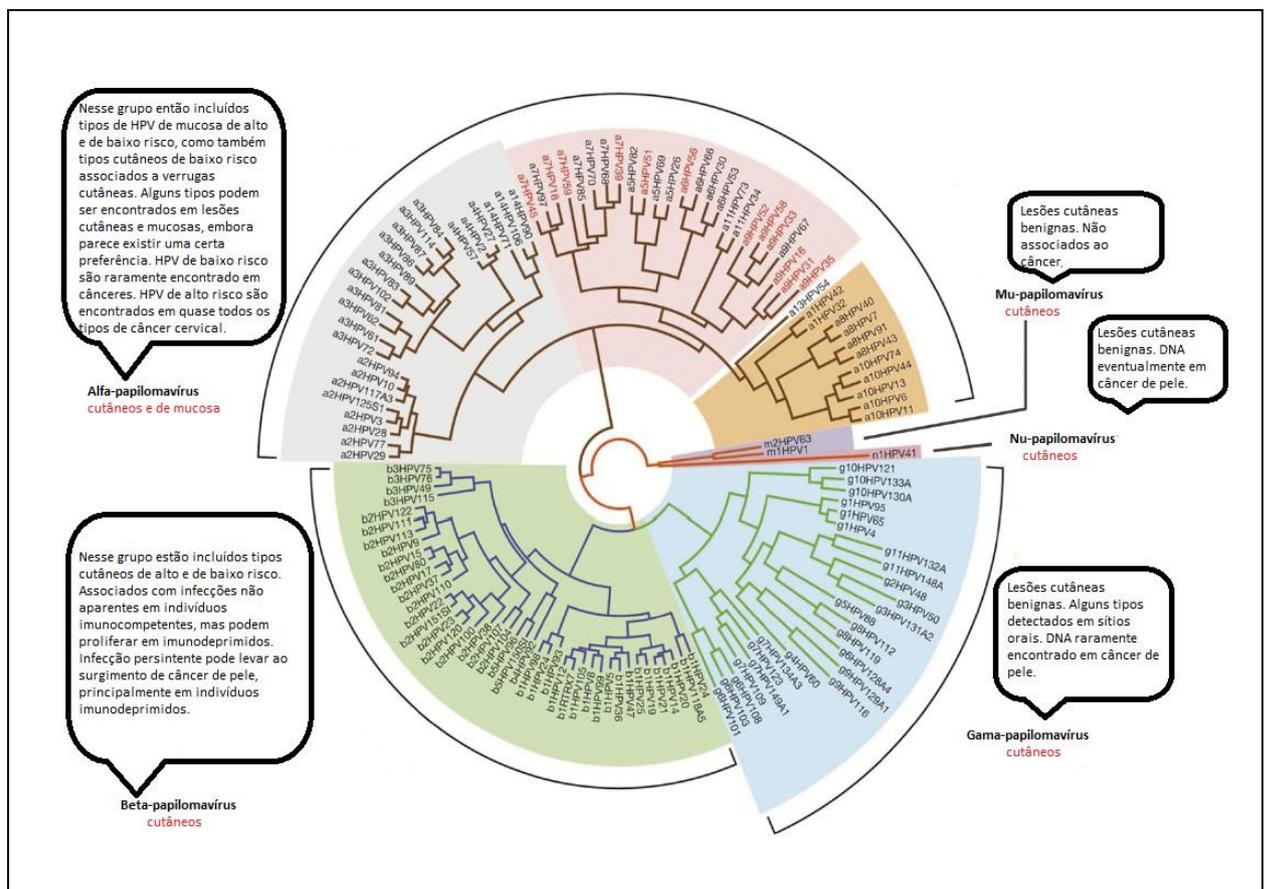
Os HPVs infectam principalmente a pele e as membranas mucosas (KOSS, GOMPEL, 2006) podendo induzir o desenvolvimento de tumores benignos como verrugas e papilomas, como também lesões com potencial maligno (de VILLERS et al., 2004). A doença mais estudada em relação à infecção por HPV é o CCU, que parece ter nesse vírus a sua causa principal (ZUR HAUSEN, 1999). Outros tipos de câncer também têm sido relacionados ao HPV (BOSCOLO-RIZZO et al., 2013; CARPAGNANO et al., 2011) sendo os tumores anogenitais, de cabeça e de pescoço os mais conhecidos (BURK, HARARI, CHEN, 2013).

Figura 1 - Árvore filogenética dos PVs mostrando os gêneros, espécies e seus respectivos tipos



são eliminadas pelo sistema imunológico no período de 2 anos. A infecção persistente aumenta o risco de desenvolver lesões pré-neoplásicas e, em seguida, neoplásicas (KUMAR et al., 2010). Fatores como predisposição genética, tipo viral, frequência de reinfecção, coinfeção, níveis hormonais e condições imunes do organismo podem interferir na eliminação do vírus (SCHLECHT et al., 2001).

Figura 2: Relação de evolução entre os papilomavírus humanos



Fonte: DOORBAR et al. (2012) modificado.

Epidemiologicamente, os HPVs são classificados de acordo com o seu potencial oncogênico em baixo risco, alto risco e de possível alto risco (Tabela 1) (DOORBAR et al., 2006; DOORBAR et al., 2012; MUÑOZ et al., 2006). Os HPVs de baixo risco estão usualmente associados a verrugas cutâneas benignas e os de alto risco associados a neoplasias cervicais (DOORBAR, 2006).

As variações regionais na prevalência e distribuição dos tipos de HPVs foram verificadas em vários estudos epidemiológicos (GARCIA-ESPINOSA, MORO-RODRIGUES, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, 2012). A nível mundial, o HPV 16 é o mais prevalente em carcinomas invasivos da cérvix, seguido dos tipos 18 e 45 (MUÑOZ et al., 2003). No Brasil, considerando os HPVs de alto risco, o HPV 16 é o mais prevalente em todas as regiões, no entanto, há variações em relação aos outros tipos (RABELO-SANTOS et al., 2003).

Tabela 1 - Doenças associadas aos papilomavírus do gênero Alfa

Gênero + espécies	Tipo	Câncer Cervical Invasivo	IARC Categoria	Carcinoma Células Escamosas	Adenocarcinoma	Tropismo
Alfa 1	HPV 32		3			mucoso
	HPV42					mucoso
Alfa 2	HPV3					cutâneo
	HPV10					cutâneo
	HPV28		3			cutâneo
	HPV29		3			cutâneo
	HPV77		3			cutâneo
	HPV94					cutâneo
	HPV117					cutâneo
Alfa 3	HPV125					cutâneo
	HPV61	0,01	3			cutâneo
	HPV62		3			cutâneo
	HPV72		3			cutâneo
	HPV81		3	0,4		cutâneo
	HPV83		3	0,4		cutâneo
	HPV84		3			mucoso
	HPV86		3			mucoso
	HPV87		3			mucoso
	HPV89		3			mucoso
	HPV102					mucoso
Alfa 4	HPV114					mucoso
	HPV2		3			cutâneo
	HPV27		3			cutâneo
Alfa 5	HPV57		3			cutâneo
	HPV26	0,37	2	0,22		mucoso
	HPV51	1,25	1	0,75	0,54	mucoso
	HPV69	0,08	2			mucoso
Alfa 6	HPV82	0,07	2	0,26		mucoso
	HPV30	0,37	2			mucoso
	HPV53	0,26	2	0,04		mucoso
	HPV56	0,84	1	1,09		mucoso
Alfa 7	HPV66	0,08	2	0,19		mucoso
	HPV18	10,28	1	11,27	37,3	mucoso
	HPV39	1,67	1	0,82	0,54	mucoso
	HPV45	5,68	1	5,21	5,95	mucoso
	HPV59	1,08	1	1,05	2,16	mucoso
	HPV68	1,04	2	0,37		mucoso
	HPV70	0,11	2			mucoso
	HPV85		2			mucoso
Alfa 8	HPV97					mucoso
	HPV7		3			Cutâneo/mucoso
	HPV40		3			Cutâneo/mucoso
Alfa 9	HPV43					Cutâneo/mucoso
	HPV91	0,01	3			Cutâneo/mucoso
	HPV16	61,35	1	54,38	41,62	mucoso
	HPV31	3,35	1	3,82	1,08	mucoso
	HPV33	3,83	1	2,06	0,54	mucoso
	HPV35	1,94	1	1,27	1,08	mucoso
	HPV52	2,71	1	2,25		mucoso
Alfa 10	HPV58	2,22	1	1,72	0,54	mucoso
	HPV67	0,31	2			mucoso
	HPV6	0,11	3	0,07		mucoso
	HPV11	0,02	3	0,07		mucoso
Alfa 11	HPV13		3			mucoso
	HPV44	0,01	3			mucoso
	HPV74	0,01	3			mucoso
Alfa 11	HPV34	0,07				mucoso

Tabela 1 continuação - Doenças associadas aos papilomavírus do gênero Alfa

	HPV73	0,52	0,49	mucoso
Alfa 12	HPV73			mucoso
Alfa 13	HPV54			mucoso
Alfa 14	HPV71			mucoso
	HPV90		3	mucoso
	HPV106		3	mucoso

Classificação do risco oncogênico (IARC - International Agency for Research on Cancer): 1 - Alto risco; 2 - Possível alto risco; 3 - Baixo risco. Fonte: DOORBAR et al. (2006); DOORBAR et al. (2012).

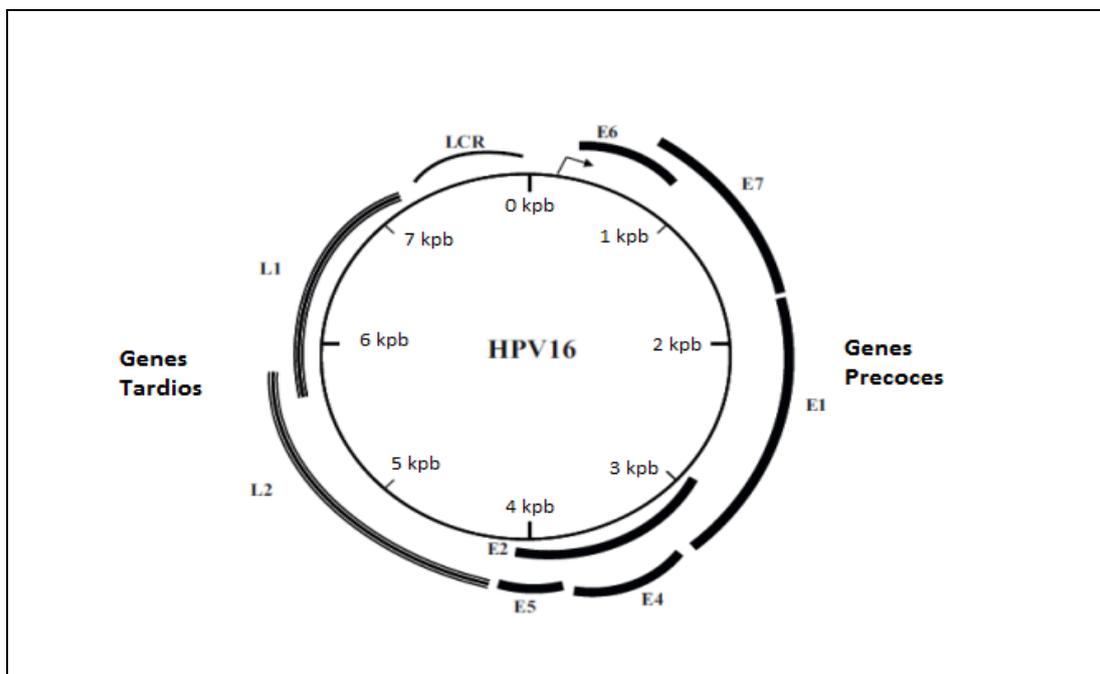
1.2.1 Estrutura e organização do papilomavírus humano

Os HPVs são vírus pequenos, não envelopados e possuem DNA circular, de fita dupla, envolto por um capsídeo icosaédrico de 72 capsômeros e medem cerca de 55nm de diâmetro (ALVARENGA et al, 2000; FINNEM et al, 2003; LEONARDO et al, 2011; ZHENG, BAKER, 2006). Apesar de o genoma viral variar ligeiramente em tamanho entre os diferentes tipos de HPVs, geralmente contém cerca de 8.000 pares de bases (pb) (BURK, CHEN, van DOORSLAER, 2009; DOORBAR, 2006).

O genoma do HPV possui 8 sequências codificantes para proteínas (ORF Open Reading Frame – quadro aberto de leitura) (Figura 3) (DOORBAR et al., 2006) e pode ser dividido em 3 regiões: uma região que codifica proteínas de expressão precoce E (Early) implicadas na transcrição e replicação (E1, E2, E4, E5, E6, E7); uma região de expressão tardia L (Late) responsável pela síntese das proteínas do capsídeo (L1 e L2); e uma região reguladora LCR (Long Central Region), também conhecida como URR (Upstream Regulation Region), de 850 pb, não-codificante (não contém ORF), que funciona na regulação dos processos de replicação e transcrição viral (BORZACCHIELLO, ROPERTO, 2008; de VILLERS et al., 2004; DOORBAR, 2006; ZHENG, BAKER, 2006).

A análise das sequências do genoma viral permitiu estabelecer a classificação de tipo, subtipo e variante. Para isso, foi utilizada a região mais conservada do genoma, a região L1. Um novo tipo de HPV é reconhecido se a sequência L1 diferir em mais de 10% do HPV conhecido mais próximo. Quando a variação estiver entre 2% e 10% define-se um subtipo e menos de 2% define uma variante. Mutações e recombinações no genoma do HPV são raras (de VILLERS et al, 2004).

Figura 3- Organização do genoma viral do HPV 16



Fonte: GANGULY, PARIHAR (2009) modificado.

1.2.2 Transcrição dos genes virais

No genoma do papilomavírus, frequentemente, a ORF é referida como um gene. A ORF codifica um peptídeo através de combinações de diferentes *exons* com *splicing* dos *íntrons* (ZHENG, BAKER, 2006). A Longa Região de Controle do genoma viral, apesar de não codificar proteínas, possui a origem de replicação e importantes sítios de ligação de fatores de transcrição (BERNARD, 2002).

O genoma do HPV 16, que foi bastante estudado, contém dois promotores bem conhecidos. O promotor P97, que é responsável por grande parte da expressão gênica precoce, está localizado a *upstream* da ORF E6 (SMOTKIN, WETTSTEIN, 1986). O promotor P670, responsável pela transcrição dos genes tardios, encontra-se dentro da ORF E7 (GRASSMANN et al, 1996).

A maioria dos transcritos dos papilomavírus são multicistrônicos e sofrem processamento alternativo do RNA. Isso permite a esses vírus codificarem muitas proteínas mesmo possuindo um genoma compacto (ZHENG, BAKER, 2006).

1.2.3 Proteínas do HPV

A expressão gênica viral permite a síntese de duas proteínas estruturais (L1 e L2) expressas a partir da região tardia e seis proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) a partir da região precoce (ZHENG, BAKER, 2006).

O arranjo das proteínas L1 e L2 formam o capsídeo do HPV. A proteína L1, apresenta, dentre outras, a função de mediar a ligação viral na superfície celular. A proteína L2 está relacionada à encapsidação do genoma viral (FAY et al., 2004; STTAUFFER et l., 1998).

As proteínas E1 e E2 estão envolvidas nos processos de replicação do DNA viral e de transcrição precoce. Já as proteínas E5, E6, e E7 estão relacionadas com a atividade oncogênica que induz à transformação e à imortalização celular (ZHENG, BAKER, 2006). E a proteína E4 interage com o citoesqueleto da célula hospedeira, estando, portanto, envolvida com a liberação de novos vírions (BOULET et al, 2007). Na Tabela 2 estão resumidas as principais funções das proteínas do HPV.

Tabela 2 - Funções das proteínas do papilomavírus humano

Proteína	Função
E1	Função de helicase, essencial para replicação viral e controle da transcrição.
E2	Regula a transcrição e a replicação viral. Controla a região de expressão precoce.
E4	Interage com proteínas do citoesqueleto, por isso contribui na liberação de novos vírions das células do hospedeiro.
E5	Interage com receptores que favorece a síntese de DNA e a proliferação celular.
E6	Envolvida na transformação celular; se liga e degrada a proteína 53 (p53), possuindo um efeito antipoptótico celular; ativa a telomerase; induz a instabilidade genômica.
E7	Envolvida na transformação celular; se liga e inativa a proteína do retinoblastoma (pRb), liberando o fator de transcrição E2F; induz a instabilidade genômica.
L1	Compõe o capsídeo viral; medeia a ligação viral na superfície celular.
L2	Compõe o capsídeo viral; relacionada à encapsidação do genoma viral.

Fonte: BOULET et al. (2007).

1.3 INFECÇÃO PELO HPV

1.3.1 História natural da infecção

As infecções genitais por HPVs são extremamente comuns. A maioria é assintomática e não causa qualquer alteração tecidual e, conseqüentemente, não é detectada nos exames citológicos de *Papanicolaou*. Geralmente, 80 a 90% das infecções são eliminadas pelo sistema imunológico no período de 2 anos. Em média, as infecções por HPVs de alto risco oncogênico duram mais tempo que as associadas aos HPVs de baixo risco. A infecção persistente aumenta o risco de desenvolver lesões pré-neoplásicas e, em seguida, neoplásicas (KUMAR et al., 2010; STANLEY, 2008).

No colo do útero normal são encontrados dois tipos de epitélio, o epitélio escamoso estratificado não queratinizado, que reveste a ectocérvice, e o epitélio colunar simples que reveste a endocérvice (KOSS, GOMPEL, 2006). O encontro desses dois epitélios é chamado zona de transformação ou junção escamo-colunar (JEC). (MACHADO JUNIOR, DALMASO, CARVALHO, 2008; ROCHA ZAVALITA et al., 2004). O colo uterino possui extensas áreas de epitélio escamoso metaplásico imaturo, o que torna a região mais vulnerável à infecção pelo HPV quando comparada com a pele e a mucosa da vulva, que são recobertas por células escamosas maduras (DOORBAR et al., 2012; KOSS, GOMPEL, 2006; KUMAR et al., 2010).

