

**UEA**

UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DO  
AMAZONAS

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**ALESSANDRA SILVA E SILVA**

**PREVALÊNCIA DOS SUBTIPOS VIRAIS 16 e 18 DE PAPILOMAVIRUS HUMANO  
(HPV) EM MULHERES DA CIDADE DE MANAUS/AM**

**MANAUS  
2018**

**ALESSANDRA SILVA E SILVA**

**PREVALÊNCIA DOS SUBTIPOS VIRAIS 16 e 18 DE PAPILOMAVIRUS HUMANO  
(HPV) EM MULHERES DA CIDADE DE MANAUS/AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende**  
**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Giuliano Bica**

**MANAUS**  
**2018**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586p	<p>Silva, Alessandra Silva e Prevalência dos subtipos virais 16 e 18 de Papilomavirus humano (HPV) em mulheres da cidade de Manaus/AM. / Alessandra Silva e Silva. Manaus : [s.n], 2018. 5 f.: color.; 28 cm.</p> <p>Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Cleiton Fantin Rezende Coorientador: Cláudia Giuliano Bica</p> <p>1. Câncer do colo do útero. 2. papilomavirus humano. 3. HPV 16. 4. HPV 18. 5. Manaus-AM. I. Cleiton Fantin Rezende (Orient.). II. Cláudia Giuliano Bica (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Prevalência dos subtipos virais 16 e 18 de Papilomavirus humano (HPV) em mulheres da cidade de Manaus/AM.</p>
-------	--

*Aos meus pais,  
que sempre se dedicaram,  
me incentivaram e estiveram  
presentes em todas as etapas  
da minha vida...*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos inesquecíveis!

À Universidade do Estado do Amazonas e à Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA), que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende, pelas correções, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Giuliano Bica e as gurias do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos médicos ginecologistas, Dra. Elisangela Santana e Dr. Winston Igoam, por me permitirem fazer as coletas nos seus consultórios.

Aos professores e amigos do curso de Mestrado em Biotecnologia pelas experiências e ensinamentos compartilhados nesses dois anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Genética da UEA, em especial, ao meu amigo Anderson Barbosa, pela grande ajuda na metodologia desse trabalho.

À minha querida avó, Joana Dias, representante da família como um todo, pelo amor e preocupação comigo, mesmo com a saúde debilitada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização de mais essa etapa da minha vida.

Em especial, à melhor família que alguém poderia ter. Meus pais: Almir Prado e Marinalva Dias, minhas irmãs: Adriana e Ananda, pelo amor, apoio financeiro incondicional, amizade e a confiança de sempre. Essa conquista é nossa! Amo vocês!

**MUITO OBRIGADA!**

*A sabedoria de um ser humano não é  
definida pelo quanto ele sabe, mas  
pelo quanto ele tem consciência de  
que não sabe...*

*Augusto Cury*

## RESUMO

A história natural do câncer do colo do útero está fortemente relacionada à presença de infecção pelo Papilomavirus humano (HPV), a sua relação com o câncer cervical é preocupante, pois uma em cada quatro mulheres apresentam contaminação pelo vírus. A estimativa é que 70% de todos os cânceres cervicais do mundo são provocados pelos HPV 16 e 18. Dessa forma, a realização do presente estudo objetivou contribuir para a identificação dos subtipos virais de HPV circulantes na população de Manaus-AM. Foi feita a coleta de amostra cervical de 49 mulheres, dentro dos critérios de elegibilidade do estudo, então, feita a extração do DNA das amostras e analisadas quanto à presença do vírus no material genético, por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando os *primers* genéricos (GP05/06), por fim, foi feita a identificação dos subtipos virais presentes, utilizando *primers* específicos dos principais subtipos já estudados (16 e 18). O DNA-HPV positivo foi detectado em 100% das amostras incluídas no trabalho. O HPV 16 foi o tipo mais prevalente na maioria das lesões com 29 (59,2%) dos casos positivos e o HPV 18 foi detectado em 4 (8,2%) mulheres. Infecções múltiplas ocorreram em 8,2% dos casos e as infecções por outros tipos de HPV foram detectadas em 40,8% das amostras. Esses dados têm implicações clínicas quando se considera a efetividade na prevenção das Neoplasias Cervicais das atuais vacinas profiláticas para HPV, dado que sua cobertura, em relação aos HPV de alto risco oncogênico, é restrita aos tipos 16 e 18.

**Descritores:** Câncer do colo do útero; papilomavirus humano; HPV 16; HPV 18; Manaus-AM.

## ABSTRACT

The natural history of cervical cancer is strongly related to the presence of papillomavirus (HPV) infection, its relation with cervical cancer is worrisome because one in each four women has virus contamination. It is estimated that 70% of all cervical cancers in the world are caused by HPV 16 and 18. Thus, the realization of this study aimed to contribute to identifying the viral subtypes of circulating HPV in the population of Manaus-AM. Was then made the collection of cervical sample of 49 women, within the criteria of eligibility of the study, was made DNA extraction from the samples and analysis of the presence of the virus in the genetic material, by polymerase chain reaction (PCR), using the generic primers (GP05/06), finally, the identification of the viral subtypes present, using specific primers of the major subtypes already studied (16 and 18). Positive HPV-DNA was detected in 100% of the samples included in the study. HPV 16 was the most prevalent type in most lesions with 29 (59.2%) of the positive cases and HPV 18 was detected in 4 (8.2%) women. Multiple infections occurred in 8.2% of cases and infections by other types of HPV were detected in 40.8% of samples. These data have clinical implications when considering an effectiveness in the prevention of Cervical Neoplasms of current prophylactic HPV vaccines, since their coverage, relative to the HPV of oncogenic high risk, is restricted at 16 and 18.

**Keywords:** Cervical cancer; Human papillomavirus; HPV 16; HPV 18; Manaus-AM.

## Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema da morfologia interna dos Papilomavirus humanos. Observa-se a dupla fita de DNA circular em verde, como material genético, bem como o capsídeo aqui representado na cor marrom. (Fonte: <http://pt.dreamstime.com>). ..... 17
- Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Observa-se as fases de leitura organizadas em três regiões: a região precoce (composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), a região tardia (composta pelos genes L1 e L2) e a região controladora LCR. (Fonte: Adaptado de Muñoz, 2006). ..... 18
- Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% com produtos amplificados por PCR para os *primers* genéricos de HPV. C+: Controle positivo; 33-22: Amostras; C-: Controle negativo; M: Marcador molecular de 100pb, da *Invitrogen Life Technologies*. ..... 30
- Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% com produtos amplificados por PCR para os *primers* específicos de HPV 16. C+: Controle positivo; 01-14: Amostras; C-: Controle negativo; M: Marcador molecular de 100pb, da *Invitrogen Life Technologies*. ..... 31
- Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% com produtos amplificados por PCR para os *primers* específicos de HPV 18. C+: Controle positivo; 01-14: Amostras; C-: Controle negativo; M: Marcador molecular de 100pb, da *Invitrogen Life Technologies*. ..... 31

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição segundo os resultados de diagnóstico molecular das mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus – AM.....	31
Tabela 2. Relação entre os resultados do HPV 16 e HPV 18 em mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus - AM. ....	31
Tabela 3. Resultados das citologias em relação ao HPV 16 em mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus - AM. ....	32
Tabela 4. Resultados das citologias em relação ao HPV 18 em mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus - AM. ....	33

## Lista de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição segundo as unidades de saúde que fizeram parte da pesquisa, Manaus - AM.....29

Gráfico 2. Distribuição segundo a idade das mulheres amostradas, Manaus - AM. .29

## Lista de Siglas

**AM** - Amazonas

**ASC-US** - Células escamosas atípicas de significado indeterminado

**ASC-H** - Células escamosas atípicas em que não é possível se excluir uma lesão de alto grau

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**E1-E7** - Região precoce ou *early* do genoma do HPV

**HPV** - Papilomavirus Humano

**IARC** - *International Agency for Research on Cancer*

**INCA** - Instituto Nacional de Câncer

**L1** - Região tardia ou *late* do genoma do HPV – proteína do capsídeo principal

**L2** - Região tardia ou *late* do genoma do HPV – proteína do capsídeo

**LCR** - Região longa de controle presente no genoma do HPV

**NIC** - Neoplasia intraepitelial cervical

**NIC I** - Neoplasia intraepitelial cervical grau I

**NIC II** - Neoplasia intraepitelial cervical grau II

**NIC III** - Neoplasia intraepitelial cervical grau III

**ORF** - *Open read frame* ou região aberta de leitura

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**PAM** - Policlínica Codajás

**PJBS** - Policlínica João dos Santos Braga

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

**UEA** - Universidade do Estado do Amazonas

**UFCSPA** - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1 Epidemiologia .....	14
2.2 Câncer do Colo do Útero, Neoplasias e o HPV .....	15
2.2.1 HPV e sua estrutura genômica .....	16
2.2.2 Classificação dos HPV .....	18
2.2.3 Ciclo replicativo dos HPV .....	19
2.3 Diagnóstico .....	20
2.4 Biologia molecular e o HPV .....	21
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 Geral .....	23
3.2 Específicos .....	23
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
4.1 Tipo de estudo e locais de execução.....	24
4.2 Critérios de Elegibilidade .....	24
4.2.1 Critérios de Inclusão .....	24
4.2.2 Critérios de Exclusão .....	24
4.2 Coleta e obtenção do material.....	24
4.3 Extração do DNA .....	25
4.4 PCR para detecção do DNA viral.....	25
4.5 PCR para detecção do subtipo viral .....	26
4.6 Análises Estatísticas .....	27
<b>5. ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>28</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
6.1 Coleta .....	29
6.2 Detecção e Tipagem Viral.....	30
6.3 Comparação dos resultados dos exames citológicos com as análises de biologia molecular...	32
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>10. ANEXO .....</b>	<b>44</b>
10.1 Parecer Favorável do Comitê de Ética.....	44
10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavirus humano (HPV) é a principal causa das ocorrências de câncer cervical e neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em todo o mundo. Cerca de 500 mil casos de câncer cervical surgem a cada ano e 200 mil mulheres morrem eventualmente da doença. Estima-se que, aproximadamente, 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras do HPV e que 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas por um ou mais tipos desse vírus em algum momento de suas vidas, ocorrendo, diversas vezes, de forma assintomática (INCA, 2012).