O câncer invasivo do colo do útero é, em termos gerais, uma lesão que progride lentamente (Figura 4). Histologicamente, as lesões pré-cancerosas da cérvice se caracterizam por desorganização da arquitetura do epitélio escamoso, atipias nucleares e mitoses anômalas. A graduação dessas lesões costuma basear-se no nível de anomalias epiteliais. As lesões denominadas como neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I) são definidas pela presença de células com diferenciação alterada presentes no terço inferior do epitélio. As lesões denominadas como neoplasia intraepitelial cervical grau II (NIC II) são diagnosticadas quando as células com diferenciação alterada ocupam os 2/3 inferiores do estrato epitelial. E neoplasia intraepitelial grau III (NIC III) é definida quando as células indiferenciadas

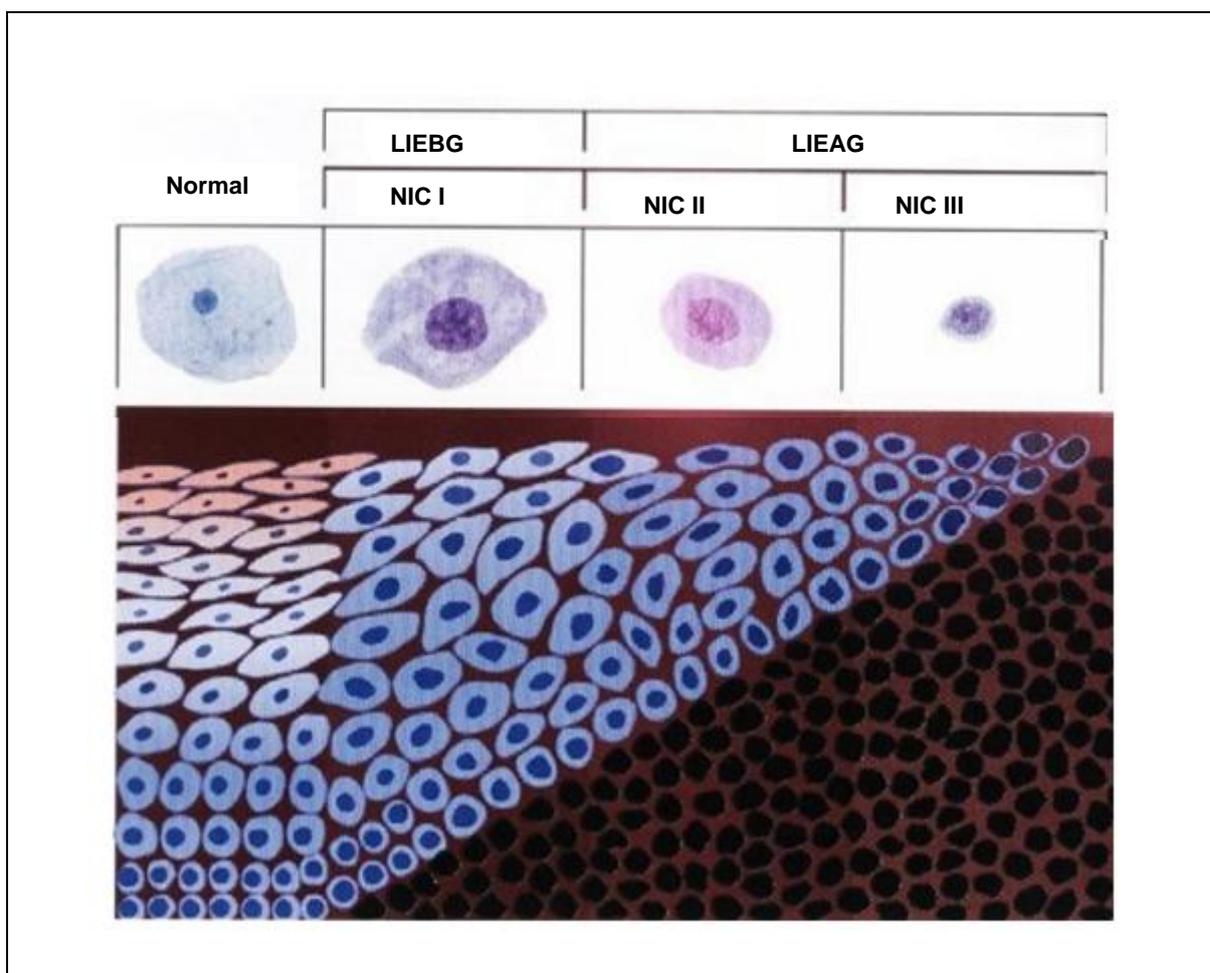
comprometem mais de 2/3 do epitélio (de PALO, 1996), conforme demonstrado na figura 5. No entanto, as lesões pré-neoplásicas também podem ser graduadas pelo Sistema de Bethesda. Nesta classificação, consideram-se como lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) as lesões compatíveis com NIC I. Já as NIC II e NIC III são consideradas como lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG) (KOSS, GOMPEL, 2006). Além de infectar as células escamosas, os HPVs também podem infectar as células glandulares, resultando em adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (DOORBAR et al., 2012; KUMAR et al., 2010).

Figura 4 - História natural da infecção pelo HPV. Probabilidade de progressão das lesões pré-malignas de colo do útero. As probabilidades de regressão e persistência não estão ilustradas



Fonte: MC-INDOE, 1994; ÖSTOR, 1993; ZEFERINO, 1998 apud MARTIN (2014) modificado.

Figura 5 – Histologia das lesões pré-neoplásicas do colo do útero



Nota: LIEBG = lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG = lesão intraepitelial de alto grau; NIC I = neoplasia intraepitelial cervical grau I; NIC II = neoplasia intraepitelial cervical grau II; NIC III = neoplasia intraepitelial cervical grau III.
 Fonte: <http://image.slidesharecdn.com> (modificado).

A infecção viral começa com a chegada do vírus HPV nas células basais através de microabrasões do epitélio estratificado que expõe a camada basal ao ambiente (Figura 5) (DOORBAR, 2005). A internalização do vírus e posterior transferência do genoma viral para o núcleo consiste de uma série consecutiva de passos. É relevante o papel do capsídeo viral nessa transferência (DOORBAR et al., 2012; PELKMANS, HELENIUS, 2003). Modelos experimentais sugerem que a entrada do vírus na célula hospedeira requer a interação da proteína L1 com proteoglicanos de sulfato de heparina da superfície celular (DAY, LOWY, SCHILLER, 2003).

A internalização do vírus HPV acontece por endocitose e as principais vias endocíticas relatadas são aquelas mediadas pela clatrina e caveolina (DAY, LOWY, SCHILLER, 2003; DOORBAR, 2005; PELKMANS, HELENIUS, 2003).

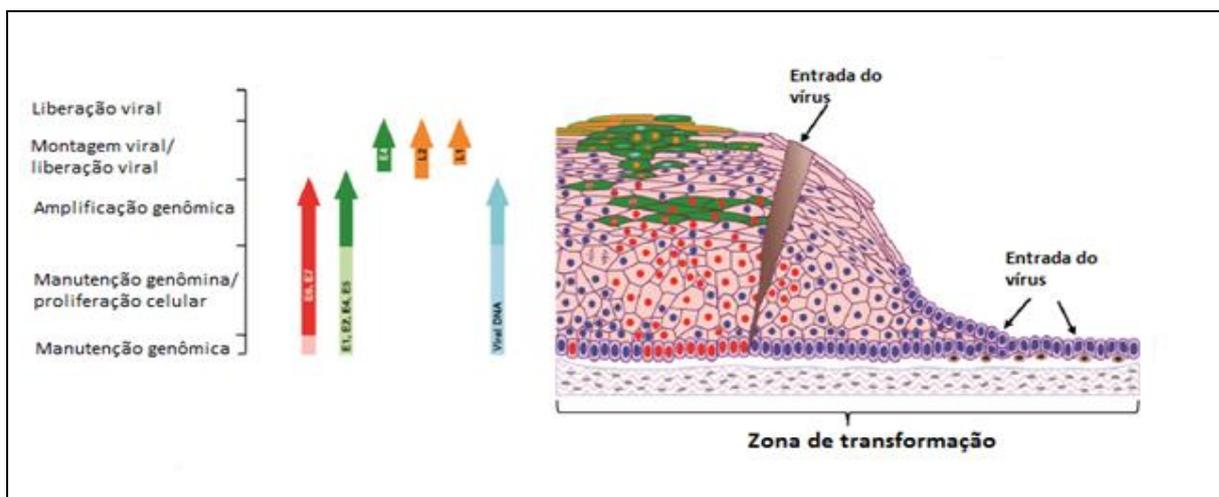
O ciclo de vida do HPV depende da diferenciação das células epiteliais. Acredita-se que a infecção inicia-se quando as partículas virais atingem as células de reserva do epitélio cervical, que se encontram imediatamente debaixo do epitélio da endocérvice, ou as células-tronco basais (*basal stem cells*) encontradas nas imediações da zona de transformação. À medida que as células basais se dividem, o epitélio vai sofrendo diferenciação e tais células migram para a superfície. O processo de divisão celular permite que as células infectadas pelo HPV distribuam o DNA viral entre as duas células filhas. Uma delas sofre diferenciação enquanto a outra, indiferenciada, permanece na camada basal constituindo um reservatório do DNA viral (DOORBAR, 2005; DOORBAR et al., 2012).

Para a produção de vírions infectantes, os vírus precisam replicar seu genoma e empacotá-lo em partículas. A replicação ocorre nas células em proliferação (células basais e parabasais) (DOORBAR, 2005) e resulta na produção de cerca de 20 a 100 cópias de DNA extracromossômico por célula. Essa média de número de cópias é mantida estável em todo o curso da infecção (LONGWORTH, LAIMINS, 2004). As proteínas E1 e E2 são essenciais para a replicação do DNA viral nessa fase. A ligação de E2 à região regulatória do genoma viral é condição necessária para que ocorra a replicação e recrutamento de E1, que atua como helicase na origem da replicação. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio o HPV sintetiza as proteínas L1 e L2 e acontece a montagem do capsídeo viral (Figura 5). A liberação dos vírions para o ambiente é beneficiada pelo *turn-over* natural das células do epitélio (DOORBAR, 2005; MUÑOZ, 2006; ZHENG, BAKER, 2006).

O estado físico do vírus difere nas diferentes lesões. Geralmente encontra-se integrado ao DNA do hospedeiro nas neoplasias e como DNA epissomal nas lesões pré-neoplásicas (KUMAR et al., 2010).

A capacidade do organismo para eliminação da infecção por HPV está associada com fatores como predisposição genética, níveis hormonais, resposta imune, variantes virais, coinfeção com outros tipos virais e frequência de reinfeção (SCHLECHT et al., 2001).

Figura 6 - Ciclo do HPV no epitélio cervical



Fonte: DOORBAR et al (2012) modificado.

1.3.2 HPV no processo carcinogênico

A persistência da infecção por HPV, principalmente a dos tipos de alto risco oncogênico, pode levar à integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira e originar transformação celular. As proteínas virais E6 e E7 são fundamentais para o efeito oncogênico do HPV. Existem diferenças entre as proteínas E6/E7 dos tipos de HPV de alto e de baixo risco, mas são, muitas vezes, de natureza quantitativa ao invés de qualitativa (LONGWORTH, LAIMINS, 2004; MUÑOZ, 2006).

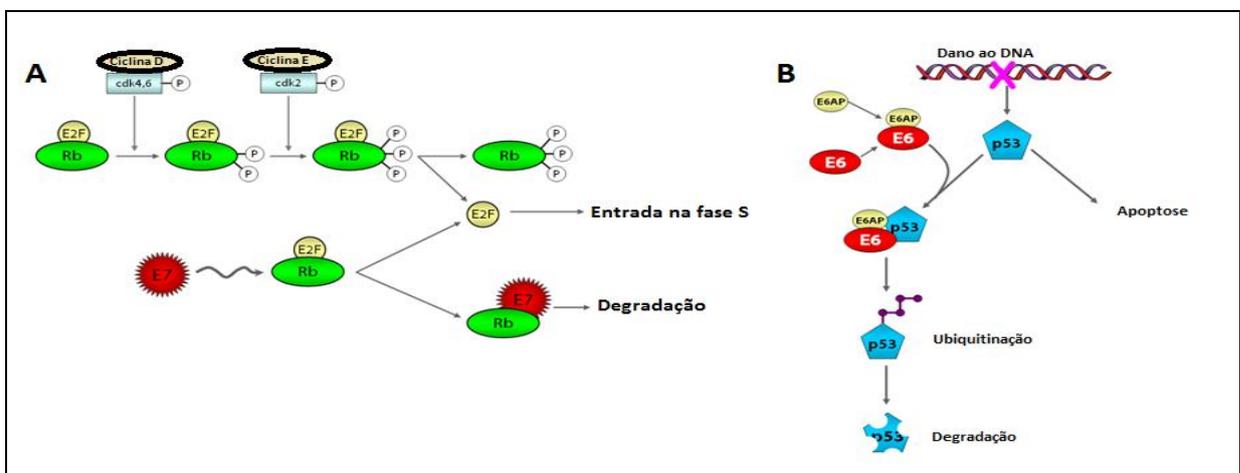
A integração do genoma do HPV ao genoma da célula hospedeira ocasiona a linearização entre os genes E1 e L1 e a inativação do gene E2, por corte ou deleção no momento da integração. O gene E2 codifica uma proteína responsável pela regulação da expressão dos genes E6 e E7 e, sua perda, leva à superexpressão dos genes E6 e E7, uma vez que os produtos do gene E2 reprimem a expressão dos genes E6 e E7 (DOORBAR, 2006; KANODIA et al, 2007).

As proteínas E6 e E7, produtos dos genes E6 e E7, podem: promover o ciclo celular pela ligação à proteína do retinoblastoma (pRb) e suprarregulação da ciclina E (E7); interromper as vias de morte celular pela ligação à proteína 53 (p53) (E6); induzir a duplicação de centrosomos e a instabilidade genômica (E6, E7); e prevenir a senescência replicativa pela suprarregulação da telomerase (E6). A proteína E6 induz a degradação rápida de p53 por proteólise dependente de

ubiquitina, reduzindo os níveis de p53 em duas a três vezes, o que inibe a degradação proteolítica da célula. A ligação de E7 a pRb ativa o fator de transcrição E2F, o que desencadeia a expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA e promove a entrada precoce na fase S (Figura 6). As constantes atividades das proteínas virais E6 e E7 conduzem ao aumento da instabilidade genômica, mutações, perda de controle do crescimento celular e, finalmente, câncer (KUMAR et al, 2010; MUÑOZ et al, 2006; zur HAUSEN, 2002).

Na maioria dos cânceres cervicais, o DNA do HPV 16 encontra-se integrado no genoma da célula do hospedeiro em cerca de 70% das vezes. Já o DNA do HPV 18, quase que exclusivamente, encontra-se integrado (FEHRMANN, LAIMINS, 2003). No entanto, em ambos os casos, é a expressão de longo tempo e, em particular, a superexpressão de E6 e E7 e a acumulação de erros genéticos, que são importantes na progressão da NIC 3 ao câncer cervical (DOORBAR, 2012).

Figura 7 - Interação das oncoproteínas E6 e E7 do HPV com proteínas celulares supressoras de tumor



A: A proteína E7 do HPV liga-se à forma hipofosforilada de pRb resultando na liberação de E2F, que favorece a entrada da célula na fase S do ciclo celular. **B:** A proteína E6 do HPV liga-se a uma ligase celular ubiquitina / proteína (E6-AP) e, simultaneamente, com p53, resultando na ubiquitinação de p53 e a sua subsequente degradação proteolítica (JO, KIM, 2005).

1.4 FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O CÂNCER CERVICAL

O HPV é a causa necessária para CCU mas não é causa suficiente, estando, geralmente associado a outros cofatores. Como cofatores estabelecidos podem ser citados tabagismo, paridade, número de parceiros sexuais, sexarca precoce, utilização de contraceptivos orais e a co-infecção com o HIV. Já a co-infecção com *Chlamydia trachomatis*, vírus *Herpes simplex* tipo 2, imunossupressão e certas deficiências alimentares são ditos cofatores prováveis (de SANJOSE et al., 2012; MUÑOZ et al., 2006).

A alta paridade pode aumentar o risco para CCU uma vez que a zona de transformação da cérvix uterina fica muitos anos exposta e facilita a exposição ao HPV, embora fatores hormonais também possam estar envolvidos (de SANJOSE et al., 2012; MUÑOZ et al., 2006).

Estudos de aspectos do comportamento sexual, dentre eles o número de parceiros e a idade da primeira relação sexual, demonstram que o maior número de parceiros sexuais e o início precoce da atividade sexual estão relacionados com a infecção por HPV, que constitui a principal causa de CCU (AACR, 2009).

O mecanismo através do qual o uso de anticoncepcionais orais podem atuar como um cofator é que a expressão do gene do HPV pode ser favorecida pela resposta hormonal do genoma viral (COGLIANO et al., 2005; LOUVANTO et al., 2010; MUÑOZ et al., 2006). O risco de CCU parece aumentar com a duração do uso de anticoncepcionais orais (de SANJOSE et al., 2012).

O tabagismo pode contribuir para diminuir a resposta imune no colo do útero, interferir no metabolismo dos hormônios femininos e por danos diretos causados por agentes carcinogênicos relacionados ao tabaco (LOUVANTO et al., 2010; MUÑOZ et al., 2006). As mulheres fumantes têm um risco aumentado de CCU em comparação com aquelas que nunca fumaram (de SANJOSE et al., 2012).

O papel específico dos agentes infecciosos na patogênese do CCU tem sido demonstrado em muitos estudos epidemiológicos. É provável que o aumento do risco associado ao *Herpes simplex 2* e à *Chlamydia trachomatis* é, pelo menos em parte, o resultado da resposta inflamatória que tem sido associada à geração de radicais livres e desenvolvimento de instabilidade genética. Mulheres com imunossupressão causada pela infecção pelo HIV ou transplante de órgãos,

possuem risco maior quando comparados com mulheres saudáveis (MUÑOZ et al., 2006). Já um estudo sobre os cofatores da integração do DNA do HPV 16 ao genoma da célula hospedeira, demonstrou um possível envolvimento do CMV (*Citomegalovírus*) e do EBV (*Epstein-Barr Vírus*) como contribuintes no desenvolvimento de CCU (SZOSTEK et al., 2009).

Os poucos estudos publicados sobre os fatores nutricionais demonstraram um possível efeito protetor da dieta rica em frutas, legumes, vitaminas C e E, beta -caroteno e licopeno (MUÑOZ et al., 2006).

1.5 TRANSMISSÃO DO HPV

A principal via de transmissão do HPV é a sexual através do contato direto da mucosa (de SANJOSE et al., 2012). A grande maioria dos homens e mulheres sexualmente ativa foi infectada pelo HPV pelo menos uma vez na vida (BURCHELL et al., 2006). O vírus pode ser facilmente transmitido pelo contato sexual e muitos tipos podem ser transmitidos simultaneamente em uma única relação sexual (HELLNER, MÜNGER, 2011). A infecção por um tipo de HPV não influencia a duração ou persistência da infecção por outro tipo (SCHIFFMAN et al., 2010). A maioria dos indivíduos permanece assintomática após a aquisição da infecção, sendo que apenas um pequeno percentual irá desenvolver lesão clínica ou histologicamente reconhecível (KANODIA, FAHEY, KAST, 2007).

A transmissão por via não sexual (familiar ou nosocomial por fômites) também é considerada, que pode ser representada por toalhas, roupas íntimas, etc (FERENCZY, BARGERON, RICHART, 1989). A transmissão iatrogênica da infecção, ocasionadas por instrumentos cirúrgicos, luvas, compressas e, até mesmo pela fumaça que se forma quando da utilização do *laser*, deve ser reconhecida, embora o risco seja pequeno (KOSS, GOMPEL, 2006).

A transmissão vertical, das mães para suas proles, é possível quando existem lesões no momento do parto, e é responsável pela papilomatose laríngea juvenil. É possível que em muitos casos o vírus seja transmitido já ao nascimento, permanecendo latente durante toda a vida dessa pessoa. Conseqüentemente, a existência do vírus não indica, de forma obrigatória, a presença de lesões morfológicas (KOSS, GOMPEL, 2006).

1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV

O diagnóstico das lesões precursoras e da neoplasia invasora do colo do útero baseia-se no tripé clássico: citopatologia (teste de *Papanicolaou*), colposcopia e exame histopatológico (JACYNTHO, 2001).

O exame de *Papanicolaou* consiste no estudo das células que descamam da parte externa (ectocérvice) e interna (endocérvice) do colo do útero. Atualmente é o meio mais utilizado na rede de atenção básica à saúde por ser indolor, barato e eficaz (BEZERRA et al, 2005). Quando a análise citológica apresenta alteração, é realizada biópsia que, dirigida pela colposcopia, firma o resultado citológico e determina o tratamento (SOUZA, MELO, CASTRO, 2001). Entretanto, a infecção pelo HPV pode ser assintomática e, dessa forma, não apresenta alteração citológica (KOSS, GOMPEL, 2006).

O diagnóstico da infecção pelo HPV baseado em testes moleculares começou a ser utilizado na década de 80, quando as técnicas que utilizam sondas de ácidos nucléicos começaram a estar comercialmente disponíveis (HUBBARD, 2003).

Os testes moleculares podem ser classificados basicamente em três tipos de hibridização (1) Hibridação molecular com sondas de ácidos nucléicos (*Southern blot*, *dot blot*, hibridação *in situ* (ISH) e hibridação *in situ* com fluorescência (FISH): foram as primeiras técnicas utilizadas, possuem sensibilidade variada e são laboriosas; 2) Sistema de captura híbrida (teste de captura híbrida): excelente ferramenta para triagem em massa de pacientes com anormalidades citológicas, embora não determine o tipo viral específico. Embasado na detecção pela quimioluminescência, onde fragmentos contendo o DNA alvo são hibridizados com uma mistura específica de sondas de RNA. O híbrido resultante (RNA-DNA) é capturado por anticorpo conjugado com fosfatase alcalina sendo sua detecção realizada por meio de um substrato quimioluminescente (KOSS, GOMPEL, 2006); 3) Reação de amplificação (PCR): técnica promissora que permite a multiplicação *in vitro* de regiões específicas do DNA e pode ser usada para detecção, genotipagem e quantificação da carga viral (HUBBARD, 2003; MOLIJN et al, 2005).

1.6.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e HPV

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) é uma técnica molecular descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 (FARAH, 2007). A PCR é o método de amplificação mais amplamente utilizado, consiste num processo de termociclagem que emprega oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região de interesse para amplificar DNA na presença de uma polimerase termoestável (MOLINJ et al., 2005). A PCR explora a capacidade de replicação do DNA e pode, teoricamente, produzir um bilhão de cópias a partir de uma única molécula após 30 ciclos de amplificação (VILLA, DENNY, 2006). O processo é composto de três etapas: desnaturação (a fita dupla de DNA é separada em duas fitas simples), anelamento (iniciadores ligam-se especificamente a sequências complementares do DNA alvo de fita simples) e extensão (a DNA polimerase gera as fitas filhas a partir da sequência original), que juntas correspondem a um ciclo da reação (KOSS, GOMPEL, 2006).

Para a detecção do HPV por métodos baseados em PCR, é comum o uso dos iniciadores complementares ao gene L1 do HPV e os mais utilizados são: MY09/11 (MANOS et al, 1989) e sua versão modificada PGMY09/11, GP5+/6 + (de RODA et al., 1995) e SPF10, que permitem determinar um amplo espectro de genótipos de HPV (HUBBARD et al., 2003).

Estudos mostram que na identificação de todas as amostras infectadas pelo HPV, é necessário o uso de mais de um sistema simultaneamente, haja visto que a sensibilidade e a especificidade da PCR podem variar de acordo com o sistema de iniciadores utilizados, pois alguns iniciadores podem amplificar preferencialmente certos tipos de HPV (HAWS et al., 2004).

A identificação dos genótipos do HPV, a partir da técnica de PCR com iniciadores genéricos, pode ser feita por diversas metodologias, dentre elas, o sequenciamento (MOLINJ et al., 2005). Descrito inicialmente por Sanger (1981), vem sendo utilizado em muitos estudos como meio de identificação do vírus, por permitir a identificação precisa de praticamente todos os tipos, inclusive com identificação de tipos raros e novos (ASATO et al, 2004). Entretanto, o sequenciamento não é adequado quando a amostra clínica contém múltiplos genótipos de HPVs, pois as sequências que representam os tipos que estão em menor quantidade total no

produto da PCR podem passar despercebidas e a prevalência deles ser subestimada (KETLER et al., 1999).

1.7 VACINAS

As vacinas poderão constituir uma importante ferramenta para reduzir a incidência de CCU (FONSECA et al., 2010). Atualmente, encontram-se disponíveis duas vacinas, ambas baseadas na expressão recombinante L1, que têm se revelado muito eficazes na prevenção da infecção das principais cepas oncogênicas de HPV. Uma destas vacinas foi desenvolvida pela indústria farmacêutica Merck, a Gardasil ®¹, que compreendem VLPs (*virus-like particles*) das cepas 16, 18, 6 e 11, que são produzidos de forma recombinante em levedura. A outra vacina foi desenvolvida pelo laboratório farmacêutico GlaxoSmithKline sob o nome Cervarix ®² e é composta apenas de VLPs das cepas 16 e 18, produzida de forma recombinante em células de insetos (de SANJOSE et al., 2012; SCHILLER, LOWY, 2009). Ambas vacinas possuem adjuvante do fabricante, são consideradas tipos-específicas e demonstram pouca reatividade cruzada com outros tipos de HPV (HELLNER, MÜNGER, 2011; SCHILLER, LOWY, 2009). Entretanto, estudos de seguimento de até 8,4 anos após a vacinação inicial, mostram que pode existir uma proteção parcial contra os HPVs 31, 33 e 45 (ROTELI-MARTINS et al., 2012; SMITH, et al., 2007).

Os HPVs tipos 16 e 18, considerados de alto risco oncogênico, são responsáveis por cerca de 70% do CCUs. Já os tipos 6 e 11 estão principalmente associados com o desenvolvimento de papilomas benignos e respondem por cerca de 75 a 90% dos casos (de SANJOSE et al., 2012).

Para atingir o título de anticorpos para assegurar a imunização, ambas as vacinas requerem a aplicação de três doses, por via intramuscular, no esquema vacinal padrão: mês 0; 2; 6 (BRASIL, 2011; de SANJOSE et al., 2012; LEONARDO et al., 2011).

¹ Cada dose de 0,5 mL contém aproximadamente 20 mcg de proteína L1 do HPV 6, 40 mcg de proteína L1 do HPV 11, 40 mcg de proteína L1 do HPV 16 e 20 mcg de proteína L1 do HPV 18.

² Cada dose de 0,5mL contém: HPV-16 L1: 20,0 µg; HPV-18 L1: 20,0 µg; excipientes: 3-O-desacil-4' monofosforil lipídio A (MPL), alumínio, cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico diidratado e água para injetáveis.

No Brasil, atualmente, as vacinas Cervarix® e Gardasil® estão aprovadas para uso comercial (BRASIL, 2013a). Ambas são eficazes, seguras e bem toleradas (AGORASTOS et al., 2009). Os melhores resultados são obtidos principalmente se utilizadas antes do início da vida sexual, ou seja, antes do contato com o vírus (BRASIL, 2013a). Em março de 2014, o Ministério da Saúde implantou a vacina tetravalente no Sistema Único de Saúde para aplicação gratuita em meninas de 9 a 13 anos de idade (BRASIL, 2013b; BRASIL, 2014). O impacto dessa medida só será avaliado substancialmente nas próximas décadas, visto a lenta progressão das lesões de colo de útero. A adoção dessas vacinas anti-HPV não elimina a necessidade da prevenção secundária por meio do rastreamento citológico (exame de *Papanicolaou*), pois as mesmas não oferecem proteção para cerca de 30% dos casos de câncer do colo do útero, que são causados por outros tipos virais oncogênicos (BRASIL, 2013a).

1.8 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

O CCU é uma doença que possui grande potencial de prevenção. A incidência dessa neoplasia diminuiu, nos últimos 50 anos, nos países que adotaram, dentre as formas de prevenção, o rastreio citológico (exame de *Papanicolaou*). Dessa forma, ficou demonstrado que programas de rastreio de CCU bem organizados podem reduzir a incidência e a mortalidade (de SANJOSE et al., 2012).

No Brasil, o programa nacional do controle do câncer de colo de útero, que visa o controle de CCU, foi instituído em 1998 com o objetivo de detecção das lesões precursoras e do CCU, além de garantir o tratamento (BRASIL, 2011). Atualmente, a Política de Atenção Integral à Saúde da Mulher vem promovendo importantes avanços em todos os ciclos de vida, resguardadas as especificidades das diferentes faixas etárias e dos distintos grupos populacionais. Nesse sentido, o governo federal lançou o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011 – 2022, que aborda o câncer entre as quatro principais doenças. Entre as metas nacionais propostas para o CCU estão: ampliar a cobertura de exame citopatológico (exame de *Papanicolaou*) em mulheres de 25 a 64 anos e tratar 100% das mulheres com diagnóstico de lesões precursoras de câncer (BRASIL, 2013a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define que o exame citológico de rastreio deve ser priorizado em mulheres de 25 a 60 anos, uma vez por ano e, após dois exames negativos consecutivos, o rastreio pode ser a cada 3 anos. Caso a mulher já tenha iniciado a atividade sexual, o rastreio deve acontecer antes dessa faixa etária (WHO, 2002).

A introdução da vacinação contra o HPV tenderá a diminuir a incidência de CCU. O uso de preservativos tem demonstrado um efeito protetor significativo contra a transmissão do HPV e pode oferecer uma estratégia preventiva alternativa (de SANJOSE et al., 2012). No entanto, o uso de preservativo durante a relação sexual com penetração, protege parcialmente do contágio pelo HPV, que também pode ocorrer por intermédio do contato com a pele da vulva, da região perineal e da bolsa escrotal (BRASIL, 2013a).

Quanto ao tratamento das lesões pré-neoplásicas, existe uma grande controvérsia com relação a melhor forma de lidar com as atipias citológicas mal definidas e com as lesões de baixo grau. Alguns estudiosos propõem o acompanhamento das mulheres que apresentam essas alterações, usando para tal esfregaços colhidos a intervalos de 6 meses, pois acreditam que a probabilidade de regressão das mesmas é elevada e, a evolução para lesões de alto grau ou carcinoma é lenta. Já outros sugerem que a avaliação colposcópica imediata para esses casos, pois acreditam que 20% das mulheres que apresentam essas alterações duvidosas sejam portadoras de lesão de alto grau e, eventualmente, de carcinomas. Nesses casos, a pesquisa de HPV se torna importante para a melhor conduta da paciente. Nos casos de lesões de alto grau, o tratamento específico é obrigatório (KOSS, GOMPEL, 2006).

Já o tratamento dos condilomas (verrugas) genitais, o tratamento inclui técnicas ablativas como crioterapia/laser, ou de aplicação local de agentes citotóxicos (KODNER, NASRATY, 2004).

1.9 DISTRIBUIÇÃO DO CCU NO BRASIL

De acordo com os últimos dados mundiais, o CCU é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com 527 mil casos novos no ano de 2012. Nesse

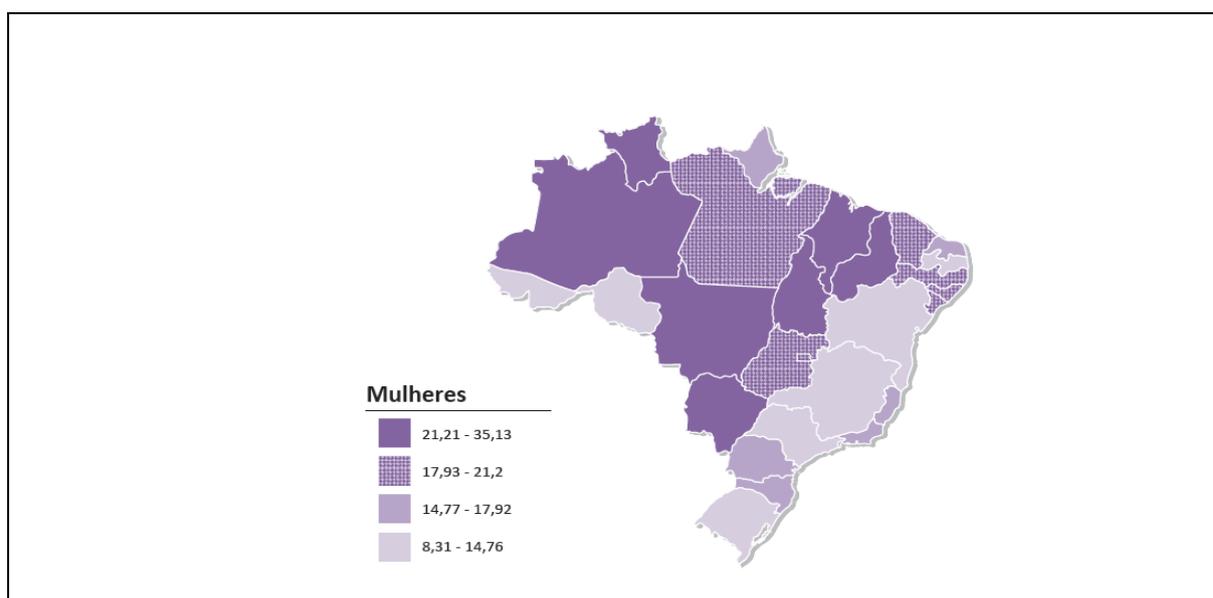
mesmo ano, esse câncer foi responsável pelos óbitos de 265 mil mulheres, sendo que 87% desses óbitos ocorreram em países em desenvolvimento (BRASIL, 2014).

Para o Brasil, no ano de 2014, esperam-se mais de 15.000 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres, constituindo o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres. Entre as regiões brasileiras, a Norte possui a maior incidência de CCU (23,57/100 mil). O Estado de Roraima está entre os Estados brasileiros de maior incidência de CCU (21,29/100 mil) e configura a neoplasia mais incidente entre as mulheres desse Estado (BRASIL, 2014). Na Figura 7 está representada a incidência de CCU estimada, para os anos de 2014 e 2015, para cada Estado da Federação.

A incidência do CCU manifesta-se a partir da faixa etária de 20 a 29 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos (BRASIL, 2011).

Uma provável explicação para as altas taxas de incidência em países em desenvolvimento seria a inexistência ou a pouca eficiência dos programas de rastreamento. A estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde é o exame citopatológico prioritariamente em mulheres de 25 a 64 anos (BRASIL, 2011).

Figura 8- Representação espacial das taxas brutas de incidência de CCU estimadas para os anos de 2014/2015, por unidade da Federação



Fonte: BRASIL (2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil genotípico da infecção pelo HPV nas amostras cervicais obtidas de mulheres submetidas à biopsia do colo do útero, no Estado de Roraima, no período de janeiro a outubro de 2014.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os genótipos de HPVs em amostras de raspado da cérvix uterina através de métodos moleculares;
- Investigar os genótipos de HPVs nas amostras de lesão intraepitelial de alto grau e carcinomas;
- Descrever o perfil sociodemográfico da amostra estudada;
- Analisar, estatisticamente, a associação dos fatores de risco para CCU e a presença dos HPVs 16 e 18;
- Avaliar o possível benefício da imunização pela vacina tetravalente contra o HPV em Roraima considerando os genótipos circulantes no Estado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MODELO DO ESTUDO

Para investigar os genótipos dos HPVs circulantes, o desenho do estudo adotado foi do tipo transversal e descritivo.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi conduzido na cidade de Boa Vista, capital do Estado de Roraima, junto ao Hospital Geral de Roraima, ao Centro de Referência da Saúde da Mulher e ao Centro de Referência de Especialidades Médicas Andrea Patrícia Madruga.