No Brasil, o câncer uterino é a terceira causa de morte Neoplasia. Conseqüentemente, há forte motivação para avaliar o uso de testes de HPV na triagem do câncer cervical, que outras melhorias na normalização dos métodos de ensaio. Em 2016, foram estimados 16.340 novos casos de câncer do colo do útero. Na análise regional, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte do Brasil, com 23,97 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2015). A compreensão do HPV é de fundamental importância para o controle do câncer do colo uterino.

O câncer de colo do útero afeta predominantemente células escamosas, as quais sofrem alterações que induzem a sua proliferação descontrolada e o crescimento desordenado e progressivo do epitélio, cujo avanço da doença pode causar a invasão de tecidos fora do colo, em um período aproximado de 10 a 20 anos, dando a paciente um mau prognóstico (FERREIRA, 2009; INCA, 2012).

Os vírus do papiloma humano (HPV) pertencem ao gênero Papilomavirus (família *Papillomaviridae*). Já foram descritos mais de 100 genótipos de HPV e aproximadamente 40 tipos infectam as regiões genitais. A maior parte das lesões causadas na pele ou em mucosas pelo HPV apresenta crescimento limitado e regride espontaneamente. Alguns tipos de HPV podem, entretanto, levar à formação de verrugas. No caso de infecção cervical persistente, pode haver alto risco de a mulher desenvolver lesões pré-cancerígenas podendo, em alguns anos, progredir em câncer (CDC, 2010).

A transmissão do HPV ocorre por contato direto com a região infectada. Os HPV genitais são transmitidos durante as relações sexuais, quando podem ocorrer lesões em diversos locais, como vagina, cérvix, pênis e ânus. O uso de preservativos diminui a possibilidade de transmissão do HPV, mas não a evita completamente, uma vez que o vírus poderia ser transmitido até por atividades sexuais em que não ocorre a penetração. Dessa forma, alguns autores acreditam que a contaminação só possa ser efetivamente evitada pela abstinência de qualquer prática sexual (NADAL e NADAL, 2008).

As verrugas genitais encontradas no ânus, pênis, vulva ou em qualquer outra área da pele ou mucosas podem ser diagnosticadas por exames urológicos, ginecológicos ou dermatológicos. Entretanto, no caso das lesões precursoras do câncer cervical decorrentes de infecção pelo HPV, o diagnóstico só pode ser feito através do exame citopatológico, conhecido como exame preventivo de Papanicolau.

Estudos indicam que a implantação desse exame com boa qualidade de testagem tem diminuído a incidência desse tipo de câncer e sua mortalidade em diversos países (SASLOW et al., 2012). No Brasil, recomenda-se o rastreamento prioritário para mulheres que tem ou já teve vida sexual e que estão entre 25 e 64 anos de idade. Ainda segundo as recomendações, os dois primeiros exames devem ser anuais e, caso ambos os resultados sejam normais, os exames devem ser repetidos com periodicidade de três anos (INCA, 2015).

Diante do exposto, em função de o câncer do colo do útero ser o mais incidente na região Norte e haver poucos trabalhos publicados com essa temática, propomos a realização deste projeto, para contribuir no estudo dos subtipos do vírus HPV nesta região do Brasil.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Epidemiologia

A totalidade de novos casos de câncer no mundo leva a crer que a maioria ocorra em países em desenvolvimento, e pelo menos um terço deles poderia ser evitado (SOUSA et al., 2011; INCA, 2012). Mesmo na tentativa de se criar padrões mais característicos de países ricos em relação aos de baixa e média renda, o padrão está mudando rapidamente e vem-se observando um aumento progressivo nos cânceres de pulmão, mama e cólon e reto, os quais, historicamente, não apresentavam essa importância e magnitude (INCA, 2012).

No entanto, quando mencionado tumores malignos nos órgãos genitais femininos, sem dúvida, o câncer de colo de útero se torna o tipo mais frequente. A prevalência dessa neoplasia evidencia-se entre a faixa etária dos 20 aos 29 anos e, o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária entre 50 a 60 anos e, ao mesmo tempo, que a doença possui grande frequência, com exceção do câncer de pele, é o tipo de câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente (INCA, 2012; MEDEIROS et al., 2005).

Mundialmente, o câncer do colo uterino, possui uma prevalência de 7,9% de novos casos ao ano, com índice de mortalidade de 7,5% das mulheres acometidas pela doença e a prevalência da neoplasia chega a, até, 9% dos casos (IARC, 2014). Em locais como a África e América Latina, este tipo de câncer apresenta altos coeficientes de prevalência e mortalidade, em mulheres em período reprodutivo e de baixo nível socioeconômico. Dessa maneira, a doença compromete seus papéis no mercado de trabalho e as priva do convívio familiar, acarretando prejuízo social considerável (MEDEIROS et al., 2005; De MENDONÇA, 2006).

Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, se observa uma redução na prevalência e mortalidade da doença nos últimos 50 anos, em, aproximadamente, 1,5% dos casos ao ano, cujo decréscimo é resultante de programas de rastreamento sistemáticos em populações de risco, que utilizam o exame de Papanicolau para detecção de lesões ainda iniciais, antes do desenvolvimento do câncer invasivo (De MENDONÇA, 2006).

Estima-se que, aproximadamente, 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras do HPV e que 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas por um ou mais tipos desse vírus em algum momento de suas vidas, ocorrendo, diversas vezes, de forma assintomática (INCA, 2012). No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer do colo do útero são elevadas, sendo em algumas regiões o tipo de câncer mais comum na população feminina (WOLSCHICK et al., 2007). Em 2016-2017, são esperados no Brasil, 16.340 casos novos, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Na análise regional, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte do Brasil, com 23,97 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2015). A compreensão do HPV é de fundamental importância para o controle do câncer do colo uterino.

Ao considerar que o câncer de colo uterino é uma neoplasia com incidência e mortalidade elevadas, passível de detecção precoce e alto poder de cura, se detectada em estágios iniciais, destaca-se a importância da realização do exame de Papanicolau, a fim de que haja a ação preventiva e o controle da doença (AMORIM et al., 2006; ANDRADE et al., 2014).

## **2.2 Câncer do Colo do Útero, Neoplasias e o HPV**

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado a associação entre o HPV e o câncer de colo uterino. O HPV está implicado em 99,7% dos casos de carcinoma cervical no mundo todo. Os HPV 16 e 18 são os dois tipos carcinogênicos mais importantes e responsáveis por cerca de 70% dos carcinomas cervicais e 50% das neoplasias intraepiteliais de grau III. A infecção do HPV foi reconhecida como a principal causa de câncer do colo uterino pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1992.

O câncer de colo do útero afeta predominantemente as células escamosas, que sofrem alterações como proliferação descontrolada, crescimento desordenado e progressivo do epitélio. O avanço da doença pode atingir outros tecidos, além do colo, em um período aproximado de 10 a 20 anos, dando à paciente um mau prognóstico (FERREIRA, 2009; INCA, 2012).

Este tipo de câncer ainda é um problema de saúde pública em países em desenvolvimento, como o Brasil, pois alcança altas taxas de prevalência e mortalidade em mulheres de extratos sociais e econômicos mais baixos, sendo o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama e do colorretal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil (CESAR et al., 2003).

Em relação aos fatores de risco que envolvem a doença, desde 1992, a Organização Mundial da Saúde (OMS) avalia, que a persistência da infecção pelo HPV em altas cargas virais representa o fator de risco predominante para o desenvolvimento da doença. Sabe-se também que a infecção pelo HPV é essencial, mas não suficiente para a evolução do câncer (COSER et al., 2012; MELO et al., 2009).

Além disso, outros fatores somados a infecção pelo vírus, são de suma importância para o processo de carcinogênese, os quais podem ser relacionados a idade, estado civil, vida sexual, promiscuidade sexual, paridade, nível socioeconômico, co-infecções por outros agentes, tabagismo, periodicidade da realização do exame de Papanicolau, ativação do sistema imune, ou composição genética do hospedeiro (AMORIM et al., 2006; MELO et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2008).

### **2.2.1 HPV e sua estrutura genômica**

Os HPV são vírus não envelopados, arredondados, com cerca de 55 nm de diâmetro e apresentam uma capa proteica, denominada capsídeo (Figura 1). O HPV pertence à família dos *Papillomaviridae* e é responsável por uma infecção transmitida sexualmente, conhecida como condiloma acuminado, verruga genital ou também crista de galo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

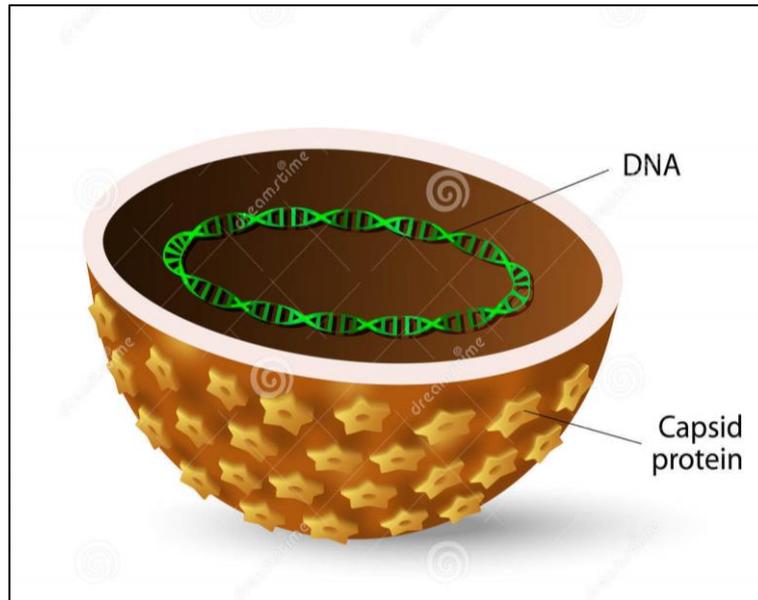


Figura 1. Esquema da morfologia interna dos Papilomavirus humanos. Observa-se a dupla fita de DNA circular em verde, como material genético, bem como o capsídeo aqui representado na cor marrom. (Fonte: <http://pt.dreamstime.com>).