O Hospital Geral de Roraima, através da Unidade de Alta Complexidade em Oncologia, é referência para assistência às pacientes portadoras de carcinomas da cérvix uterina e tem a competência para definição de tratamento e manejo clínico das pacientes. Já o Centro de Referência da Saúde da Mulher e o Centro de Referência de Especialidades Médicas Andrea Patrícia Madruga, através dos ambulatórios de patologia cervical, prestam assistência às mulheres portadoras de lesões pré-neoplásicas, também com competência para manejo clínico das pacientes. Tais unidades de saúde são responsáveis pela totalidade dos atendimentos relativos ao cuidado médico inerente às lesões pré-malignas e malignas do colo do útero realizados pelo SUS no Estado de Roraima.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

De acordo com a resolução 466/12, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Roraima, sob número do parecer 467.430, de 22/11/2013, com o título “**Caracterização genotípica do Papilomavírus humano em infecções cervicais no Estado de Roraima**” (Anexo 1).

3.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população alvo deste estudo foram mulheres portadoras de laudo citológico de lesões pré-neoplásica ou neoplásica, colposcopicamente confirmadas, ou seja, com triagem positiva para realização de biópsia, que procuraram o serviço de patologia cervical ou a unidade de oncologia, no período de janeiro a outubro de 2014.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo as mulheres em conformidade com os seguintes critérios:

- Possuidoras de exame citológico e colposcópico sugestivo de lesão pré-neoplásica ou neoplásica;
- Sugestivas de lesão neoplásica ao exame clínico;
- Concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas deste estudo as mulheres que:

- Previamente haviam se submetido a crio ou termocauterização, laserterapia, histerectomia, quimioterapia ou radioterapia;
- Possuíam idade inferior a 18 anos;
- Não aceitaram participar do estudo.

3.5 PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO DAS PACIENTES

As pacientes possuidoras de laudo citológico compatível com lesão intraepitelial de alto grau ou carcinoma (colposcopicamente confirmado) ou, ao

exame clínico do colo uterino, serem sugestivas de malignidade, foram convidadas a participar do estudo no momento do atendimento médico no ambulatório de patologia cervical ou de oncologia. Após serem esclarecidas dos objetivos da pesquisa, benefícios e confiabilidade dos registros e aceitarem participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam a um questionário individual padronizado (Anexo 3).

3.6 COLHEITA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A amostra de material cervical para o estudo molecular foi colhida pelo médico responsável pela paciente, com auxílio de escova do tipo *citobrush*, que foi inserida no canal endocervical, com profundidade de 1 a 1,5 cm do orifício externo e girada por 3 voltas completas, e então teve sua haste quebrada e acondicionada em tubete contendo solução (azida sódica 0,05%) para conservação do DNA (material pertencente ao kit para coleta e transporte de material cervical – *HC2 DNA Collection Device*®, Digene Inc., USA). O tubo contendo a amostra foi identificado e armazenado a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular da UFRR.

3.7 PROCEDIMENTOS PARA GENOTIPAGEM DO HPV

Os procedimentos laboratoriais foram realizados em três laboratórios: Laboratório de Biologia Molecular da UFRR: extração do DNA; Laboratório da Gerência de Virologia e Laboratório de Pesquisas de Doenças Endêmicas da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) – Manaus/AM: PCR de 71 amostras e sequenciamento de 50 amostras; e no Laboratório de Biologia Molecular da Macrogen Korea – Seul/Coréia do Sul: sequenciamento de 19 amostras. Os procedimentos realizados no Brasil foram realizados pela pesquisadora, porém àqueles realizados no exterior, apenas os eletroesferogramas foram interpretados.

O fluxograma abaixo (Figura 8) mostra o processamento das amostras no estudo. A técnica de detecção molecular utilizada foi a PCR. Para aumentar a

sensibilidade, as amostras foram submetidas à amplificação com iniciadores genéricos MY09/MY11, que amplifica um fragmento de 450 pb da região de transcrição tardia L1 (MANOS et al, 1989), e GP5+/GP6+, que amplifica, um fragmento de 140 a 150 pb da região L1, superpondo-se aos MY (de RODA et al, 1995) (Figura 9). Para identificação dos genótipos de HPV, as amostras positivas foram submetidas à técnica de sequenciamento pelo método de Sanger.

Figura 9 - Fluxograma do processamento das amostras de raspado da cérvix uterina no Estado de Roraima

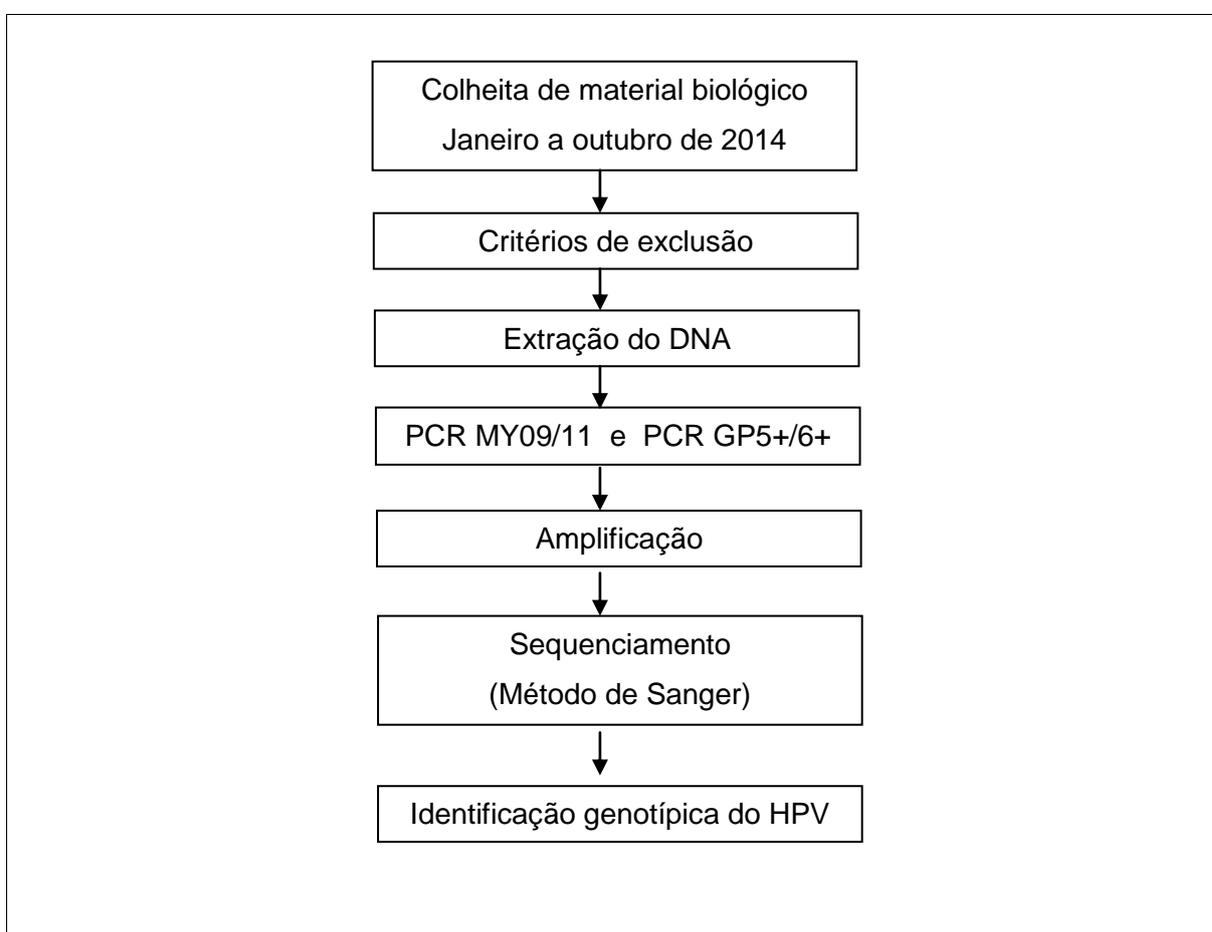
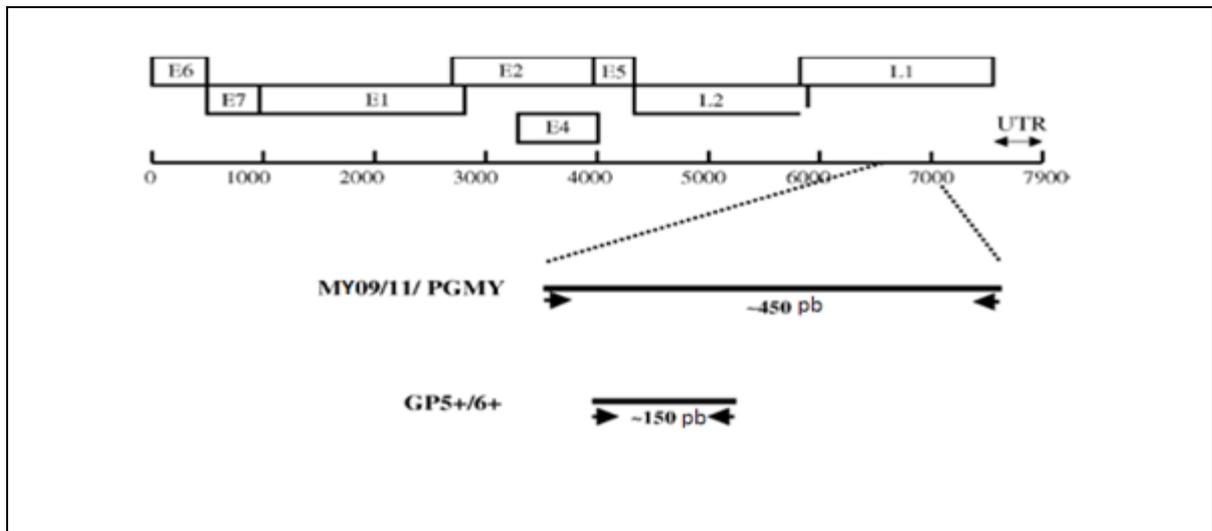


Figura 10 - Tamanho do produto amplificado pelos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+



Fonte: MOLIJN et al (2005) modificado.

As características gerais do ensaio estão sumarizadas a seguir:

3.7.1 Extração do DNA

As amostras cervicais mantidas a -80°C foram deixadas à temperatura ambiente e, em seguida, um mililitro do meio líquido contendo o esfoliado do colo de útero foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Ao *pellet* foi aplicado o procedimento para extração do DNA conforme as recomendações do kit InvitrogenTM PureLink[®] Genomic DNA conforme a técnica seguinte: adicionou-se ao tubo com o *pellet* 180 μL de tampão PureLink[®] e 20 μL de proteinase. O tubo foi incubado à 55°C por 12 horas, depois centrifugado a 5000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se 20 μL de *RNAase A* e incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos. Para a lise adicionou-se 200 μL de PureLink[®] Genomic Lise / Binding Buffer e 200 μL de etanol 100%. Esse lisado foi transferido para a Coluna PureLink[®] e centrifugada a $10000 \times g$ durante 1 minuto. O tubo de coleta foi descartado e a coluna transferida para outro tubo. Adicionou-se 500 μL de tampão de lavagem 1 e a coluna centrifugada a $10000 \times g$ durante 1 minuto. O tubo de coleta foi descartado e a coluna transferida para tubo limpo. Adicionou-se à coluna 500 μL de tampão de lavagem 2 que foi centrifugada na velocidade máxima durante

3 minutos. Para a eluição do DNA a coluna foi transferida para tubo estéril e adicionou-se 100 μL de tampão de eluição PureLink®. Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugou-se a coluna em velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. A coluna foi descartada ficando no tubo o DNA purificado. O passo de eluição do DNA foi realizado 2 vezes. Na sequência, o DNA foi armazenado a -20°C .

3.7.2 Reação em cadeia da polimerase

3.7.2.1 Amplificação do gene da globina

Todas as amostras de DNA extraído foram, primeiramente, submetidas à amplificação para o gene da globina para confirmação da presença de DNA cromossomal humano amplificável conservado. Todas as amostras do estudo amplificaram o gene da globina. Os iniciadores utilizados estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a detecção do gene da globina

Sistema	Sequências nucleotídicas	Fragmento amplificado
Beta Globina Humana F	ACACAACCTGTGTTCACTAGC	110 pb
Beta Globina Humana R	CAACTTCATCCACGTTCCACC	

O sistema utilizado para a PCR (volume total de 25 μL) foi composto por: 200 ng do DNA extraído; 2,5 μL do tampão 10x (100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 500 mM KCl); 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,5 μM do iniciador Beta Globina Humana F; 0,5 μM do iniciador Beta Globina Humana R; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25 U de Taq polimerase e água de injeção para completar o volume de 25 μL . Para controle da reação, foi utilizado um controle negativo (água de injeção) e um controle positivo (DNA humano purificado).

Na reação de PCR foram realizados 35 ciclos de amplificação em aparelho termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* conforme o seguinte programa: 30

segundos à 94°C para desnaturação, 45 segundos à 60°C para anelamento e 45 segundos à 72°C para a síntese. Após os 35 ciclos, 10 minutos à 72°C para extensão. Os produtos amplificados foram analisados por corrida eletroforética em gel de agarose 2,5%. O gel foi corado por brometo de etídio (10 mg/mL) e as bandas coradas correspondentes a 110 pb foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas para documentação.

3.7.2.2 Amplificação do DNA para detecção do HPV

Nesse passo, para a amplificação do DNA viral, foi utilizada a metodologia de PCR com os iniciadores genéricos MY09/MY11 como também com GP5+/GP6+. Na Tabela 4 são apresentadas as sequências de bases nitrogenadas desses iniciadores.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores usados nas reações de PCR

Iniciador	Sequência nucleotídica	Fragmento amplificado
MY09	5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC -3'	450 pb
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	
GP5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'	150 pb
GP6+	5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3	

M = A/C; R = A/G; W = A/T; Y = C/T

Fonte: MANOS et al., 1989; SNIJDERS et al., 1990.

a) PCR com iniciadores MY09/MY11

O sistema utilizado para a PCR (volume total de 25 μ L) foi composto por 200 ng de DNA da amostra; 2,5 μ L do tampão 10x; 1,5 mM de MgCl₂, 1 μ M do iniciador MY09; 1 μ M do iniciador MY11; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen®) e água de injeção para completar o volume de 25 μ L. Para controle da reação, foi utilizado um controle negativo (água) e uma amostra positiva para HPV (sequenciada).

Nas reações de PCR foram realizados com 40 ciclos de amplificação em aparelho termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*, conforme o seguinte programa: 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 55°C para anelamento e 1 minuto à 72°C para a síntese. Após os 40 ciclos, seguiram-se 5 minutos à 72°C para extensão. Os produtos amplificados foram analisados por corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%. O gel foi corado por brometo de etídio (10 mg/mL) e as bandas coradas correspondentes a 450 pb foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas para documentação.

b) PCR com iniciadores GP5+/GP6+

O sistema utilizado para a PCR (volume total de 25 μ L) foi composto por 200 ng de DNA da amostra; 2,5 μ L do tampão 10x; 1,5 mM de $MgCl_2$; 1 μ M do iniciador GP5+; 1 μ M do iniciador GP6+; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25U da Taq polimerase (Invitrogen®) e água de injeção para completar o volume de 25 μ L. Para controle da reação, foi utilizado um controle negativo (água) e uma amostra positiva para HPV (sequenciada). Para amplificação foi utilizada a mesma programação descrita para os iniciadores MY09/MY11. Os produtos amplificados foram analisados por corrida eletroforética em gel de agarose 2,5%. O gel foi corado por brometo de etídio (10 mg/mL) e as bandas coradas correspondentes a 150 pb foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas para documentação.

3.7.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados na PCR

Para a realização do sequenciamento das 50 amostras realizado em Manaus, foi utilizado o protocolo da Fiocruz/Manaus, sendo necessária a realização dos seguintes procedimentos prévios:

3.7.3.1 Purificação e quantificação dos produtos da PCR

O objetivo dessa etapa é a remoção dos nucleotídeos não incorporados na PCR, através da precipitação com polietilenoglicol (PEG), que poderiam interferir no sequenciamento.

Procedimento técnico:

- 1 - Transferir 15 μL de PEG (20% m/v PEG 2,5M NaCl) para tubo de 1,5 mL;
- 2 - Adicionar 15 μL do produto da PCR;
- 3 - Agitar suavemente em vortex por 10 segundos e incubar à 37°C por 15 minutos;
- 4 - Após a incubação, centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;
- 5 - Descartar o sobrenadante e adicione 125 μL de etanol a 80% gelado e em seguida a 4500 rpm por 2 minutos;
- 6 - Descartar o sobrenadante e deixar secando à 60°C por 10 minutos para remoção do resíduo de etanol;
- 7 - Certificar a ausência de resíduo de etanol e adicionar 10 μL de água livre de nuclease;
- 8 - Agitar em vortex por 10 segundos e armazenar a amostra a -20°C.

Após a purificação, o DNA foi submetido à quantificação em espectrofotômetro (aparelho *Nanodrop 2000 Thermo Scientific - Uniscience®*).

3.7.3.2 Reação de sequenciamento

Foram realizadas duas reações de sequenciamento: uma delas usando o iniciador MY11 para as amostras que amplificaram a PCR usando os iniciadores MY09/11; a outra usando o iniciador GP6+ para as amostras que foram negativas na PCR com iniciadores MY09/11 e positivas com iniciadores GP5+/6+.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando 1-3 μL (30 ng de DNA) de produto de PCR purificado; 0,33 μM do iniciador; 2 μL tampão 5x; 1 μL de *Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* e água de injeção para completar o volume final de 10 μL . As reações foram realizadas em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*, conforme o seguinte programa: 10 segundos à 96°C, 15 segundos à 55°C e 2 minutos à 60°C. Após 20 ciclos, manutenção à 4°C.

3.7.3.3 Purificação pela precipitação em EtOH/EDTA/Acetato de Sódio

Os produtos de cada PCR foram purificados utilizando kit *X-Terminator* (*Applied Biosystems*), de acordo com o protocolo abaixo:

- 1 - Remover a placa do termociclador e centrifugar 1 minuto a 2000 RCF;
- 2 - Adicionar 1 μL de EDTA a cada um dos poços;
- 3 - Adicionar 1 μL de acetato de sódio 3M a cada um dos poços;
- 4 - Adicionar 25 μL de EtOH 100% gelado a cada um dos poços;
- 5 - Selar a placa por *strips* e misturar por inversão (4 vezes);
- 6 - Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz;
- 7 - Centrifugar a 2000 RCF por 45 minutos;
- 8 - Inverter a placa e fazer um *spin* até 180 RCF por 1 minuto e remover a placa da centrífuga;
- 9 - Adicionar 35 μL de EtOH 70% a cada um dos poços;
- 10 - Centrifugar por 15 minutos, à 4^o C, a 1650 RCF;
- 11 - Inverter a placa e fazer um *spin* até 180 RCF por 1 minuto. Remover a placa da centrífuga;
- 12 - Incubar a placa à 52^oC por 15 minutos (cobrir com papel alumínio) no termociclador;
- 13 - Ressuspender com 10 μL de formamida Hi-Di lavando as paredes dos poços.
- 14 - Aquecer a placa à 95^oC por 1 minuto, montar e colocar no sequenciador.

O sequenciamento genético foi realizado no equipamento *DNA Analyzer ABI 3130XL* (*Applied Biosystems*).

3.7.3.4 Análise das sequências

Os eletroferogramas foram editados manualmente utilizando-se os algoritmos do pacote *BioEdit*. Por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - Ferramenta Básica de Busca de Alinhamento Local), a sequência de interesse foi comparada com sequências de referência disponíveis no *GenBank* (banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), possibilitando a identificação do genótipo viral.

3.7.3.5 Análise filogenética

Para a realização da análise filogenética, os arquivos *fasta* gerados na edição foram alinhados com sequências de referência de alguns tipos de HPVs obtidas do *Genbank*, com auxílio do programa CLUSTAL W incluído no pacote Mega versão 6.0. Foi usado o método estatístico de *Neighbor-Joining* (NJ) incluindo substituições do tipo transições + transversões. O teste de confiabilidade da topologia da árvore filogenética foi estabelecido usando o método não paramétrico de replicações *bootstrap* com percentual mínimo de 70% e 1000 replicações.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva foi realizada, incluindo frequência de distribuição para variáveis categóricas, médias (com desvio padrão) e medianas (com desvio interquartilico) para variáveis contínuas, com distribuição normal e não normal, respectivamente. O desfecho principal foi a prevalência de HPV de alto risco imunizáveis pela vacina e foi definida pela razão entre o número de mulheres positivas para HPV 16 e 18 por mulheres incluídas e/ou existentes no Estado com intervalo de confiança. Os intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram estimados baseados em distribuição binomial. Para comparação de médias amostrais, foi utilizado o teste t de *Student* para variáveis de distribuição normal e com homogeneidade de variâncias amostrais. Senão, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para este propósito. Foi utilizado o teste qui quadrado para comparar diferenças de proporções de variáveis categóricas. *Odds ratio* (OR) e IC95% foram calculados em análise bivariada. Os dados foram tabulados por meio de dupla entrada de dados e analisados utilizando-se os *softwares* *EpiInfo*® versão 7.1.3 (CDC, Atlanta, USA) e *MedCalc*® versão 15.2.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estudo foram selecionadas 73 pacientes. Destas, 2 foram excluídas (uma devido material inadequado para análise histopatológica e outra por se encontrar em duplicidade). Assim, os resultados, que serão a seguir expostos, são provenientes dos dados das análises laboratoriais e dos questionários padronizados de 71 mulheres.

4.1 PERFIL DEMOGRÁFICO, COMPORTAMENTAL E CLÍNICO DA AMOSTRA

As informações foram obtidas no momento que antecedeu a colheita do material biológico. Os dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos estão demonstrados no Quadro 1. Pode-se observar que a média de idade das pacientes foi de 37 anos, sendo que a maioria são não-indígenas (88,7%), vivem em união conjugal (56,3%), com instrução até o 1º grau (52,1%), com renda familiar até 1 salário mínimo (73,2%) e procedência da capital (57,7%). Em relação aos dados comportamentais, a maioria das pacientes não possui histórico de tabagismo (71,9%), relatam não ter feito uso de anticoncepcionais hormonais nos últimos 10 anos (52,1%), idade média na sexarca de 16 anos, tido 5 ou mais parceiros sexuais na vida (40,9%) e idade média na primeira gestação de 17 anos.

Na amostra estudada, 73,2% disseram ter algum conhecimento sobre a importância do HPV no CCU, 83,1% relataram realizar o exame citológico preventivo regularmente e 80,3% confirmaram o recebimento do resultado desse exame.

Em relação aos dados clínicos, 9 possuíam exame histopatológico compatível com carcinoma, 23 com lesão intraepitelial de alto grau, 12 com lesão intraepitelial de baixo grau, 26 com cervicite e 1 com colo normal.

Quadro 1 - Dados demográficos e características comportamentais e clínicas das 71 mulheres participantes do estudo, atendidas nos ambulatórios de patologia cervical e unidade de oncologia, no período de janeiro a outubro de 2014, em Roraima

Características demográficas, comportamentais e clínicas da amostra	n = 71	%	Média (±DP)
Idade			37,4±13,4
Indígena			
Sim	8	11,3	
Não	63	88,7	
Estado civil			
Solteira	23	32,4	
Casada/união estável	40	56,3	
Divorciada/viúva	8	11,3	
Instrução			
Até 1º grau	37	52,1	
Até 2º grau	27	38	
Até 3º grau	7	9,9	
Procedência			
Interior	30	42,3	
Capital	41	57,7	
Renda familiar			
≤1 salário mínimo	52	73,2	
>1 salário mínimo	19	26,8	
Tabagismo			
Atual	4	5,6	
Prévio	16	22,5	
Nunca	51	71,9	
Uso de anticoncepcional nos últimos 10 anos			
Sim	34	47,9	
Não	37	52,1	
Idade na sexarca			16±3,6
Parceiros sexuais durante a vida			
1 ou 2	26	36,6	
3	11	15,5	
4	5	7	
≥5	29	40,9	
Idade na 1ª gestação			17 ±3,6
Conhecimento prévio do envolvimento do HPV no CCU			
Sim	52	73,2	
Não	19	26,8	
Realização prévia de exame citológico preventivo			
Sim	59	83,1	
Não	12	16,9	
Recebimento do resultado exame citológico preventivo			
Sim	57	80,3	
Não	14	19,7	
Exame histopatológico¹			
Colo normal	1	1,4	
Cervicite	26	36,6	
LIEBG	12	16,9	
LIEAG	23	32,4	
Carcinoma	9	12,7	

Nota: DP = desvio-padrão; LIEBG = lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG = lesão intraepitelial de alto grau; CCU = câncer do colo do útero.

1 = Os resultados dos exames histopatológicos foram obtidos junto ao Laboratório de Patologia do Estado de Roraima (LAPER).

Outros estudos de caracterização genotípica do HPV apresentam dados sócio-demográficos amostrais parecidos com os do presente estudo. Silva et al. (2006) observaram em uma amostra, no Estado da Bahia, que as mulheres com infecção por HPV possuíam idade média de 34 anos, sexarca de 16,5 anos, tiveram mais de 3 parceiros sexuais durante a vida, maioria casada e não tabagista. Rama et al. (2008) relataram que, em São Paulo, as mulheres possuíam idade média de 35,7 anos, sendo que a maioria vivia com parceiro, tinha mais de 12 anos de estudo, usava anticoncepcionais hormonais, já havia tido 4 ou mais parceiros sexuais e não realizava o exame citológico de *Papanicolaou* regularmente. Fernandes et al. (2008), na cidade de Natal, observaram que a maioria das mulheres do seu estudo era casada, não fumante, usava anticoncepcional hormonal e teve sexarca antes dos 17anos. Oliveira et al. (2012) estudaram a infecção por HPV numa cidade do Nordeste brasileiro, observou idade média de 31 anos, maioria casada, sexarca antes dos 18 anos e com 1º grau incompleto.

4.2 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO HPV

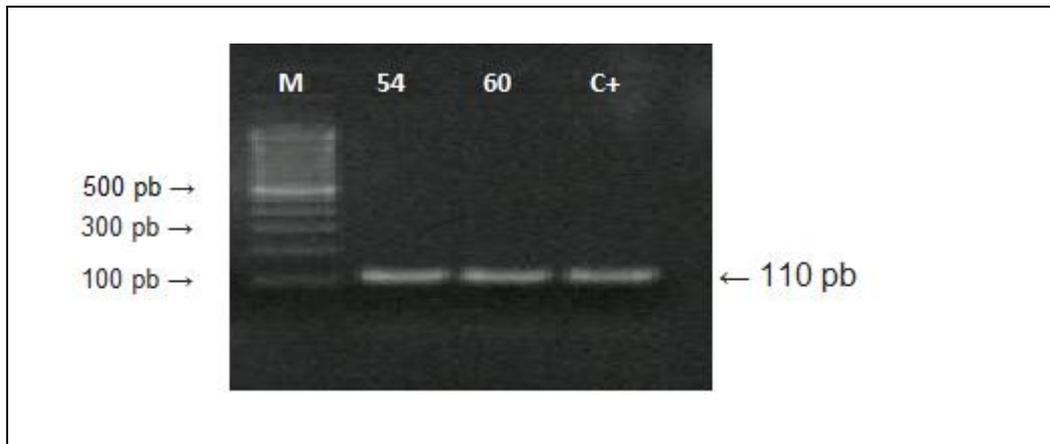
Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à verificação quanto à viabilidade por meio da amplificação do gene da globina. Todas as amostras foram positivas uma vez que amplificaram um fragmento de 110 pb. A Figura 10 mostra o gel representativo da amplificação do referido gene.

Para a detecção do HPV, foi aplicada a técnica de PCR usando os iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+. Das 71 amostras testadas, 69 (97,2%) foram positivas para o DNA viral. O uso dos iniciadores MY09/11, que amplifica um fragmento de aproximadamente 450 pb, permitiu a detecção do HPV em 38 amostras (53,5%). Já com os iniciadores GP5+/6+, a amplificação do fragmento de cerca de 150 pb possibilitou a detecção do DNA viral em 68 amostras (95,77%). Somente em 2 amostras (2,8%), o DNA viral não foi amplificado com o uso de iniciadores genéricos que amplificam uma região do gene L1 do capsídeo do HPV. As Figuras 11 e 12 mostram os géis representativos da detecção do DNA de HPV.

O par de iniciadores GP5+/6+ mostrou maior sensibilidade, embora não tenha amplificado o DNA viral da totalidade das amostras positivas. Isso demonstra a complementaridade das técnicas, comprovando o que já foi descrito por outros

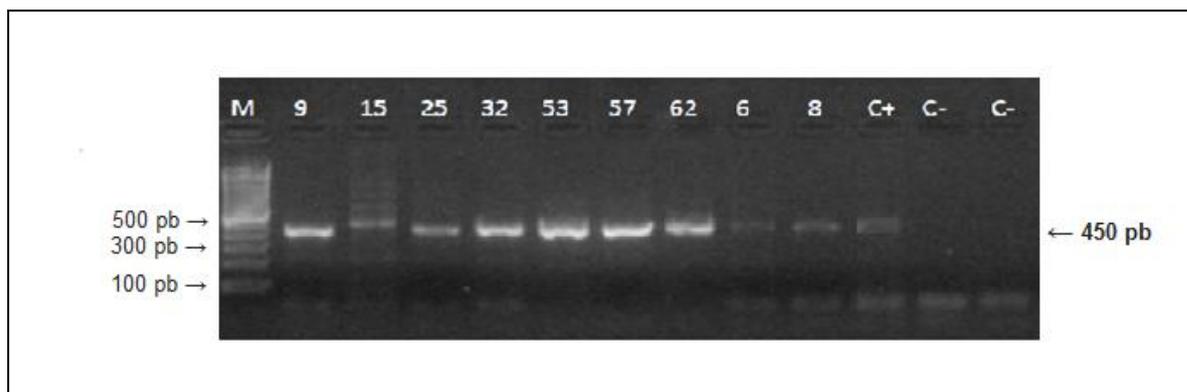
estudos (ENTIAUSPE et al., 2013; EVANDER et al., 1992; NASCIMENTO et al., 2010).

Figura 11 - Gel representativo dos produtos da PCR para o gene da globina



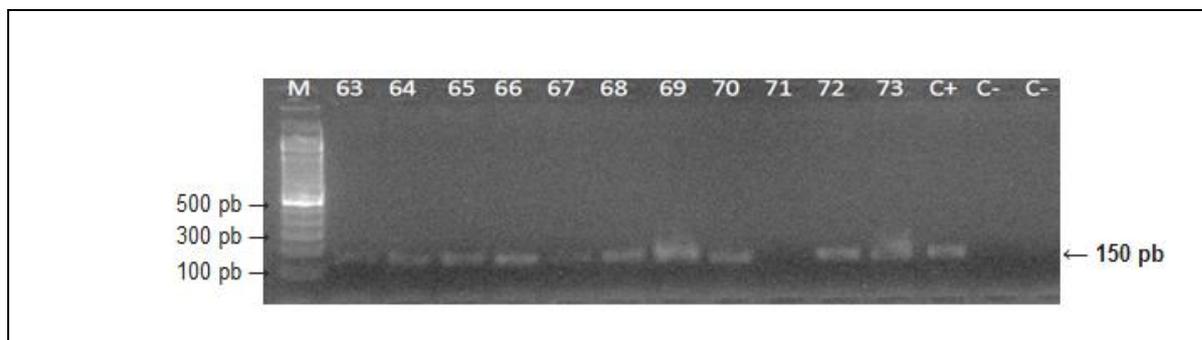
Nota: M = marcador de peso molecular de 100 pb; amostras 54 e 60; C+ = controle positivo.

Figura 12 – Gel representativo dos produtos da PCR com iniciadores MY09/11 (fragmento 450 pb) para o gene L1 do HPV



Nota: M = marcador de peso molecular de 100 pb; amostras 9, 15, 25, 32, 53, 62, 6 e 8; C+ = controle positivo; C- = controle negativo.

Figura 13 - Gel representativo dos produtos da PCR com iniciadores GP5+/6+ (fragmento 150 pb) para o gene L1 do HPV



Nota: M = marcador de peso molecular de 100 pb; amostras 63 a 73; C+ = controle positivo; C- = controle negativo.

As reações de sequenciamento foram realizadas conforme as ampliações obtidas com os iniciadores genéricos, porém priorizando os fragmentos de 450 pb. Foram submetidas 38 amostras à reação de sequenciamento com o iniciador MY11 e 31 amostras com o iniciador G6+, totalizando 69 amostras. As sequências obtidas foram editadas e comparadas com sequências existentes no *GeneBank*, por meio da ferramenta BLAST, e os seus tipos virais identificados por grau de similaridade conforme a tabela 5.

O sequenciamento permitiu a identificação do HPV em 64 amostras (92,8%). Dessas, 35 por meio do iniciador MY11 e 29 pelo iniciador GP6+. Em 7 amostras (9,9%) não foi possível a identificação do HPV (2 foram negativas nas reações de amplificação e em 5 os eletroferogramas obtidos foram de baixa qualidade e não permitiram a identificação). Possivelmente, nestas 5 amostras havia infecção por mais de um tipo de HPV (infecção múltipla). Dessa forma, a PCR pode ser mais seletiva para um dos tipos presentes na amostra, seja devido a maior eficiência de amplificação de um dos vírus ou seja devido a carga viral alta (KOSEL et al., 2003). Esse fato pode levar à subestimação da prevalência de alguns tipos virais (JACOBS et al., 1999; QU et al., 1997). A figura 13 mostra um eletroferograma representativo e a Tabela 6 apresenta os resultados das PCR com cada par de iniciadores, da identificação viral e do exame histopatológico de cada amostra.