O genoma do HPV é formado por duas fitas circulares de DNA, ligadas covalentemente e associadas a histonas codificadas por genes da célula hospedeira. O genoma consiste de oito a nove sequências de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORF) e, compreende três regiões conhecidas como região precoce (*early region* - E), região tardia (*late region* - L) e a região de controle (*Long Control Region* – LCR) (KENNETH, 1996; ZIELINSKI et al., 2003; MÜNGER et al., 2004).

O genoma viral é constituído por seis genes de expressão precoce (*Early* – E1, E2, E4, E5, E6, E7) e dois que se expressam tardiamente (*Late* – L1, L2), conforme observado na Figura 2. Os genes de expressão precoce codificam várias proteínas com capacidade de regular a transcrição e a replicação viral e de controlar o ciclo da célula hospedeira. Essa última propriedade seria responsável pela capacidade oncogênica desses vírus. Os genes L1 e L2 são altamente conservados e codificam as proteínas que formam o capsídeo (CAMARA et al., 2003).

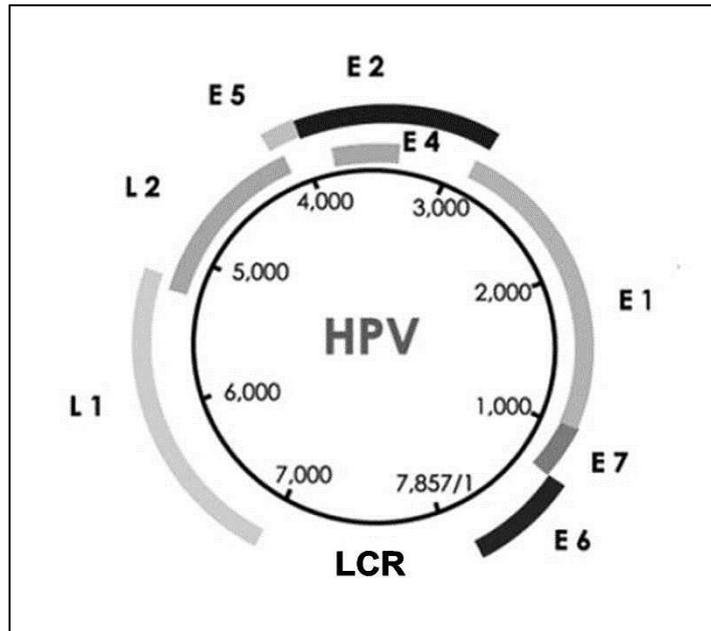


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Observa-se as fases de leitura organizadas em três regiões: a região precoce (composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), a região tardia (composta pelos genes L1 e L2) e a região controladora LCR. (Fonte: Adaptado de Muñoz, 2006).

Seu capsídeo contém 360 cópias da proteína L1 e 12 cópias da proteína L2 organizadas em 72 capsômeros, unidades morfológicas, dispostas com uma simetria icosaédrica (DOORBAR, 2005; SANTOS, 2006; CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006).

O risco oncogênico do vírus está diretamente relacionado ao comportamento de seu genoma no núcleo da célula hospedeira. HPV de baixo risco oncogênico tendem a manter o seu DNA íntegro, circular e epissomal, diferente dos HPV de alto risco oncogênico, cujas fitas de DNA circular se abrem, sofrem deleções e se integram ao genoma da célula hospedeira (FERRAZ et al., 2012).

### 2.2.2 Classificação dos HPV

Os tipos de HPV são classificados entre vírus de alto ou baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas à transformação neoplásica (FERRAZ et al., 2012).

Atualmente, são conhecidos mais de 100 tipos diferentes de HPV, sendo que 20 destes possuem tropismo para epitélio escamoso do trato genital inferior (colo, vulva, corpo do períneo, região perianal e anal), dos quais são considerados como

de baixo risco para o desenvolvimento de câncer os números 6, 11, 26, 40, 42, 53-55, 57, 59, 66 e 68 (relacionados principalmente a lesões benignas, tais como condiloma e também a Lesão Intraepitelial de Baixo Grau - LSIL. No entanto, os de médio e alto risco são os de números 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 59, que estão fortemente relacionados a Lesões Intraepiteliais de Alto Grau – HSIL e câncer (DERCHAIN et al., 2005).

No hospedeiro humano, os HPV provocam diversas consequências, dependendo do tipo viral. Os HPV denominados de baixo risco (6, 11, e outros) estão associados a crescimentos epiteliais benignos na pele e mucosas, enquanto os HPV de alto risco (principalmente 16, 18, e 45) associam-se a lesões neoplásicas, principalmente no colo uterino, onde DNA-HPV (inserções de genes do HPV no DNA do hospedeiro) pode ser detectado em até 95% das lesões, por métodos moleculares (FRANCO et al., 2001). Albring et al., (2006) observaram variações geográficas quanto aos tipos de HPV detectados nas amostras de tecidos de câncer cervical.

### **2.2.3 Ciclo replicativo dos HPV**

Apesar do ciclo replicativo do HPV começar com a infecção de uma célula basal, ele só se conclui quando as células infectadas chegam às camadas superiores do epitélio (HOFFMAN et al., 2006). Essas seriam as células alvo das partículas virais. Algumas pesquisas sugerem que a entrada do vírus na célula depende, primeiramente, da interação entre a proteína L1 do capsídeo viral com um receptor, credita-se que o receptor para a entrada do vírus seja a integrina- $\alpha 6$ , situada na camada basal. (LONGWORTH & LAMINIS, 2004).

Depois da ligação com os receptores de superfície celular, o HPV é lentamente internalizado por via endocítica. Embora os dados ainda não sejam conclusivos, alguns tipos de vírus parecem seguir um mecanismo de endocitose dependente de clatrina, enquanto que outros, o dependente de cavéola (HORVATH et al., 2010).

Ao que tudo indica, o capsídeo começaria a se desorganizar dentro do endossomo tardio, o que resultaria na liberação do complexo formado pela proteína L2 e o DNA. Esse complexo atravessaria o citoplasma, possivelmente usando a rede

de microtúbulos e entraria no núcleo. Há evidências de que a divisão celular seria um fator indispensável para o estabelecimento da infecção. Especula-se que a entrada do DNA viral no núcleo ocorreria durante a mitose, após a fragmentação do envoltório nuclear (SCHILLER et al., 2010).

Nos estágios iniciais, a replicação do DNA viral, que permanece sob sua forma circular epissomal (DNA circular, não incorporado ao genoma da célula), seria concomitante à do DNA da célula hospedeira. As proteínas sintetizadas a partir do DNA viral passariam a interferir na atividade de proteínas celulares que controlam o ciclo, a diferenciação celular e os mecanismos de apoptose (CAMARA et al., 2003).

Durante a mitose, o material genético viral seria também dividido entre as células-filhas, cujos destinos são diferentes: uma continua se dividindo na camada basal, servindo como reservatório do vírus, enquanto a outra migra para as camadas superiores, seguindo seu programa de diferenciação celular. Com a chegada da célula hospedeira à superfície do epitélio, a síntese das proteínas estruturais L1 e L2, de expressão tardia, seria iniciada, constituindo os capsídeos das novas partículas virais, que seriam montadas no interior do núcleo da célula hospedeira (BUCK et al., 2013).

### **2.3 Diagnóstico**

O diagnóstico do câncer do colo de útero em sua fase inicial possui desafios, uma vez que a doença se apresenta de forma assintomática (CASARIN e PICCOLI, 2011; BIM et al., 2010). Devido ao surgimento dos sintomas em fases mais tardias, o diagnóstico da doença na fase invasora, apesar de ser fácil, em geral é demorada, acarretando em baixas taxas de cura (CASARIN e PICCOLI, 2011). O câncer do colo do útero pode ser diagnosticado através de três exames clássicos, a citopatologia (teste de Papanicolau), colposcopia e exame histopatológico (DERCHAIN et al., 2005; STOFER et al., 2011).

O Ministério da Saúde preconiza a realização do exame de Papanicolau em mulheres com idade entre 25 e 64 anos, ou ao início da vida sexual, com periodicidade a cada três anos, após dois controles anuais consecutivos negativos, dando ao exame a característica de rastreamento (AMORIM et al., 2006; ANDRADE et al., 2014). Porém, ele permite identificar lesões precursoras em mulheres que

possuem a doença, com um baixo custo, o que propicia sua utilização em políticas públicas (SOUSA et al., 2011; STOFLEER et al., 2011).

Assim, o diagnóstico a partir da morfologia das infecções por HPV é o mais utilizado, tanto em esfregaços celulares, quanto em cortes histológicos. Todavia, com o surgimento e introdução de detecção dos genomas virais, tem se tornado mais evidente a baixa sensibilidade do método citológico. A identificação do DNA do HPV, só é possível através de técnicas de biologia molecular, podendo auxiliar no diagnóstico da infecção na ausência de alterações morfológicas (WOLSCHICK et al., 2007).

A detecção direta dos genomas do HPV e seus transcritos pode ser obtida com procedimentos que incluem imunistoquímica, imunofluorescência, hibridizações *Southern blot*, *dot blot* e *in situ*, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), captura híbrida (CH), sequenciamento de DNA, dentre outros (FAKHY et al., 2006). A sensibilidade e especificidade dos vários métodos de detecção do HPV variam amplamente. Desse grupo destacam-se as técnicas de PCR e CH por serem de alta sensibilidade, ou seja, podem detectar o vírus quando menos de uma cópia do DNA estiver presente (MILLER e JOHNSTONE, 2001).

#### **2.4 Biologia molecular e o HPV**

Graças às novas técnicas de diagnóstico da biologia molecular desenvolvidas nos últimos anos, tem-se contribuído significativamente para o estudo dos tipos de vírus (OLIVEIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004). De acordo com Rosenblantt e colaboradores (2005), estudos que avaliaram cerca de 1.000 mulheres com carcinoma, 99,7% dos casos apresentam contaminação pelo HPV.

Entre esses métodos de laboratório atualmente disponíveis para detecção do HPV, a PCR, é capaz de detectar HPV de alto e baixo risco oncogênico com *primers* de consenso ou *primers* tipo-específico. Muitos trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos através dessa metodologia para detecção do HPV e também para determinação dos subtipos virais encontrados ou os mais predominantes dentro de determinadas populações (CLIFFORD et al., 2006; CARVALHO et al., 2010).

Na pesquisa realizada em Campinas por Pitta et al., (2010), avaliaram a prevalência dos HPV 16, 18, 31 e 45 em amostras de raspado cervical de mulheres com alterações celulares por PCR com os *primers* consenso, o DNA-HPV foi detectado em 67,5% das 120 mulheres. O HPV 16 (40%) foi o tipo mais prevalente na maioria das lesões, infecções múltiplas ocorreram em 15%, concluíram então, que as infecções pelos HPV 16 e 18 nem sempre ocorrem de maneira solitária (infecção única), estando associadas a outros tipos de HPV em diversas ocasiões.

No estudo feito por Carvalho et al., (2010), compararam a eficácia de PCR tipo específico e sequenciamento, com foco na sua aplicação clínica, em Belo Horizonte. Foram testadas 260 amostras cervicais de pacientes HPV-positivos para os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35. Identificaram o genótipo em 36% dos casos com PCR tipo específico e 75% por sequenciamento. Apesar de ser mais eficaz para a genotipagem do vírus, o sequenciamento foi incapaz de identificar os tipos virais em múltiplas infecções.

As análises de Silva et al., (2006), para identificação dos tipos de papilomavírus humano em Pernambuco, utilizando o método de reação em cadeia de polimerase (PCR), demonstraram que o fator de risco principal para NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) foi a infecção por HPV oncogênico, com os tipos 16, 18, 33, 35, 51, 52, 58 e 83. Dentre as portadoras de lesões de alto grau, houve predomínio de HPV-16 ou variante 16. Nas pacientes com colo morfologicamente normal, também foram identificados os tipos oncogênicos 51, 58 e variante 51.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Contribuir para identificação dos subtipos virais 16 e 18 de HPV circulantes na população de Manaus – AM.

#### **3.2 Específicos**

- Identificar a presença do HPV na população de estudo;
- Avaliar os subtipos dos vírus circulantes (16 e 18);
- Avaliar a taxa de co-infecção viral;
- Comparar os dados de exames citológicos (preventivo e colposcopia), com resultados das análises de biologia molecular.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo e locais de execução**

O presente estudo é de caráter transversal e foi conduzido nos seguintes locais: Policlínica Codajás (PAM) e Policlínica João dos Santos Braga (PJSB) – Manaus/AM). As análises foram feitas nos laboratórios de Biologia Molecular da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

### **4.2 Critérios de Elegibilidade**

#### **4.2.1 Critérios de Inclusão**

Mulheres com diagnóstico citológico com alterações.

Mulheres que aceitaram participar da pesquisa.

#### **4.2.2 Critérios de Exclusão**

Mulheres que já fizeram conização ou histerectomia total.

Mulheres que não aceitaram participar da pesquisa.

### **4.2 Coleta e obtenção do material**

Foi feita a coleta (com consentimento e obedecendo aos parâmetros éticos) dos resultados citológicos (exames de preventivo e colposcopia) de todas as pacientes que aceitaram participar do projeto e que tinham alterações no exame preventivo de câncer do colo do útero, com indicação para o exame de colposcopia, além da coleta do material biológico dessas mulheres, usando uma escova endocervical ou *swab*, a mesma utilizada durante o exame. Esta, após a coleta não possui nenhum valor diagnóstico para a paciente, sendo sempre rejeitada como resíduo biológico. Foi mantida a estrita confidencialidade e sigilo das pacientes em todas as etapas do trabalho.

O material clínico coletado foi acondicionado em microtubo de 1,5 mL com as devidas identificações, contendo solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). As amostras foram mantidas em banho de gelo até serem

encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), sendo armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do DNA e execução dos procedimentos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

### 4.3 Extração do DNA

A extração de DNA procedeu a partir de aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de secreção vaginal. Foi utilizado o método de digestão enzimática com proteinase K, conforme o descrito por Doyle & Doyle (1987), adaptado.

Para avaliar a integridade do DNA extraído e a ausência de inibidores, foram realizadas PCR utilizando-se o conjunto de *primers* específicos para  $\beta$ -globina humana (GH20 <sup>5'</sup> -GAAGAGCCAAGGACAGGTAC- <sup>3'</sup> e PC04 <sup>5'</sup> -CAACTTCATCCACGTTACC- <sup>3'</sup>), de 268 pares de bases segundo protocolo descrito por Bell et al.13. O seguinte protocolo de amplificação foi utilizado:  $94^{\circ}\text{C}$  por quatro minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$ , por um minuto; anelamento a  $55^{\circ}\text{C}$ , por um minuto; e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , por um minuto; seguidos de uma extensão adicional a  $72^{\circ}\text{C}$ , por cinco minutos.

Após a extração e avaliação do DNA genômico a partir das amostras cervicais, foram realizados dois procedimentos de PCR: um para detecção do DNA viral e o outro para tipagem. As amostras positivas para HPV foram tipadas para os vírus tipos 16 e 18.

### 4.4 PCR para detecção do DNA viral

Na detecção do DNA de HPV pela PCR, foram utilizados os *primers* genéricos GP05 (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-<sup>3'</sup>) e GP06 (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-<sup>3'</sup>), descritos por Roda Husman et al., (1995), que amplificam uma região conservada de 170 pares de bases (pb) do gene L1 de HPV.

A reação de amplificação, foi com um volume total de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 1 x de tampão da PCR, 200  $\mu\text{M}$  de cada desoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,6 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5 pmol/ $\mu\text{L}$  de cada *primer* (GP05 e GP06), 0,5 U de Taq DNA

polimerase e ~50 ng de DNA. O seguinte protocolo de amplificação foi utilizado: 95° C por um minutos; seguido de 40 ciclos de 95° C, por um minuto; 57° C, por um minuto; e 72° C, por um minuto, seguidos de um ciclo adicional de 72° C por cinco minutos. Em cada corrida, controles positivos e negativos foram incluídos para evitar resultados falsos negativos ou falsos positivos, respectivamente.

#### 4.5 PCR para detecção do subtipo viral

A presença dos HPV 16 e 18 nas amostras positivas para os *primers* consenso GP05/06 foram determinadas em reações de amplificação (PCR) em separado, utilizando-se os *primers* específicos (SWAN, 1999), HPV 16 ( $5'$ -TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA- $3'$  /  $5'$ -GTAGAGATCAGTTGTCTCTGGTTGC- $3'$ ) e HPV 18 ( $5'$ -CAACCGAGCACGACAGGAACG- $3'$  /  $5'$ -TAGAAGGTCAACCGGAATTTTCAT- $3'$ ), que amplificam uma região conservada de 119 e 172 pares de bases, respectivamente.

Com isso, foram elaboradas misturas de reagentes de 20 µL contendo: 0,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 x de tampão da PCR, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, e 5 pmol/µL de cada *primer* e ~50 ng de DNA. As demais condições da reação foram iguais à da PCR para identificar a presença do HPV. Em cada reação, controles positivos e negativos foram incluídos para evitar resultados falsos negativos ou falsos positivos, respectivamente.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v) em solução, corado com 2 µL de gel red [1 µg/µL], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 700 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas alíquotas com volume final de 6 µL composto de: 3 µL do produto da PCR e 3 µL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%). Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. A presença e distinção dos tipos de HPV foram analisadas por comparação das bandas geradas no gel com os controles positivos de cada reação.

Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultra Violeta em transiluminador UVP™ e fotografados em sistema digital.

#### 4.6 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Sendo que nos resultados dos testes laboratoriais e clínicos ainda foi calculado o respectivo Intervalo de Confiança ao nível de 95% (IC95%). Na análise da idade, como foi aceita a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a média e o desvio-padrão (Dp) e aplicado o teste paramétrico *t-student*. Na comparação dos resultados do HPV 16 em relação ao HPV 18 ainda foi calculada a concordância observada com o respectivo IC95% (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise dos dados foi o programa Epi Info versão 7.2 para *windows* que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças Norte-Americano – CDC ([www.cdc.gov/epiinfo](http://www.cdc.gov/epiinfo)) e o nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5%.