Tabela 5 continuação – Tipos de HPVs identificados e grau de similaridade (%), obtidos do *Genbank* por meio da ferramenta BLAST, das 64 amostras da cérvix uterina do Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014

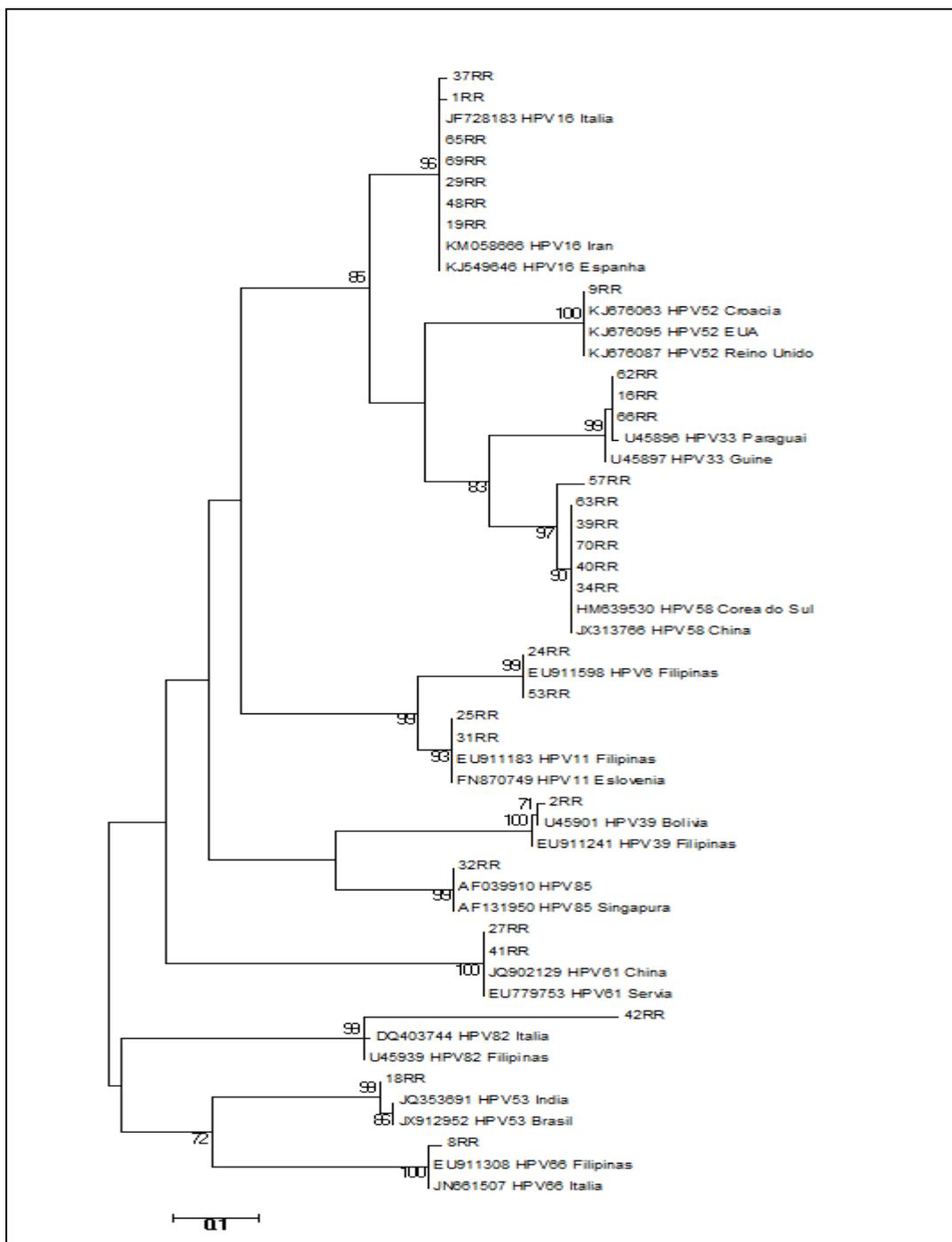
21	NS	NS	98	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
22	NS	NS	97	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
23	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
26	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
28	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
29	NS	NS	100	76	NS	NS	NS	77	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
36	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
37	NS	NS	99	76	NS	NS	NS	77	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
38	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
43	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
44	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
45	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
48	NS	NS	100	76	NS	NS	NS	77	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
49	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
50	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
51	NS	NS	95	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
64	NS	NS	99	85	NS	NS	NS	82	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
65	NS	NS	99	85	NS	NS	NS	82	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
67	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
69	NS	NS	100	76	NS	NS	NS	77	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
14	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
72	NS	NS	NS	93	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
73	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
16	NS	NS	NS	75	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
62	NS	NS	NS	78	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
66	NS	NS	NS	75	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
52	NS	NS	NS	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
56	NS	NS	NS	NS	NS	97	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
55	NS	NS	92	NS	NS	NS	NS	97	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
61	NS	NS	92	NS	NS	NS	NS	96	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
68	NS	NS	92	NS	NS	NS	NS	97	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
18	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS	NS	NS	NS
71	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	87	NS	NS	NS	NS	74
10	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	100	NS	NS	NS	NS
34	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	100	NS	NS	NS
39	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS
40	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	100	NS	NS	NS
57	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS
63	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS
70	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS	NS
41	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS
27	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	99	NS	NS
8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	98	NS
42	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	84
32	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	100

Nota: NS = não significativo; Cand = candidato.

Números de acesso obtidos do *Genbank* para cada tipo viral identificado: **HPV 6:** KC706454.1, EU911598.1; **HPV 11:** FN870749.1, EU911183.1; **HPV 16:** KM058658.1, KJ549646.1, JN617890.1, JN617891.1, KM058666.1, U34170.1; **HPV 18:** AF548838.1, JF728188.1, KC991262.1; **HPV 33:** U45897.1, U45896.1; **HPV 35:** JQ902115.1 HQ834678.1; **HPV 39:** U45901.1; **HPV 45:** U45912.1 U45909.1; **HPV 52:** KJ676087.1, **HPV 53:** JX912952.1 **HPV 54:** U12501.1; **HPV 58:** JX313766.1 HM639530.1; **HPV 61:** JQ902129.1; **HPV 66:** JN661507.1; **HPV 82:** DQ403744.1; **cand HPV 85:** AF131950.1.

A análise filogenética dos fragmentos de 450 pb do gene L1, de 28 amostras, permitiu a reconstrução da árvore filogenética conforme a Figura 14. Diante desta figura, pode-se observar que há correlação genética com HPVs isolados na América, África, Europa e Ásia.

Figura 15 - Reconstrução filogenética de seqüências nucleotídicas correspondentes a 450 pb do gene L1 do HPV, usando o método estatístico de *Neighbor-Joining*, de 28 amostras, no período de janeiro a outubro de 2014, em Roraima



Nota: Os valores de *bootstrap* estão expressos em porcentagem por 1000 réplicas.

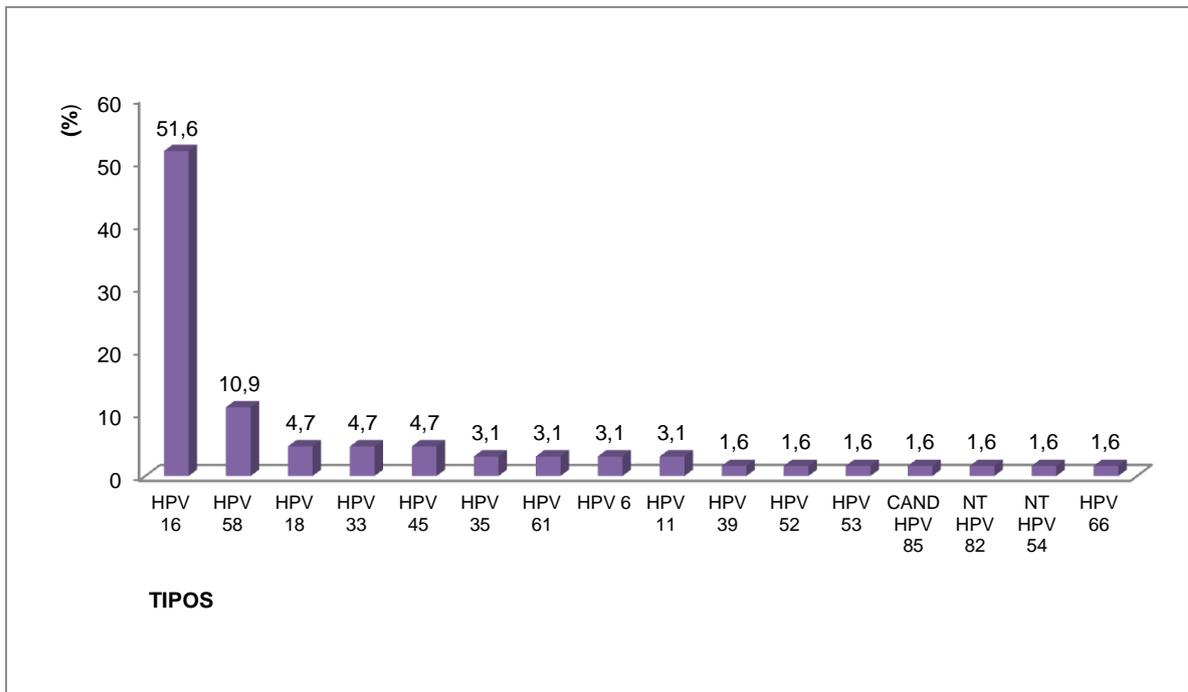
Tabela 6 - Resultados laboratoriais das 71 amostras da cérvix uterina do Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014

Ordem	Amostra	PCR (MY 09/11)	PCR (GP5+/6+)	Sequenciamento (BLAST)	Exame Histopatológico
1	1	+	+	HPV 16	Carcinoma escamoso
2	14	+	+	HPV 18	Carcinoma adenoescamoso
3	15	-	+	HPV 16	Carcinoma escamoso
4	27	+	+	HPV 61	Carcinoma escamoso
5	60	-	-	Não realizado	Carcinoma escamoso
6	61	-	+	HPV 45	Carcinoma escamoso
7	64	+	+	HPV 16	Carcinoma escamoso
8	68	-	+	HPV 45	Carcinoma escamoso
9	69	+	+	HPV 16	Carcinoma escamoso
10	2	+	+	HPV 39	LIEAG
11	3	+	+	HPV 16	LIEAG
12	6	+	+	Indeterminado	LIEAG
13	7	-	+	HPV 16	LIEAG
14	9	+	+	HPV 52	LIEAG
15	10	+	+	HPV 58	LIEAG
16	16	+	+	HPV 33	LIEAG
17	20	+	+	HPV 16	LIEAG
18	21	-	+	HPV 16	LIEAG
19	28	+	+	HPV 16	LIEAG
20	37	+	+	HPV 16	LIEAG
21	42	+	+	HPV NT 82	LIEAG
22	44	-	+	HPV 16	LIEAG
23	48	+	+	HPV 16	LIEAG
24	52	-	+	HPV 35	LIEAG
25	56	-	+	HPV 35	LIEAG
26	57	+	+	HPV 58	LIEAG
27	62	+	+	HPV 33	LIEAG
28	63	+	+	HPV 58	LIEAG
29	65	+	+	HPV 16	LIEAG
30	66	+	+	HPV 33	LIEAG
31	67	-	+	HPV 16	LIEAG
32	73	-	+	HPV 18	LIEAG
33	18	+	+	HPV 53	LIEBG
34	19	+	+	HPV 16	LIEBG
35	22	-	+	HPV 16	LIEBG
36	23	-	+	HPV 16	LIEBG
37	24	+	+	HPV 6	LIEBG
38	25	+	+	HPV 11	LIEBG
39	29	+	+	HPV 16	LIEBG
40	31	+	+	HPV 11	LIEBG
41	32	+	+	Cand HPV 85	LIEBG
42	39	+	+	HPV 58	LIEBG
43	41	+	+	HPV 61	LIEBG
44	49	-	+	HPV 16	LIEBG
45	4	-	+	HPV 16	Cervicite
46	5	-	+	HPV 16	Cervicite
47	8	+	+	HPV 66	Cervicite
48	11	-	+	HPV 16	Cervicite
49	12	-	+	HPV 16	Cervicite
50	13	-	+	HPV 16	Cervicite
51	17	-	+	HPV 16	Cervicite
52	26	-	+	HPV 16	Cervicite
53	30	-	+	HPV 16	Cervicite
54	34	+	+	HPV 58	Cervicite
55	35	-	+	Indeterminado	Cervicite
56	36	-	+	HPV 16	Cervicite
57	38	-	+	HPV 16	Cervicite
58	43	-	+	HPV 16	Cervicite
59	45	-	+	HPV 16	Cervicite
60	46	-	+	Indeterminado	Cervicite
61	47	+	+	Indeterminado	Cervicite
62	50	-	+	HPV 16	Cervicite
63	51	-	+	HPV 16	Cervicite
64	53	+	+	HPV 6	Cervicite
65	54	-	-	Não realizado	Cervicite
66	55	-	+	HPV 45	Cervicite
67	58	-	+	Indeterminado	Cervicite
68	70	+	+	HPV 58	Cervicite
69	71	+	-	HPV NT 54	Cervicite
70	72	+	+	HPV 18	Cervicite
71	40	+	+	HPV 58	Colo normal
TOTAL	71	38	68	64	

Nota: LIEBG = lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG = lesão intraepitelial de alto grau; NT = novo tipo; Cand = candidato.

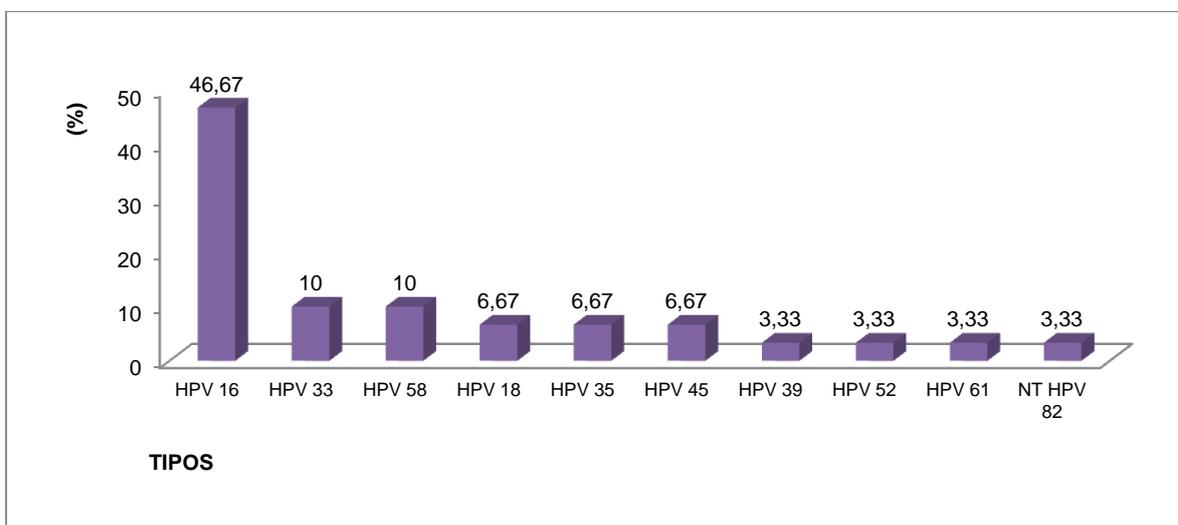
Nas 64 amostras com HPVs identificados, 16 tipos virais foram encontrados. Em ordem decrescente de frequência, o HPV 16 foi o mais prevalente, seguido dos HPV 58, HPV 18, HPV 33, HPV 45, HPV 35, HPV 61, HPV 6, HPV 11, HPV 39, HPV 52, HPV 53, cand HPV 85, NT HPV 82, NT HPV 54 e HPV 66, conforme demonstrado na Figura 15.

Figura 16 – Tipos e percentagens dos HPVs das 64 amostras de cérvix uterina do Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014



Das 71 amostras do estudo, em 32 delas o exame histopatológico mostrou a presença de lesões intraepiteliais de alto grau ou lesão invasora, sendo que em 30 foi possível a identificação viral (Tabela 6). Foram identificados 10 tipos de HPVs. O tipo viral mais frequente foi o HPV 16, seguido do HPV 33, HPV 58, HPV 18, HPV 35, HPV 45, HPV 39, HPV 52, HPV 61 e HPV NT 82. Na Figura 16 estão demonstradas as percentagens dos tipos virais nas lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) e nas lesões invasoras.

Figura 17 – Tipos e percentagens dos HPVs de 30 amostras da cérvix uterina com exame histopatológico compatível com lesão intraepitelial de alto grau ou carcinoma, no Estado de Roraima – janeiro a outubro de 2014



O tipo de maior prevalência (HPV16) está em concordância com a grande maioria dos estudos de prevalência de HPV. Já em relação aos demais tipos a concordância é parcial. Os estudos conduzidos a nível mundial, com milhares de mulheres com CCU, mostram que os tipos de HPVs mais prevalentes, em ordem decrescente, são HPV16, 18, 45, 31 e 33 (CLIFFORD et al., 2003; MUÑOZ et al., 2003). Resultados semelhantes em relação ao HPV 16 foram encontrados numa pesquisa para determinar os genótipos de HPV presentes em amostras de adenocarcinomas provenientes de vários continentes, que mostrou a prevalência dos tipos 16 (50,9%), 18 (31,6%) e 45 (11,6%) (PIROG et al., 2014). Outro estudo internacional identificou os genótipos de HPVs em amostras histológicas de casos de CCU diagnosticados no período entre 1940 e 2007, recuperadas de 11 países da América Central e do Sul, Ásia e Europa e identificou como sendo os mais prevalentes os tipos 16 e 18 (ALEMANY et al., 2014).

Vários estudos de meta-análise pesquisaram os tipos de HPVs mais prevalentes na América Central e do Sul. Os resultados de Clifford et al. (2003) mostraram como mais prevalentes nos casos de CCU os HPV 16, 18, 31, 45 e 33. Ciapponi et al. (2011) concordou com essa prevalência quando reuniu 79 trabalhos, de 18 países da América Latina e Caribe, incluindo 2.246 casos de lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG) e 5.540 de CCU, porém, para LIEAG, a prevalência em ordem decrescente foi HPV 16, 18, 58, 31 e 33. Já Smith et al.

(2007) relataram que, na América do Sul, os tipos de HPVs encontrados nos CCUs foram 16, 18, 31, 45, 52, 33, 35, 39, 58 e 59, e nas LIEAG os tipos 16, 58, 18, 51, 6, 31, 33, 11, 45 e 35.