## **5. ASPECTOS ÉTICOS**

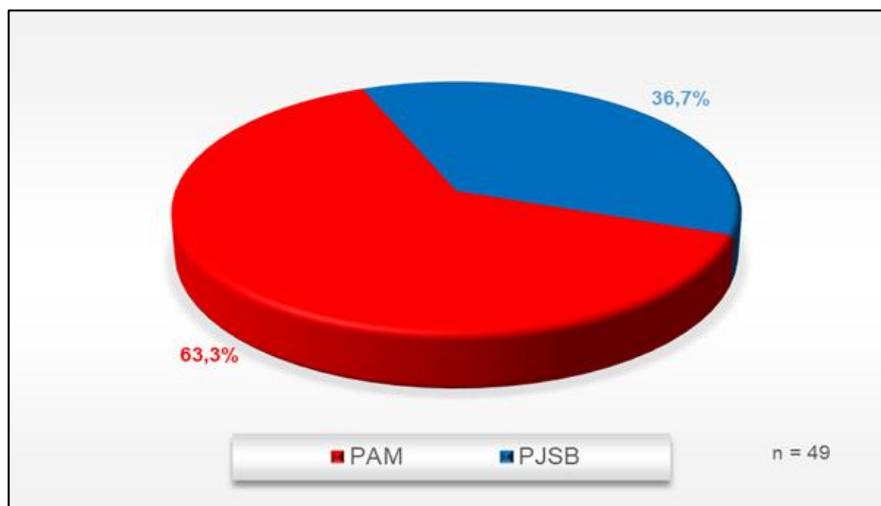
Para a realização do estudo foram respeitados os aspectos éticos e legais estabelecidos na Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/12, mantendo o compromisso ético e legal, bem como o anonimato e sigilo das informações. O projeto foi submetido aos comitês de ética em pesquisa das instituições envolvidas e obteve parecer favorável (anexo).

Todo o material utilizado no estudo não prevê a identificação e foram utilizados materiais que seriam descartados (sem valor diagnóstico), bem como, feita aplicação do TCLE (anexo), uma vez que trabalhamos com as amostras cervicais das mulheres para identificação de subtipo viral de HPV.

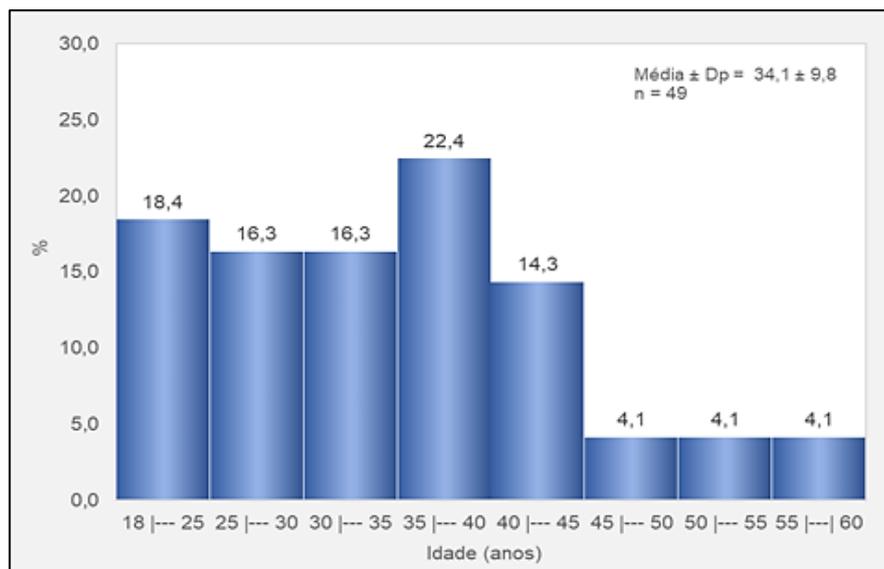
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Coleta

Foram coletadas 49 amostras de mulheres com alterações no exame Preventivo e/ou Colposcopia sugestiva de lesão de alto grau ou lesão de baixo grau, no período de março a novembro de 2016. Na unidade de saúde Policlínica Codajás, foram coletadas 31 (63,3%) amostras e Policlínica João dos Santos Braga, foram coletadas 18 (36,7%) amostras (Gráfico 1). A idade das 49 pacientes variou de 18 a 60 anos, com uma média de 34,1 (Gráfico 2).



**Gráfico 1.** Distribuição segundo as unidades de saúde que fizeram parte da pesquisa, Manaus - AM.



**Gráfico 2.** Distribuição segundo a idade das mulheres amostradas, Manaus - AM.

## 6.2 Detecção e Tipagem Viral

Todas as 49 amostras utilizadas no estudo obtiveram resultado positivo quando utilizados os *primers* da  $\beta$ -globina humana, podendo assim serem utilizadas com confiança para o diagnóstico molecular dos vírus. Utilizando-se o conjunto de *primers* genéricos GP05/06, identificou-se a presença de DNA viral em 100% das amostras analisadas (Figura 3).

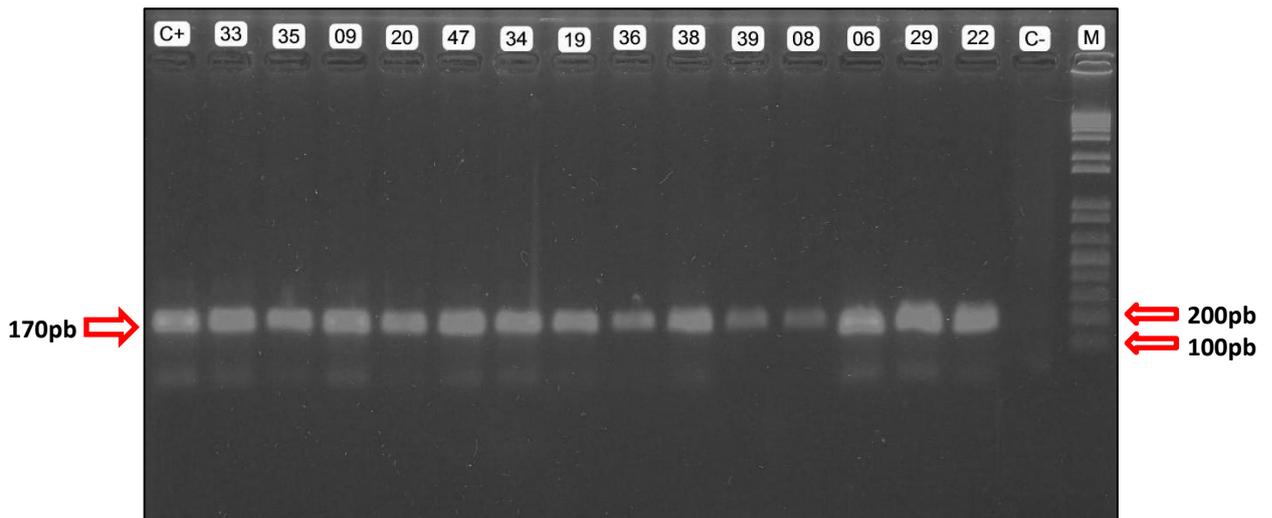


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% com produtos amplificados por PCR para os *primers* genéricos de HPV. C+: Controle positivo; 33-22: Amostras; C-: Controle negativo; M: Marcador molecular de 100pb, da *Invitrogen Life Technologies*).

Dessas 49 amostras positivas para HPV, os HPV 16 e 18 foram identificados em 29 casos (59,2%) (Figuras 4 e 5). Portanto, 20 (40,8%) das mulheres nas quais o DNA-HPV foi detectado pelo GP05/06 apresentam infecção por outros tipos de HPV não incluídos no estudo. O HPV 16 esteve presente em 29 casos (59,2%) das 49 amostras. O HPV 18 foi identificado em 4 casos (8,2%). Dos 29 casos de mulheres infectadas pelo HPV 16, houve co-infecção com o HPV 18 nos 4 (8,2%) casos, porém, não houve casos, no presente estudo, em que houvesse apenas infecções pelo HPV 18 (Tabela 1 e 2).

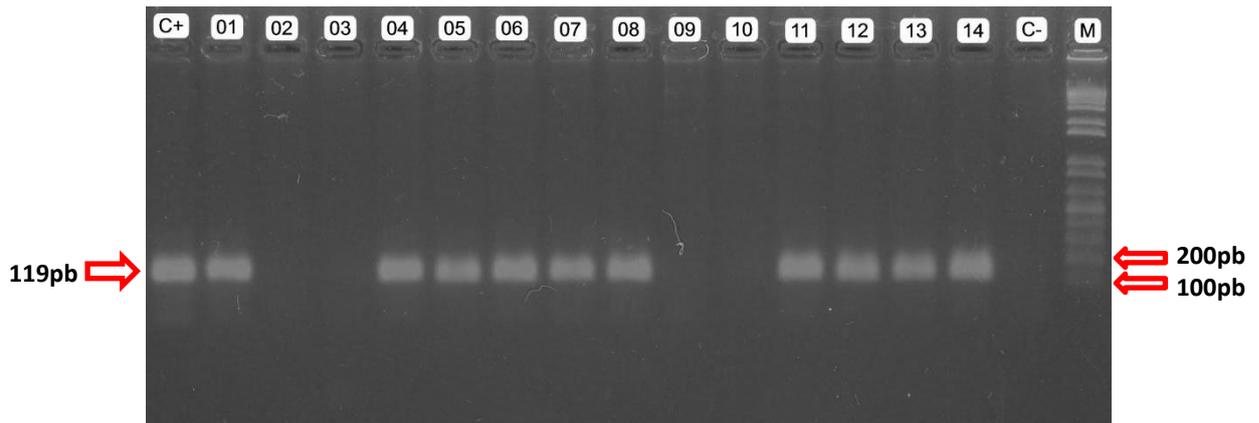


Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% com produtos amplificados por PCR para os *primers* específicos de HPV 16. C+: Controle positivo; 01-14: Amostras; C-: Controle negativo; M: Marcador molecular de 100pb, da *Invitrogen Life Technologies*.