No Brasil, os trabalhos publicados concordam que o HPV 16 é o tipo mais frequente nos casos de CCU e LIEAG, entretanto, mostram diferenças regionais quanto aos demais tipos. Na Região Centro-Oeste brasileira, Ribeiro et al. (2011) estudaram, em Goiânia, 198 amostras de LIEAG e carcinomas invasivos, onde o HPV 16 (52%) foi o de maior prevalência seguido do 31, 35, 52 e 18. Em Goiás, Rabello-Santos et al. (2003) estudaram 74 amostras histológicas de CCU e LIEAG e obteve o HPV 16 como o mais frequente, seguido dos tipos 33, 18 e 31. Em pesquisa realizada em Brasília, em 129 portadoras de lesões intraepiteliais, os autores identificaram o HPV 16 em 43,8%, HPV 58 em 12,5%, HPV 31 em 10%, HPV 53 em 6,3% e HPV 18 e HPV 33 em 3,8% das pacientes (CAMARA et al., 2003). Outro estudo que envolveu a cidade de Goiânia, porém associada à Campinas (Região Sudeste brasileira), concordou na prevalência do HPV 16 (49%) quando analisou 328 casos de lesões intraepiteliais e carcinomas invasores. O HPV 16 foi seguido em prevalência pelos HPV 58, 52, 31, 35 e 33 (RESENDE et al., 2014).

Na região nordeste brasileira, o DNA do HPV 16 também é o mais detectado, mas com diferenças na prevalência dos demais tipos. Bruno et al. (2014) revisaram 351 prontuários de mulheres com genotipagem positiva para HPV no Estado da Bahia. A proporção do HPV 16 aumentou com a severidade das anormalidades citohistopatológicas associadas: de 13,8% nas lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG), para 42,4% nas lesões de alto grau. Entre as mulheres com LIEAG, o HPV 16 foi o mais frequente, 42,4%, seguido do HPV 56 em 18,2%. Em mulheres com LIEBG, o HPV 56 estava presente em 18,4%, seguido pelo HPV 16 em 13,8%. Também em outras cidades do nordeste brasileiro, estudos mostraram a prevalência dos tipos de HPV. Em Natal, Fernandes et al. (2011) analisaram 48 amostras de mulheres com CCU. O genótipo do HPV 16 foi encontrado em 58,3% dos casos, seguido pelo HPV 58 (12,5%) e HPV 18 (8,3%). Os HPVs 33 e 45 constituíram o quarto genótipo mais encontrado, com 4,2% cada. Nessa mesma cidade, estudo anterior já havia demonstrado que o HPV 16 e o HPV 58 eram os mais prevalentes em mulheres com alterações citológicas (FERNANDES et al., 2008). No Recife, Baldez da Silva et al. (2009) observaram que entre as mulheres com lesões

intraepiteliais ou invasoras, o HPV 16 foi o mais frequente, seguido do 31, 33 e 18 (sendo os dois últimos em igual proporção). Resultado semelhante foi encontrado por Mendonça et al. (2010) que estudaram 72 mulheres com LIEAG ou carcinoma invasor na mesma cidade e encontrou o HPV 16 como de maior prevalência, seguido do 31 e 33. Anteriormente, Silva (2006) também já havia relatado que o HPV 16 era o tipo mais prevalente no Recife.

Na região sudeste do Brasil, Oliveira-Silva et al. (2011) analisaram amostras de mulheres com citologia alterada e normal, oriundas das cidades de Duque de Caxias e de Nova Iguaçu, ambas do Estado do Rio de Janeiro. Dentre as mulheres que possuíam citologia alterada prevaleceu o HPV tipo 16, seguido dos 45, 58 e 66. Na região Sul, o estudo de Krambeck et al. (2008), na cidade de Blumenau - SC, relatou 67% de positividade para o HPV 16 nas amostras com LIEAG. No Norte do Brasil, Castro et al. (2011), na cidade de Manaus, analisaram amostras com citologia alterada e normal. Dentre aquelas com citologia alterada, o HPV 16 foi o de maior prevalência (56%), seguido dos tipos 33, 58 e 68.

Diante do panorama de prevalências exposto, seja ele mundial, continental ou das regiões brasileiras, percebe-se concordância dos estudos na prevalência do HPV 16 como o tipo mais prevalente. As diferenças ocorrem em relação à prevalência dos demais tipos. O presente estudo concorda parcialmente com a maioria das pesquisas quando são considerados os 5 tipos mais prevalentes de HPV.

4.3 HPVs IDENTIFICADOS EM RORAIMA X VACINA ANTI-HPV

Os HPVs identificados foram analisados em relação ao grupo de alto risco oncogênico e aos tipos de HPVs incluídos na vacina tetravalente contra o HPV disponível no Brasil, conforme os quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Classificação dos tipos de HPVs das 64 amostras da cérvix uterina em relação ao grupo de alto risco oncogênico e aos tipos imunizáveis pela vacina anti-HPV tetravalente – Roraima – janeiro a outubro de 2014

Grupo/Tipo	n (%)
Alto risco oncogênico (16, 18, 26, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67,68, 69, 70, 82, 85)	
Sim	57 (89)
Não	7 (11)
HPV 16	
Sim	33 (51,6)
Não	31 (48,4)
HPV 18	
Sim	3 (4,7)
Não	61 (95,3)
HPV 6/11	
Sim	4 (6,3)
Não	60 (93,7)

Quadro 3 – Classificação dos tipos de HPVs das 30 amostras da cérvix uterina, compatíveis lesão intraepitelial de alto grau ou carcinoma, em relação ao grupo de alto risco oncogênico e aos tipos imunizáveis pela vacina anti-HPV tetravalente – Roraima – janeiro a outubro de 2014

Grupo/Tipo	n (%)
Alto risco oncogênico (16, 18, 26, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67,68, 69, 70, 82, 85)	
Sim	29 (96,7)
Não	1 (3,3)
HPV 16	
Sim	14 (46,7)
Não	16 (53,3)
HPV 18	
Sim	2 (6,7)
Não	28 (93,3)
HPV 6/11	
Sim	0 (0)
Não	30 (100)

Pode-se observar no Quadro 2 que, considerando todas as infecções cervicais por HPV que apresentavam exame citológico/colposcópico alterado, 89% dos vírus pertencem ao grupo de alto risco oncogênico, 51,6% são HPV 16, 4,7% HPV 18 e 6,3% HPV 6/11. Nesse grupo, a vacina tetravalente contra o HPV seria capaz de imunizar 62,6% das infecções. Levando-se em consideração apenas os tipos 16 e 18 de HPV (tipos de alto risco oncogênico), esse percentual seria de 56,3%.

Quando se analisa apenas o grupo da amostra composto por LIEAG e carcinomas invasores (Quadro 3), o percentual de HPV que pertence ao grupo de alto risco oncogênico é de 96,7%. Teoricamente, a vacina imunizaria 53,4% dos casos desse grupo.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou, para o ano de 2014, 50 casos novos de CCU para o Estado de Roraima – o câncer mais incidente (sem considerar os casos de câncer de pele não-melanoma) na população feminina desse Estado (BRASIL, 2014). Na categoria de CCU, estão incluídas as lesões invasivas (carcinomas) e as lesões intraepiteliais de alto grau. Esse estudo alcançou 32 casos e identificou 30, ou seja, 60% dos casos estimados. Embora Roteli-Martins et al (2012) demonstraram imunização parcial contra os HPVs 31 e 45 quando estudaram um grupo de mulheres após 8,4 anos da primeira dose da vacina bivalente contra o HPV, os resultados desse estudo permitem observar que a vacina contra o HPV, disponível no Brasil e fornecida pelo Ministério da Saúde, é capaz de proteger menos de 60% das infecções pelo HPV implicadas no desenvolvimento de CCU no Estado de Roraima, uma vez que o impacto da vacinação na perspectiva do controle do CCU depende da proporção de casos atribuídos aos HPV 16/18 e da cobertura alcançável.

Atualmente, a indústria farmacêutica Merck está desenvolvendo uma vacina experimental contra o HPV, que pretende conferir proteção para mais 5 tipos virais (31, 33, 45, 52, 58), ou seja, a vacina imunizará contra 9 tipos. Para o Brasil, isso aumentará a proteção contra o CCU, que atualmente está estimada em 69,7%, para 88,5% (SERRANO et al., 2014). Ao analisar a amostra desse estudo, percebe-se que essa nova vacina poderá evitar cerca de 83,3% dos casos de CCU nas mulheres de Roraima.

4.4 HPV 16 E HPV 18 X DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

A seguir, será demonstrada uma análise da possível correlação dos fatores sociodemográficos e comportamentais com a presença dos tipos de HPVs de alto risco oncogênico contemplados pela vacina anti-HPV (HPV 16 e HPV 18). O Quadro 4 mostra a análise univariada das 36 amostras que foram positivas para os HPVs 16 ou 18 considerando as proporções para cada 100.000 mulheres. Para os cálculos

de proporção foram utilizados os dados do IBGE relativos ao censo demográfico de 2010 (IBGE, 2012). Para as variáveis foram contadas as mulheres de 15 anos ou mais (exceto para estado civil que foram contadas mulheres de 10 anos ou mais). Definiu-se como indígena a mulher que mora em terras indígenas e se declarou indígena ou que mora fora das terras indígenas e se declarou indígena. Em relação à procedência, definiu-se como procedentes do interior todas as mulheres que residem no interior do Estado, sejam urbanas ou rurais. Já o Quadro 5 mostra a análise univariada das variáveis de prevalência considerando as 64 amostras que tiveram o tipo viral identificado e a positividade para o HPV 16/18.

Quadro 4 - Análise univariada da associação entre variáveis sociodemográficas e comportamentais e HPV 16 e 18 - Roraima - janeiro a outubro de 2014

Variáveis	HPV 16/18 (n=36)*	CI (IC 95%)	p valor	OR (IC 95%)
Idade			0,13	0,68 (0,35- 1,32)
15 a 39 anos	15	31/100.000		
> 40 anos	21	21/100.000		
Indígena			0,23	0,6 (0,21 - 1,69)
Sim	4	36/100.000		
Não	32	21,6/100.000		
Estado civil			0,07	0,51 (0,36 - 1,01)
Em união conjugal	23	27,7/100.000		
Outro	13	14,3/100.000		
Instrução			0,18	0,46 (0,24 - 0,89)
Até 1º grau	21	39,7/100.000		
> 1º grau	15	18,3/100.000		
Procedência			0,32	0,65 (0,33 - 1,25)
Interior	15	32/100.000		
Capital	21	20,7/100.000		
Renda familiar			0,01	0,3 (0,14 - 0,63)
≤ 1 salário mínimo	27	49,5/100.000		
> 1 salário mínimo	9	14,7/100.000		
Tabagismo			0,02	0,34 (0,17 - 0,71)
Atual/Prévio	10	57,6/100.000		
Nunca	26	19,9/100.000		

Nota: CI = coeficiente de incidência por 100.000 mulheres. IC = intervalo de confiança; OR = Odds Ratio; * = Número de casos de janeiro a outubro de 2014.

Quadro 5 - Análise univariada da associação entre variáveis comportamentais das 64 mulheres com HPVs identificados e a positividade para HPV 16 ou 18 – Roraima, janeiro a outubro de 2014

Variáveis	Mulheres HPV identificados (n=64)	HPV 16/18	p valor	OR (IC 95%)
Uso de anticoncepcional nos últimos 10 anos			0,08	0,48 (0,17- 1,3)
Sim	30	14 (46,7%)		
Não	34	22 (64,7%)		
Idade na sexarca			0,15	0,58 (0,21 - 1,58)
≤ 15 anos	34	17 (50%)		
> 15 anos	30	19 (63,3%)		
Parceiros sexuais durante a vida			0,36	0,82 (0,30 - 2,30)
≤ 4	36	21 (58,3%)		
≥ 5	28	15 (53,6%)		
Idade na 1ª gestação			0,3	0,8 (0,28 - 2,02)
<17 anos	34	18 (52,9%)		
≥18 anos	30	18 (60%)		
Conhecimento prévio do envolvimento do HPV no CCU			0,03	
Sim	47	30 (63,8%)		3,2 (1,02 - 10,31)
Não	17	6 (35,3%)		

Nota: IC = intervalo de confiança; OR = Odds Ratio.

No presente estudo, considerando-se os dados de incidência, a análise revelou que não houve associação estatisticamente significativa entre a infecção pelos HPV 16/18 e as variáveis estudadas como idade, ser indígena, estado civil, grau de instrução e local de residência. Já a associação com as variáveis renda familiar (OR= 0,3; IC 95%: 0,14 – 0,63) e tabagismo (OR= 0,34; IC 95%: 0,17 – 0,71) foi estatisticamente significativa (Quadro 4).

Os dados de prevalência (Quadro 5) mostram que não houve associação estatisticamente significativa entre a infecção pelos HPV 16/18 com o uso de anticoncepcionais nos últimos 10 anos, a idade na sexarca, o número de parceiros sexuais durante a vida e a idade na 1ª gestação. Apenas a variável sobre o conhecimento prévio do envolvimento do HPV no CCU mostrou-se significativamente associada (OR= 3,2; IC 95%: 1,02 – 10,31).

Outros estudos também não encontraram associação entre infecção pelo HPV e idade na sexarca, escolaridade e uso de anticoncepcionais (RAMA et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2014). Entretanto, alguns estudos mostraram associação entre infecção por HPV e idade na sexarca, idade na 1ª gestação e uso de anticoncepcionais (HERRERO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2006). SRIVASTAVA et al. (2014) percebeu associação de infecção de HPV 16 com

mulheres pertencentes às classes sociais menos privilegiadas. Similarmente, esse estudo também detectou associação dos HPV 16/18 com mulheres com renda familiar de até 1 salário mínimo.

Em revisão de literatura, WINKESLSTEIN (1990) analisou 33 estudos e concluiu que a maioria confirmava a associação positiva entre fumo e CCU. E, como nesse estudo, o tabagismo associado com infecção por HPV também foi relatado por HERRERO et al. (2001).

A associação significativa entre a infecção pelos HPV 16/18 e o conhecimento do envolvimento do HPV no CCU, observado nesse estudo, talvez possa ser explicado devido a pesquisa ter acontecido concomitante com a ampla divulgação da campanha de vacinação contra o HPV, que aconteceu no primeiro semestre de 2014, a qual enfatizou a necessidade de proteção para o vírus HPV afim de evitar o CCU.

Alguns estudos demonstram que ser casada ou viver com parceiro único como um fator protetor para a infecção pelo HPV quando comparada a solteiras, viúvas e separadas/divorciadas (BURK et al., 1996; GIULIANO et al., 2001; HERRERO et al., 2005; RAMA et al., 2008; SANJOSE et al., 2003). No entanto, esse estudo não observou esse fato. É possível que as mudanças no comportamento sexual verificadas nas últimas décadas tenham provocado diferentes exposições ao HPV tanto na população masculina quanto na feminina e, esse estudo, por ser transversal, não diferencia infecção incidente de infecção persistente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo corroboram outros estudos no Brasil que observam uma variabilidade da distribuição dos diversos genótipos de HPV, além de preencher uma lacuna no conhecimento dos tipos de HPVs circulantes no Estado de Roraima.

O perfil sócio-demográfico e comportamental das mulheres que procuraram os serviços especializados de patologia cervical ou de oncologia, oferecidos pelo SUS em Roraima, mostrou média de idade de 37 anos, a maioria era não-indígena, casada, com instrução até o 1º grau, renda familiar até 1 salário mínimo e procedência da capital. Em relação aos dados comportamentais, a maioria das mulheres não possuía histórico de tabagismo, não tinha feito uso de anticoncepcionais hormonais nos últimos 10 anos, com idade média na sexarca de 16 anos, teve 5 ou mais parceiros sexuais durante a vida e idade média na primeira gestação de 17 anos.

Os resultados desse estudo mostram que em Roraima, um Estado de alta incidência de CCU, os principais tipos de HPVs circulantes nas pacientes com anormalidades citológicas/coloscópicas são: HPV 16 (51,6%), HPV 58 (10,9%), HPV 18 (4,7%), HPV 33 (4,7%), HPV 45 (4,7%), HPV 35 (3,1%), HPV 61 (3,1%), HPV 6 (3,1%), HPV 11 (3,1%), HPV 39 (1,6%), HPV 52 (1,6%), HPV 53 (1,6%), cand HPV 85 (1,6%), NT HPV 82 (1,6%), NT HPV 54 (1,6%) e HPV 66 (1,6%).

Já os tipos de HPVs circulantes em lesões intraepiteliais de alto grau e em carcinomas da cérvix uterina são: HPV 16 (46,7%), seguido do HPV 33 (10%), HPV 58 (10%), HPV 18 (6,7%), HPV 35 (6,7%), HPV 45 (6,7%), HPV 39 (3,3%), HPV 52 (3,3%), HPV 61(3,3%) e HPV NT 82 (3,3%).

Variáveis demográficas e comportamentais foram, estatisticamente, correlacionadas com os HPVs 16 e 18. Das variáveis analisadas por incidência, a renda familiar (OR= 0,3; IC 95%: 0,14 – 0,63) e o tabagismo (OR= 0,34; IC 95%: 0,17 – 0,71) mostraram associação significativa. Já das variáveis analisadas por prevalência, apenas a variável sobre o conhecimento prévio do envolvimento do HPV no CCU (OR= 3,2; IC 95%: 1,02 – 10,31) mostrou-se como um fator positivo para a infecção pelos HPVs 16 e 18.

Embora este estudo tenha alcançado apenas 60% dos casos de CCU estimados para Roraima no ano de 2014, ao se considerar a prevalência dos genótipos de HPVs determinados nessa pesquisa, percebe-se que a atual imunização vacinal no Estado protegerá, do desenvolvimento dessa doença, menos de 60% das adolescentes vacinadas. Dessa forma, para a prevenção do CCU, o programa de triagem citológica (exame de *Papanicolaou*) continuará sendo de grande valia. Novos estudos permitirão definir, de forma mais precisa, os genótipos de HPVs mais frequentes em Roraima, que será relevante no planejamento das políticas públicas relacionadas à prevenção e ao controle do CCU.

REFERÊNCIAS

- AACR, American Association for Cancer Research. Cervical Carcinoma and Sexual Behavior: Collaborative Reanalysis of Individual Data on 15,461 Women with Cervical Carcinoma and 29,164 Women without Cervical Carcinoma from 21 Epidemiological Studies International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.18, p.1060-1069, 2009.
- AGORASTOS, T. et al. Safety of human papillomavirus (HPV) vaccines: A review of the international experience so far. **Vaccine**, v. 27, p. 7270-7281, 2009.
- ALEMANY, L. et al. Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 1, p. 88-95, 2014.
- ALVARENGA, G. C. et al. Papillomavirus humano e carcinogênese no colo do útero. DST – **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 12, p. 28-32, 2000.
- ASATO, T. et al. A large case control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing based genotyping. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1829-32, 2004.
- AYRES, A. R. G.; AZEVEDO E SILVA, G.. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 963-74, 2010.
- BALDEZ DA SILVA, M. F. P .T. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1437-1443, 2009.
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal Clinical Virology**, v. 32, p. 516-24, 2005.
- BERNARD, H.U. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **The Journal Infectious Diseases**, v. 170, p. 1077-85, 1994.
- BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antiviral Therapy**, v. 7 p. 219–237, 2002.
- BERNARD, H.U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-79, 2010.

BEZERRA, S. J. S. et al. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.

BOSCH, F. X.; de SANJOSE, S. Human papillomavirus in cervical cancer. **Current Oncology Reports**, v. 4, p. 175-183, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012: incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. [acesso em 19/06/2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Cadernos de Atenção Básica. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. n.13. Brasília, 2013a.

_____. Ministério da Saúde. Portal Brasil, 2013b. [acesso em 02/12/2013]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/09/cobertura-da-vacina-hpv-sera-ampliada-a-partir-de-2014>

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24, n. 3 p. S3/52–61, 2006.

BURK, R. D. et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 23, n. 4, p.333-41, 1996.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants **Virology**, v. 445, p. 232-243, 2013.

BRUNO, A. et al. Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 9, p. 416-22, 2014.

CAMARA, G. N. et al. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 879-83, 2003.

CASTELLSAGUE, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. **Journal National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 20-28, 2003.

CASTRO, M. M. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 186-196, 2011.

CIAPPONI, A. et al. Type-Specific HPV Prevalence in Cervical Cancer and High-Grade Lesions in Latin America and the Caribbean: Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

COGLIANO, V. et al. Carcinogenicity of combined oestrogen–progestagen contraceptives and menopausal treatment. **Lancet Oncology**, v. 6, p. 552–3, 2005.

CUTTS, T. T. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, n. 9, p. 719-726, 2007.

de PALO, G. **Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior**. 2. ed., Rio de Janeiro: Medsi Editora, 1996.

de RODA HUSMAN, A. M. et al. The Use of General Primers Gp5 and Gp6 Elongated at Their 3' Ends with Adjacent Highly Conserved Sequences Improves Human Papillomavirus Detection by Pcr. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-62, 1995.

de SANJOSÉ, S. et al. Human Papillomavirus (HPV) and Related Cancers in the Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) Countries. A WHO/ICO HPV Information Centre Report. **Vaccine**, v. 30, n. 4, 2012. [acesso em 19/06/2013]. Disponível em <http://www.gavialliance.org/library/publications/other-publishers/other/human-papillomavirus-and-related-cancers-in-gavi-countries/>

de VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, p. 525-541, 2006.

EUTIASPE, L. et al. Comparison between Two Methods for Molecular Characterization of Human Papillomavirus. **DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 25, n. 1, p. 13-15, 2013.

FARAH, S. B. DNA: **Segredos & Mistérios**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 538 p.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v.22, n. 33, p. 5201–7, 2003.

FEOLI-FONSECA, J.C. et al. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR direct sequencing approach. **Journal of Medical Virology**, v. 63, p. 284-92, 2001.

FERENCZY, A.; BERGERON, C.; RICHART, R. M. Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections. **Obstetrics & Gynecology**, v. 74, p. 950- 954, 1989.

FERNANDES, T. A. A. M. et al. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 573-578, 2008.

FERNANDES, J. V. et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, p. 1321-1326, 2011.

FINNEN, R. L. et al. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsids proteins. **Journal of Virology**, v. 77, p. 4848-4826, 2003.

FONSECA, A. J. et al. Epidemiologia e impacto econômico do câncer de colo de útero no Estado de Roraima: a perspectiva do SUS. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32 n. 8, p.386-92, 2010.

FONTAINE, V. et al. Evaluation of combined general primer mediated PCR sequencing and type specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 928-34, 2007.

FORMAN, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 20, n. 30 p. F12-23, 2012.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association Journal**, v. 164, p. 1017-25, 2001.

GARCÍA-ESPINOSA, B.; MORO-RODRÍGUEZ, E.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain. **BioMedCentral Cancer**, v. 12 p.533, 2012.

GIULIANO, A. R. et al. Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 10 n. 11, p. 1129-36, 2011.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.357-61, 2000.

HERRERO, R. et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. **The Journal Infectious Diseases**, v. 191, n. 11, p. 1796-807, 2005.

HO, G. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 423-428, 1998.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 940-945, 2003.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010. [acesso em 10/02/2015]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rr>

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV Master Species list 2009. [acesso em 15/09/2013]. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>

JACOBS, M.V. et al. A general primer GP5+/GP6(+) mediated PCR enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high risk and 6 low risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 791-5, 1997.

JACYNTHO, C. **HPV - O vírus do câncer pelo sexo? Nossas dúvidas!** Rio de Janeiro. Editora Cláudia Jacyntho, 2001.

JO, H.; KIM, J. W. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. **Cancer Therapy**, v 3, p. 419-434, 2005.

KODNER, C. M.; NASRATY, S. Management of genital warts, **American Family Physician**, v. 70, p. 2335-42, 2004.

KOSEL, S. et al. Type-specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting – improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridisation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 6, p. 787-791, 2003.

KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. 2 ed. São Paulo: Roca editora, 2006. p. 79-93.

KRAMBECK, W. M. et al. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. **Clinical and Experimental Obstetrics Gynecology**, v. 35, n. 3, p. 175-8, 2008.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran Patologia Bases patológicas da doença**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2010. p. 1025-1032.

LEONARDO, A. et al. Desarrollo De Una Vacuna Profilactica De Segunda Generacion Contra El Papilomavirus Humano. **Medicina**, v. 71. p.261-266, 2011.

MACHADO JUNIOR, L. C.; DALMASO, A. S.; CARVALHO, H. B. Evidence for benefits from treating cervical ectopy: literature review. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 126, n. 2, p. 132-9, 2008.

MANOS, M. M. et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-14, 1989.

MARTIN, C. N. R. **Avaliação da cobertura do exame de Papanicolaou e seus fatores determinantes em capital brasileira de elevada incidência de câncer de colo de útero**. 2014. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2014.

MÉNDEZ, F et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 1158-1165, 2005.

MENDONÇA, V. G. et al. Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 10, p. 476-85, 2010.

MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews**, v. 10, p. 550-560, 2010.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n. 6, p. 518-257, 2003.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 3-10, 2006.

NASCIMENTO, F. S. et al. Nested PCR on HPV screening in cervical smears from asymptomatic patients. **Virus Reviews & Research**, v. 15, n.1, 2010.

OLIVEIRA, F. A. et al. Human papillomavirus genotype distribution and risk factors for infection in women from a small municipality in north east Brazil. **International Journal of STD & AIDS**, v. 23, 2012.

OLIVEIRA-SILVA, M. et al. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. **Virology Journal**, v. 8, p. 4, 2011.

PATEL, D. A. et al. Development and evaluation of a PCR and mass spectroscopy (PCR-MS) based method for quantitative, type specific detection of human papillomavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 160, p. 78-84, 2009.

PIN, C. Y. et al. Comparison of Human Papillomavirus Detection and Genotyping with Four Different Prime Sets by PCR-Sequencing. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 26, p. 40-47, 2013.

PIROG, E.C. et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. **Modern Pathology**, v. 27, p. 1559-1567, 2014.

QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1304-1310, 1997.

RABELO-SANTOS, S. H. et al. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

RESENDE, L. S. A. et al. A portrait of single and multiple HPV type infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 214, 2014.

RIBEIRO, A. A. et al. Association Between HPV Types and Species Groups and Cervical Neoplasia from a High Risk area for Cervical Cancer, Goiânia, Brazil. **Int J Gynecol Pathol**, v. 30, n. 3, p. 288-94, 2011.

RICCI, M. D. et al. **Oncologia ginecológica. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento**. 1 ed. Barueri, SP: Editora manole, 2008. 133p.

ROCHA-ZAVALETA, L. Human papillomavirus infection and cervical ectopy. **Int Gynaecol Obstet**, v. 85, n. 3, p.259-66, 2004.

RODEN, R.B.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus is resistant to desiccation. **The Journal Infectious Diseases**, v. 176, p. 1076-1079, 1997.

ROTELI-MARTINS, C. M. et al. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine Up to 8.4 years of follow-up. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 3, pág 390–397, 2012.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequencing in DNA. **Science**, v. 214, p. 1205-1210, 1981.

SANJOSE, S. et al. Cervical human papilomavírus infection in the female population in Barcelona, Spain. **Sexually Transmitted Disease**, v. 30, n. 10, p. 788-93, 2003.

SCHIFFMAN, M. Human Papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **National Cancer Institute**, v. 103, p. 368-83, 2011.

SERRANO, B. et al. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). **Cancer Epidemiology**, v. 38, pág. 748–756, 2014.

SHIM, H. et al. Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by multiplex-PCR. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 284, 2010.

SILVA, T. T. et al. Identification of papillomavirus types and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, p. 285-91, 2006.

SMITH, J. F. et al. Antibodies from women immunized with Gardasil cross-neutralize HPV 45 pseudovirions. **Human Vaccines**, v.3 p. 109-115, 2007.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 621–32, 2007.

SODERLUND-STRAND, A.; DILLNER, J.; CARLSON, J. High throughput genotyping of oncogenic human papilloma viruses with MALDITOF mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 86-92, 2008.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p.155-160, 2005.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: Acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.1093, 2011.

van den BRULE, A.J. et al. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high throughput identification of human papilomavírus genotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 779-87, 2002.

VILLA, L. L.; DENNY, L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. S71-S80, 2006.

WELLINGS, K. et al. Sexual behavior in Britain – the national survey of sexual attitudes and lifestyles. **England**: Penguin, 1994.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-30, 1995.

WILKELSTEIN, W. Jr. Smoking and cervical câncer. Current status: a review. **Journal of Epidemiology**, v.131, pág 945-958, 1990.

WINER, R. L. et al. Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. **The Journal Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 279–282, 2008.

WHO, World Health Organization. **Cervical cancer screening in developing countries**. Report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization 2002.

zur HAUSEN, H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização genotípica do Papilomavírus humano em infecções cervicais no Estado de Roraima

Pesquisador: Pablo Oscar Amézaga Acosta

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21743213.4.0000.5302

Instituição Proponente: Universidade Federal de Roraima - UFR

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Roraima - UFR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 467.430

Data da Relatoria: 22/11/2013

Apresentação do Projeto:

A pesquisa propõe identificar os principais tipos de HPV presentes nas lesões de alto grau e carcinomas da cérvix uterina, além de traçar o perfil epidemiológico das pacientes acometidas por tais patologias no Estado. Serão colhidas 70 amostras cervicais em pacientes atendidas no Hospital Geral de Roraima e no Hospital Materno-infantil

Nossa Senhora de Nazareth com diagnósticos estabelecidos pela citologia e/ou histopatologia. A colheita acontecerá no período de outubro de 2013 a novembro de 2014, de adesão livre e voluntária, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pela participante do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar o perfil genotípico e epidemiológico da infecção pelo Papilomavírus (HPV) em lesões intra-epiteliais de alto grau e carcinomas da cérvix uterina no Estado de Roraima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para a paciente: o material biológico para o estudo será colhido durante a execução do exame clínico pelo médico responsável pelo tratamento da paciente (a coleta vai acontecer imediatamente antes da colposcopia no caso de lesão de alto grau; e imediatamente antes da cirurgia nos carcinomas). O manuseio da escova poderá causar um leve desconforto, passageiro, que cessa em

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº2413

Bairro: Aeroporto

CEP: 69.304-000

UF: RR

Município: BOA VISTA

Telefone: (95)3621-3112

Fax: (95)3621-3112

E-mail: coep@prpppg.ufr.br

Continuação do Parecer: 467.430

alguns segundos. Para a equipe de pesquisa: a parte laboratorial da pesquisa será realizada no laboratório de nível de Biossegurança 3. A equipe profissional possui treinamento específico no manejo de agentes patogênicos, potencialmente infecciosos, e é supervisionada por profissional altamente capacitado e que possuem experiência com estes agentes.

Quanto aos benefícios, haverá benefício direto para a paciente, pois ela será conhecedora do(s) tipo(s) viral que causou a infecção. Para a saúde pública, o benefício consiste em auxiliar na elaboração de políticas públicas voltadas para imunização adequada, uma vez que a vacina para o Papilomavírus humano(HPV) é tipo-dependente e não há nenhum estudo em Roraima sobre os tipos circulantes de HPV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão colhidas 70 amostras cervicais em pacientes atendidas no Hospital Geral de Roraima e no Hospital Materno-infantil Nossa Senhora de Nazareth com diagnósticos estabelecidos pela citologia e/ou histopatologia. A colheita acontecerá no período de outubro de 2013 a novembro de 2014, de adesão livre e voluntária, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pela participante do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados estão de acordo com as exigências necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação pelo Colegiado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O orçamento de R\$ 7.000,00 é compatível com o desenvolvimento da pesquisa. O tamanho da amostra de 70 sujeitos está de acordo com a metodologia de estudo aplicada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº2413

Bairro: Aeroporto

CEP: 69.304-000

UF: RR

Município: BOA VISTA

Telefone: (95)3621-3112

Fax: (95)3621-3112

E-mail: coep@prpppg.ufrr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 467.430

BOA VISTA, 25 de Novembro de 2013

Assinador por:
Ijanílio Gabriel de Araújo
(Coordenador)

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora para participar da Pesquisa **Caracterização genotípica do Papilomavírus humano em infecções cervicais no Estado de Roraima**, sob a responsabilidade da pesquisadora Elaine Giacobbo, a qual pretende investigar a presença de Papilomavírus humano (HPV) em mulheres que possuem lesão pré-cancerosa ou cancerosa no colo do útero. O HPV é a principal causa para o desenvolvimento do câncer do colo do útero. Existem vários tipos de HPV.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da colheita de células do colo do útero. Essas células serão colhidas pelo seu médico durante o exame clínico do seu colo do útero, ou seja, no mesmo momento que será feito o procedimento de retirada da parte do colo do útero que está afetada.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa consistem num leve e passageiro desconforto que passará em alguns segundos. Se você aceitar participar, terá como benefício direto o conhecimento do tipo de HPV que está afetando o seu colo do útero. Também estará contribuindo para melhor conhecimento dessa doença que afeta muitas mulheres aqui no Estado de Roraima, que assim, no futuro poderá ser evitada com o uso de vacina. O resultado do exame será entregue ao seu médico.

Se depois de consentir em sua participação a senhora desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. A senhora não terá nenhuma despesa e

também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, a senhora poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço : **Laboratório de Biologia Molecular** situado na Avenida Capitão Ene Garcez, nº 2413. Campus Paricarana – UFRR Bairro: Aeroporto. CEP: 69304-000 Boa Vista / RR. Também pode entrar em contato com a pesquisadora pelo telefone (95) 9111 6842.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informada sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

Data: ___/___/___

Elaine Giacobbo – Pesquisadora Responsável

ANEXO 3

Caracterização genotípica do Papilomavírus humano em infecções cervicais no Estado de Roraima		
QUESTIONÁRIO		
1. Data da entrevista ____/____/____	2. Nome	
3. Resultado da citologia/histologia:		
4. Qual a data do seu nascimento?	5. Qual a sua idade?	6. Qual o seu endereço?
7. Qual seu estado civil? <input type="checkbox"/> Solteira <input type="checkbox"/> Casada <input type="checkbox"/> Amigada <input type="checkbox"/> Divorciada <input type="checkbox"/> Viúva	8. Qual a sua raça/cor <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Preta <input type="checkbox"/> Oriental <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Outros	9. Qual a sua escolaridade? <input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> Primeiro grau incompleto <input type="checkbox"/> Primeiro grau completo <input type="checkbox"/> Segundo grau incompleto <input type="checkbox"/> Segundo grau completo <input type="checkbox"/> Curso profissionalizante após o segundo grau <input type="checkbox"/> Universidade
10. Qual sua profissão?	11. Qual a sua renda familiar? <input type="checkbox"/> 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> 2-3 salários mínimos <input type="checkbox"/> 3-4 salários mínimos <input type="checkbox"/> 5-6 salários mínimos <input type="checkbox"/> acima de 6 salários mínimos	
12. Qual das seguintes situações melhor descreve o seu hábito de fumar? <input type="checkbox"/> Eu nunca fumei <input type="checkbox"/> Eu fumei no passado, mas não fumo atualmente <input type="checkbox"/> Eu geralmente fumo menos de uma carteira por dia <input type="checkbox"/> Eu geralmente fumo em torno de uma carteira ou mais por dia	13. Idade da 1ª gestação:	
	14. Você está grávida no momento? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
16. Idade da 1ª relação sexual:	15. Você utilizou anticoncepcional oral ou injetável nos últimos 10 anos? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
	17. Qual o número de parceiros sexuais que você já teve na vida? <input type="checkbox"/> um <input type="checkbox"/> dois <input type="checkbox"/> três <input type="checkbox"/> quatro <input type="checkbox"/> cinco ou mais	
18. Você já teve alguma doença sexualmente transmissível? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	19. Você já tinha ouvido falar de HPV antes de ser convidada para esse estudo? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	

<p>20. Você sabia das causas do câncer de colo do útero?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p>	<p>21. Você já tinha feito o exame preventivo ou exame de Papanicolaou?</p> <p><input type="checkbox"/> Sim. Há quanto tempo?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p>22. Em quais cidades você já morou?</p>
--	--