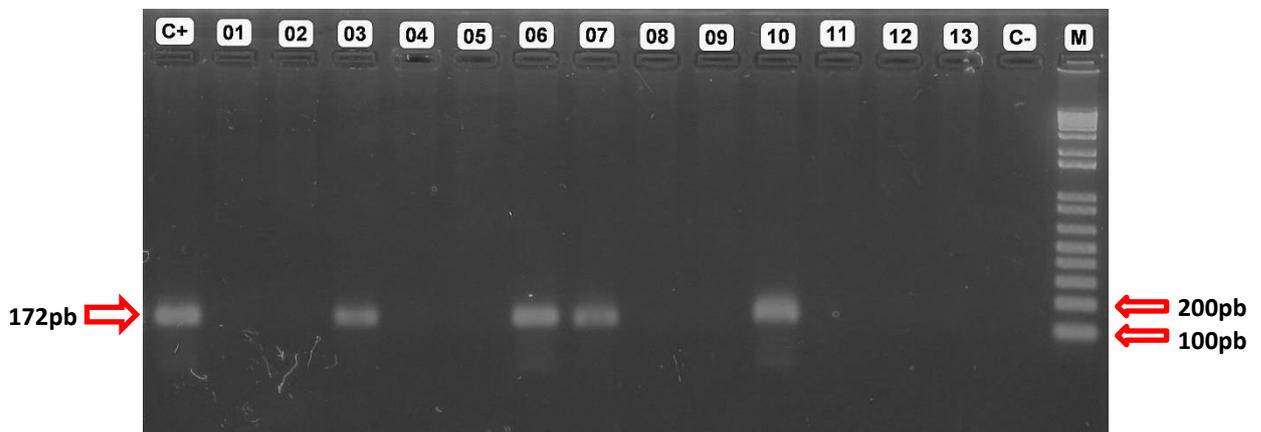


Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% com produtos amplificados por PCR para os *primers* específicos de HPV 18. C+: Controle positivo; 01-13: Amostras; C-: Controle negativo; M: Marcador molecular de 100pb, da *Invitrogen Life Technologies*.

**Tabela 1.** Distribuição segundo os resultados de diagnóstico molecular das mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus – AM.

Variáveis (n = 49)	$f_i$	%	iC95%
HPV 16	29	59,2	44,2 – 73,0
HPV 18	4	8,2	2,3 – 19,6

$f_i$  = frequência absoluta simples; IC95% = Intervalo ao nível de 95% de Confiança.

**Tabela 2.** Relação entre os resultados do HPV 16 e HPV 18 em mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus - AM.

HPV 16	HPV 18				Total
	Positivo		Negativo		
	$f_i$	%	$f_i$	%	
Positivo	4	8,2	25	51,0	29

Negativo	-	-	20	40,8	20
Total	4	8,2	45	91,8	49

$f_i$  = frequência absoluta simples; Concordância observada = 77,6%, com IC95%(63,4% - 88,2%).  
OBS.: percentuais em relação ao total da amostra

### 6.3 Comparação dos resultados dos exames citológicos com as análises de biologia molecular

Na tabela 3, apresenta-se a prevalência do HPV 16 em relação aos exames citológicos. Em relação aos resultados dos exames preventivos, cinco (17,2%) das seis mulheres com diagnóstico de ASC-H (células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau) e apenas uma (3,5%) das três mulheres com ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) apresentaram infecção pelo HPV 16. Seis (20,7%) das 22 pacientes com resultado de NIC I e expressivamente 17 (58,6%) das 18 mulheres com NIC II e III, apresentaram infecção pelo HPV 16.

Em relação ao exame de colposcopia, houve apenas uma paciente com diagnóstico de ASC-H e a mesma (3,4%) também apresentou infecção pelo HPV 16, já das sete mulheres com ASC-US, somente uma (3,4%) apresentou HPV 16. Nas 17 pacientes com NIC I, três (10,4%) apresentaram resultado positivo para o HPV 16 e todas as 24 (82,8%) mulheres com NIC II e III também apresentaram infecção pelo subtipo viral 16.

**Tabela 3.** Resultados das citologias em relação ao HPV 16 em mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus - AM.

Variáveis	HPV 16				Total
	Positivo (n = 29)		Negativo (n = 20)		
	$f_i$	%	$f_i$	%	
<b>Preventivo</b>					
ASC-H	5	17,2	1	5,0	6
ASC-US	1	3,5	2	10,0	3
NIC I	6	20,7	16	80,0	22
NIC II e III	17	58,6	1	5,0	18
<b>Colposcopia</b>					
ASC-H	1	3,4	-	-	1
ASC-US	1	3,4	6	30,0	7
NIC I	3	10,4	14	70,0	17

NIC II e III	24	82,8	-	-	24
--------------	----	------	---	---	----

$f_i$  = frequência absoluta simples.

Na tabela 4, apresentamos a prevalência do HPV 18 em relação aos exames citológicos. Em relação aos resultados dos exames preventivos, nenhuma das seis mulheres com diagnóstico de ASC-H (células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau), igualmente, nenhuma das três mulheres com ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e das 22 pacientes com resultado de NIC I apresentaram infecção pelo HPV 18. Apenas 4 (31,1%) das 18 mulheres com NIC II e III, apresentaram infecção pelo HPV 18.

Em relação ao exame de colposcopia, houve apenas uma (5,6%) paciente com diagnóstico de ASC-H e a mesma não apresentou infecção pelo HPV 18, assim como das sete mulheres com ASC-US, nenhuma apresentou HPV 18. Da mesma forma as 17 pacientes com NIC I não apresentaram resultado positivo para o HPV 18. Já das 24 mulheres com NIC II e III, 4 (44,4%) apresentaram infecção pelo subtipo viral 18.

**Tabela 4.** Resultados das citologias em relação ao HPV 18 em mulheres amostradas em duas unidades de referência, Manaus - AM.

Variáveis	HPV 18				Total
	Positivo (n = 4)		Negativo (n = 45)		
	$f_i$	%	$f_i$	%	
<b>Preventivo</b>					
ASC-H	-	-	6	13,3	6
ASC-US	-	-	3	6,7	3
NIC I	-	-	22	48,9	22
NIC II e III	4	100,0	14	31,1	18
<b>Colposcopia</b>					
ASC-H	-	-	1	2,2	1
ASC-US	-	-	7	15,6	7
NIC I	-	-	17	37,8	17
NIC II e III	4	100,0	20	44,4	24

$f_i$  = frequência absoluta simples.

## 7. DISCUSSÃO

Técnicas moleculares como a hibridização in situ, a captura híbrida e a reação em cadeia da polimerase (PCR), são comumente usadas para verificar a presença do material genético do Papilomavirus humano (DNA-HPV) em amostras de raspado cervical (QUINTERO et al., 2013; VIDAL et al., 2012; CARVALHO et al., 2010; HUBBARD et al., 2003).

No presente estudo, foram analisadas amostras de mulheres portadoras de algum tipo de alteração nos exames citológicos, encaminhadas ao serviço de atendimento nas unidades de saúde Policlínicas Codajás e João dos Santos Braga que, por sua vez, são consideradas modelos de sistema ambulatorial, por oferecer atendimento em diversas especialidades.

Em relação à idade, foi observado que a maioria das infecções por HPV ocorreu em mulheres entre 26-60 anos. Esses resultados mostram-se de acordo com os encontrados nos mais diversos estudos de detecção desses patógenos (TAMIM et al., 2002; NONNENMACHER et al., 2002; MOLANO et al., 2003; FINAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; FEDRIZZI et al., 2008; FERNANDES et al., 2010).

Neste estudo foi detectado DNA HPV positivo em todos (100%) os 49 casos analisados, dado esperado, já que todas as pacientes estavam com diagnóstico de alterações nos exames de Preventivo e/ou Colposcopia, além do fato de que as coletas ocorreram em locais de atendimento especializados em lesões, onde se concentraria um maior número desses casos.

Numerosos trabalhos realizados na última década, conduzidos por diferentes autores, analisaram amostras provenientes da cérvix uterina e com o auxílio de técnicas moleculares encontraram a prevalência do DNA-HPV positivo situado na faixa de 90% a 100% (BOSCH et al., 2007; MUNOZ et al., 2003; CHANG et al., 2005). Moraes (2008), em seu trabalho com amostras cervicais de 106 mulheres confirmou a presença de DNA-HPV em 99% das amostras. Oliveira et al., (2003) realizaram seus estudos em 43 mulheres e verificaram a presença de DNA-HPV em 95% (41/43) dos casos.

No presente trabalho, 59,2% (29/49) das mulheres apresentaram infecção pelo subtipo viral 16 do Papilomavirus humano e 8,2% (4/49) dos casos foi positivo para subtipo 18 de HPV. Dados também observados em diversos estudos revelam que o HPV-16 e HPV-18 são os mais prevalentes e de forma geral podem ser encontrados associados ou não a outros tipos (CARVALHO 2004; ANDERSSON et al., 2005; TROTTIER et al., 2006; MORAES, 2008). Carvalho (2004), em 1055 amostras de esfregaço cervical, observou a presença de infecções múltiplas em 35,5% (181) das pacientes. Em um estudo, realizado por Andersson et al., (2005), foram avaliadas 215 amostras, destas 45 casos eram de carcinoma escamoso invasor e os tipos detectados mais frequentes foram dos HPV-16 e HPV-18 com 76%.

Em sua revisão bibliográfica realizada por Rosa et al., (2009) utilizando a metodologia qualitativa que teve por esclarecer a associação entre HPV e o desenvolvimento do câncer do colo uterino, observou os tipos de HPV prevalentes na etiopatogenia em diversos países, sendo que no Brasil, o HPV-16 predomina nos cânceres cervicais em todas as regiões do Brasil com as seguintes frequências: região Sul (52%), Centro oeste (57%), Nordeste (59%), Norte (43,5%) e Sudeste (52%). Já o HPV-18 aparece em segundo lugar, exceto na região Centro Oeste, e nordeste, quando prevalecem o HPV-33 e o HPV-31, respectivamente. Neste trabalho, como foram analisados os dois subtipos, há semelhança com os anteriores, com uma alta frequência, o HPV-16 apresentou 59,2% casos positivos e o HPV-18 foi observado em 36,7% dos casos.

Moraes (2008), com amostras de células cervicais de 106 mulheres observou que 68 (64,7%) destas amostras apresentavam infecções por múltiplos HPV. Já Trottier et al., (2006) quando analisou a associação de infecção por múltiplos HPV em amostras de 2.462 mulheres brasileiras, averiguou que apenas 3,2% delas apresentavam infecção múltipla. No presente estudo, houve co-infecção entre os dois subtipos (16 e 18) em 18 (36,7%) amostras das mulheres estudadas, dado expressivo, que corrobora com alguns estudos que dizem que há uma relação entre os grupos dos HPV de alto e baixo potencial oncogênico com as alterações celulares diagnosticadas nos resultados citopatológicos (ZUR e DE VILLIERS, 1994; VAN REGENMORTEL et al., 2000; ALBRING et al., 2006).

Roberts et al., (2006) através da PCR, encontraram a prevalência de 32,3% de HPV-16, e 6 % de HPV-18 em 1848 biópsias cervicais. No diagnóstico de NIC II e NIC III o HPV-16 foi detectado em 47,5% e os HPV 18 e 26 em 5,9% dos casos. No presente estudo, tanto o HPV 16, como o HPV 18 foram mais detectados nas amostras que apresentaram alterações citológicas por NIC II e III, 42,85% (21/49). Em seu trabalho em 2009, Rosa e colaboradores, afirmaram que a persistência da infecção pelo HPV é que leva ao aparecimento das neoplasias intra-epiteliais cervicais e que a presença dos tipos oncongênicos como o HPV-16 e HPV-18 contribuem para esta persistência, visto que 70% dos cânceres são causados por estes dois tipos. Ainda enfatizou que isoladamente o HPV não pode levar ao surgimento do câncer uterino e que a presença de alguns co-fatores também tem influência na oncogênese cervical.

Houve no atual trabalho, apenas três casos em que o diagnóstico da citologia não indicava infecção por HPV de alto grau e eles foram positivos por PCR para o HPV 16. Desta forma, constatou-se que mesmo em mulheres com citologia positiva para outras alterações celulares, houve a presença do DNA-HPV pertencentes ao grupo de alto risco, confirmando a importância de se conhecer melhor os mecanismos envolvidos na oncogênese cervical, visando o diagnóstico precoce e a prevenção do câncer uterino tendo em vista à presença do HPV de alto potencial oncogênico nesses casos.

## 8. CONCLUSÃO

Foi possível realizar o levantamento por PCR da presença do material genético do Papilomavirus Humano (DNA-HPV positivo) em 100% (49/49) das amostras provenientes de raspado da cérvix uterina, utilizando os *primers* genéricos GP05/06.

Foram encontrados os subtipos de HPV 16 em 29 (59,2%) amostras por PCR em que se utilizaram os *primers* específicos desse subtipo e através do perfil eletroforético pertencente ao genótipo do HPV 16.

Foram encontrados os subtipos de HPV 18 em 4 (8,2%) amostras por PCR em que se utilizaram os *primers* específicos desse subtipo, bem como, 4 co-infecções com o subtipo de HPV 16, já que todos os casos em que foi observado a presença do HPV 18, igualmente, havia presença do HPV 16.

O método molecular denominado PCR mostrou ser eficiente em diagnosticar a presença de HPV nos casos do presente estudo. Os dados aqui apresentados têm implicações clínicas quando se considera a efetividade na prevenção das Neoplasias Cervicais das atuais vacinas profiláticas para HPV, dado que sua cobertura, em relação aos HPV de alto risco oncogênico, é restrita aos tipos 16 e 18.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALBRING, L.; BRENTANO, J.E; VARGAS, V.R.A. The cervical cancer, the Human Papillomavirus and its risk factors and the Guarani indigenous women: a review. *Rev. bras. anal. Clin.*;38:87-90, 2006.
- ALBUQUERQUE, D.; CORRÊA, D. & VILLELA, W.V. INFORME TÉCNICO INSTITUCIONAL / TECHNICAL INSTITUTIONAL REPORTS O controle do câncer do colo do útero: desafios para implementação de ações programáticas no Amazonas , Brasil Cervical cancer prevention : challenges facing the implementation of program ac. , 8(4), pp.491–497. 2008.
- ANDERSSON, S.; MINTS, M.; SALISTROM, J.; WILANDER, E. The relative distribution of oncogenic types of human papillomavirus in benign, premalignant and malignant cervical biopsies. A study with human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequence analysis. *Cancer Detect Prev*: 29(1), p.37-41, 2005.
- ANDRADE, M.S. et al. Fatores associados a não adesão ao Papanicolaou entre mulheres atendidas pela Estratégia Saúde da Família em Feira de Santana, Bahia, 2010. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 23, pp.111–120. 2014.
- AMORIM, V.M.S.L. et al. Fatores associados à não realização do exame de Papanicolaou: um estudo de base populacional no Município de Campinas, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22. 2006.
- BIM, C.R. et al. Diagnóstico precoce do câncer de mama e colo uterino em mulheres do município de Guarapuava, PR, Brasil. *Revista da Escola de Enfermagem*, 44, pp.940–946. 2010.
- BOSCH, F.X.; de SANJOSE, S: The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*, v.23, p.213-227, 2007.
- BUCK, C. B. et al. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, Seattle, v. 445, n. 1-2, p. 169-174, Oct. 2013.
- CAMARA et al. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. *Universitas Ciências da Saúde*, Brasília, v. 01, n. 01, p. 149-158, 2003.
- CARVALHO, M.O.O. Diagnóstico Molecular das Infecções Causadas Pelos papilomavírus humano no Colo Uterino. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) Universidade Federal Fluminense UFF. Niterói. P.80, 2004.
- CARVALHO, N.O.; CARTILLO, D.M.D; PERONE, C.; JANUÁRIO, J.N.; MELO, V.H.; BRASILEIRO-FILHO, G. Comparison of HPV genotyping by type-specific pc r and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 105(1): 73-78, 2010.
- CASARIN, M.R. & PICCOLI, J. da C.E. Education in health for prevention of uterine cervical cancer in women in Santo Ângelo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16, pp.3925–3932. 2011.

CASTRO, T.M.P.G. et al. Manifestações orais associadas ao papilomavirus humano (HPV) conceitos atuais. Rev. Bras. Otorrinolaringol, v. 70, n. 4, p. 546-50, jul./ago. 2004.

CAVALCANTI, S.M.B. e CARESTIATO F.N. Human Papillomavirus Infection: Update on Virological and Epidemiological Aspects and Diagnosis. J. bras. Doenças Sex. Transm: 18, p.73-79, 2006.

CESAR, J.A. et al. Fatores associados à não realização de exame citopatológico de colo uterino no extremo Sul do Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 19, pp.1365–1372. 2003.

CHANG CH; CHEN TH; HSU RC; CHOU PH; YANG JJ; HWANG GY. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. J. Clin. Virol. Jan. 32(1), p.33-7, 2005.

CDC. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR, Atlanta, v. 59, n. RR-12, 2010.

COSER, J. et al., 2012. Relação entre fatores de risco e lesão precursora do câncer do colo do útero em mulheres com e sem ectopia cervical. , 44(1).

De Mendonça, V. MORTALIDADE POR CÂNCER DE COLO DO ÚTERO NA CIDADE DO RECIFE: Tendência Temporal e Perfil Sócio-demográfico. 2006.

De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol. 1995;76 (Pt 4):1057-62.

DERCHAIN, S.F.M., LONGATTO Filho, A. e SYRJANEN, K.J. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 27. 2005.

DOORBAR J. The Papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology. S:32, p.7-15, 2005.

DOYLE, J. J; DOYLE, J. L.A rapid DNA isolation procedure for small amounts offresh leaf tissue.Phytochemical Bulletin, v. 19, p.11–15, 1987.

FAKHY, C.; D'SOUZA, E.; SUGAR, E.; WEBER, K.; GOSHU, E.; MINKOFF, H. et al. Relationship between prevalence oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and negative women. J Clin Microbiol. 44: 4479-85. 2006.

FEDRIZZI, E.N.; SCHULP, C.G.; MENEZES, M.E.; OCAMPOS, M. Infecção pelo Papillomavirus Humano em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. J Bras Doenças Sex Transm, v.20, n.2, p.73-79, 2008.

FERNANDES, J.V.; MEISSNER, R.V.; CARVALHO, M.G.F.; FERNANDES, T.A.A.M., AZEVEDO, P.R.M.; SOBRINHO, J.S.; PRADO, J.C.M.; VILLA, L.L. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical samples obtained from patients with

cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. BMC Research Notes, v.3, p.96, 2010.

FERREIRA, M. de L. da S.M. Motivos que influenciam a não-realização do exame de papanicolaou segundo a percepção de mulheres. Escola Anna Nery, 13, pp.378–384. 2009.

FERRAZ, L.C.; SANTOS, A.B.R.; DISCACCIATI, M.G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. J Health Sci Inst. 30:107-11. 2012.

FINAN, R.R.; MUSHARRAFIEH, U.; ALMAWI, W.Y. Detection of Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative women. Clinical Microbiology and Infection, v.12, n.9, p.927-930, 2006.

FRANCO, E.L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. CMAJ.164:1017-25. 2001.

HOFFMAN, R., HIRT, B., BECHTOLD, V., BEARD, P., RAJ, K. Different modes of human Papillomavirus DNA replication during maintenance. Journal of Virology, 80: 4431-4439, 2006.

HORVATH C. A. J. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. Virology Journal, London, v. 7, n. 11, p. 11-17, Jan. 2010.

HUBBARD, R.A. Human Papillomavirus Testing Methods. Arch Pathol Lab Med, 127: 940-945, 2003.

IARC, 2014. Fact Sheets by Population. Available at: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) [Accessed December 18, 2014].

INCA, 2012. INCA - Câncer - Tipo - Colo do Útero. Available at: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio).

INCA, 2015. Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Available at: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_nacional\\_controle\\_cancer\\_colo\\_uterio/conceito\\_magnitude](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/conceito_magnitude)

KENNETH, I. B. Papillomavirinae: their virus and their replication. In: Fundamental Virology. P.M Howley, D. M. Knipe & B.N Fields (eds). Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, p. 947- 978. 1996.

LONGWORTH M.S.; LAIMINS L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68: 362–372, 2004.

MEDEIROS, V.C.R.D. de et al., 2005. Câncer de Colo de Útero: Análise Epidemiológica e Citopatológica no Estado do Rio Grande do Norte. Revista

Brasileira de Análises Clínicas, 37(4), pp.227–231. Available at: [http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_37\\_04/rbac3704\\_07.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_37_04/rbac3704_07.pdf).

MELO, S.C.C.S. de et al., 2009. Alterações citopatológicas e fatores de risco para a ocorrência do câncer de colo uterino. *Revista Gaúcha de Enfermagem (Online)*, 30(4).

MILLER, C.S.; JOHNSTONE, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 91:622-35. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. Brasília: Ministério da Saúde; p.124. 2006.

MOLANO, M.; WEIDERPASS, E.; POSSO, H.; MORRÉ, S.A.; RONDEROS, M.; FRANCESCHI, S.; ARSLAN, A. MEIJER, C.J.L.M.; MUÑOZ, N.; van der BRULE, A.J.C., ET AL. Prevalence and determinants of Chlamydia trachomatis infections in women from Bogotá, Colombia. *Sex transm Infect*, v.79, p.474-478, 2003.

MORAES, D.R.P.L. Detecção e Genotipagem do papilomavírus humano (HPV) em Mulheres com Neoplasia intra-epitelial Cervical de Alto grau. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

MÜNGER, K., BALDWIN, A., EDWARDS, K.M, HAIA-KAWA, H., NGUYEN, C.L., OWENS, M., GRACE, M., HUH, K. Mechanisms of human Papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology*, 78: 11451-11460, 2004.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24 Suppl 3:S3/1-10. 2006.

NADAL, L. R. M.; NADAL, S. R. Indicações da vacina contra o Papilomavirus Humano. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 124-126, Mar. 2008.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L.L.; PROLLA, J.C.; BOZZETTI, M.C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saúde Publica*, v.36, n.1, p.95-100, 2002.

OLIVEIRA, L.H.S; RODRIGUES, E.V.M; LOPES, A.P.T.A.S. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene *São Paulo Med. J.*, São Paulo, v.121, n.2, p.67-71, mar. 2003.

OLIVEIRA, M.C. et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*, v. 69, n. 4, p. 553-559, jul./ago. 2003.

OLIVEIRA, M.L.; AMORIM, M.M.R.; SOUZA, A.S.R. ALBUQUERQUE, L.C.B.; COSTA, A.A.R. Infecção por Chlamydia trachomatis em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais. *Rev Assoc Med Bras*, v.54, n.6, p.506-12, 2008.

PITTA, D.R.; CAMPOS, E.A.; SARIAN, L.O.; ROVELLA, M.S.; DERCHAIN, S.F.M. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. *Rev Bras Ginecol Obstet.*; 32: 315-20. 2010.

QUINTERO, K; GIRALDO, G.A; LOPEZ, C; SANCHEZ, G.I; Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Bras J Otorrinolaringol* 2013; 79(3): 375-381.

ROBERTS, C.C.; TADESSE, A.S.; SANDS, J. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assay. *J. Clin. Virol.*, Amsterdam, v.36, n.4, p.277- 82, ago. 2006.

ROSA, M. I. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.25, n.5, maio, 2009.

ROSENBLANTT, C. et al. HPV na prática clínica. São Paulo: Atheneu, 2005.

SANTOS, C.M.B. Sequenciamento e Análise do Genoma do HPV-13 Isolado na Amazônia. Tese (Doutorado Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, f.172, 2006.

SASLOW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *A Cancer Journal for Clinicians*, Atlanta, v. 62, n. 3, p. 147-172, May./Jun. 2012.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*, New York, v. 118, n. 1 supplement, p. S12-S17, Jun. 2010.

SILVA, T.T.; GUIMARÃES, M.L.; BARBOSA, M.I.C.; PINHEIRO, M.F.G.; MAIA, A.F. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 28: 285-91. 2006.

SOUSA, M.S. De et al., 2011. Perfil dos exames citológicos do colo do útero realizados no Laboratório Central do Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2, pp.27–32. Available at: [http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-)

STOFLER, M. et al. Avaliação do desempenho da citologia e colposcopia comparados com a histopatologia no rastreamento e diagnóstico das lesões do colo uterino . *Performance evaluation of cytology and colposcopy compared with histopathology in screening and diagnosis of cerv.* , 40, pp.30–36. 2011.

SWAN, D.C.; TUCKER, R.A.; TORTOLERO-LUNA, G.; MITCHELL, M.F.; WIDEROFF, L.; UNGER, E.R. et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV Type. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1030-4.

TAMIM, H.; FINAN, R.R.; SHARIDA, H.E.; RASHID, M.; ALMAWI, W.Y. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*, v.43, p.277-281, 2002.

TROTTIER, H.; MAHMUD, S.; COSTA, M.C.; SOBRINHO, J.P.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T.E.; FERENCZY, A.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*: 15(7), p.1274-80, 2006.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRONGLE, C.R. & WICKNER, R.B. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego. Academic Press, p.1176, 2000.

VIDAL, F.C.B.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; FERRARO, C.T.L.; BRITO, L.M.O. Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavirus humano: revisão a literatura. *FEMINA*,40(5): 263-269, 2012.

VIEIRA, Sonia – *Bioestatística, Tópicos Avançados – Rio de Janeiro*. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

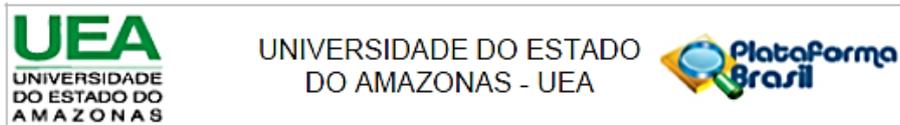
WOLSCHICK, N.M. et al., 2007. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença / Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis, treatment and disease prevention. *Revista brasileira de análises clínicas*, 39, pp.123–129. Available at: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=lnk&base=LILACS&exprSearch=477002&indexSearch=ID&lang=p>.

ZIELINSKI, G.D., SNIJDERS, P.J., ROZENDAAL, L DAALMEJER, N., RISSE, E.K.J., VOORHORST, F.J., JIWA, N.M., VAN DER LINDEN, H.C., DE SHIPPER, F.A., RUNSINK, A.P., MEIJER, C.J.L.M. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to highrisk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *The Journal of Pathology*, 201: 535-543, 2003.

ZUR HAUSEN, H. & DE VILLIERS, E.M. Human Papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* v.48, p.427- 47, 1994.

## 10. ANEXO

### 10.1 Parecer Favorável do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CÂNCER DE COLO DE ÚTERO: CARACTERIZAÇÃO E RASTREAMENTO

**Pesquisador:** Claudia Giuliano Bica

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 50985515.9.3001.5016

**Instituição Proponente:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.787.257

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de protocolo de pesquisa envolvendo seres humanos, na área da saúde, fora das áreas temáticas especiais. O mesmo foi aprovado pelo CEP - UEA, conforme Parecer número 1.745.964 emitido em 26 de Setembro de 2016.

Está sendo submetido como Emenda com a justificativa descrita a seguir: Solicitamos através desta emenda (carta de justificativa em anexo), referente ao projeto intitulado "Câncer do Colo do Útero: Caracterização e rastreamento", a inclusão da Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA) como instituição participante deste projeto, pois por engano o mesmo foi rejeitado pelo CEP da UFCSPA. A inclusão deste centro se faz necessária, pois este projeto está vinculado ao trabalho de mestrado da aluna do Programa de Pós-

Graduação em Patologia da UFCSPA. Att. Dra.Prof. Claudia Giuliano Bica

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivos conforme protocolo original - conforme Parecer número 1.745.964 emitido em 26 de Setembro de 2016.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

riscos e benefícios - conforme Parecer número 1.745.964 emitido em 26 de Setembro de 2016.

Continuação do Parecer: 1.787.257

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia - conforme Parecer número 1.745.964 emitido em 26 de Setembro de 2016.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatório foram apresentados - conforme Parecer número 1.745.964 emitido em 26 de Setembro de 2016.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos pela aprovação da emenda.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 22 de Outubro de 2016

---

Assinado por:  
Manoel Luiz Neto  
(Coordenador)

## 10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

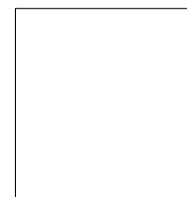
Convidamos a Sra. para participar da Pesquisa sobre a IDENTIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS VIRAIS DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) MAIS PREDOMINANTES EM MULHERES DA CIDADE DE MANAUS, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Cleiton Fantin Resende e Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Giuliano Bica, a qual pretende contribuir para identificação dos subtipos virais de HPV circulantes na população de estudo (Manaus). Sua participação é voluntária e se dará por meio de coleta de uma amostra endocervical e ectocervical. Não há riscos decorrentes de sua participação na pesquisa. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o conhecimento da incidência e caracterização dos subtipos de HPV. Se depois de consentir em sua participação a Sra. 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 Sra. 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 Sra. poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha - Manaus, pelo telefone (92) (inserir telefone convencional – fixo), ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UEA, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130. Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada sobre o que o pesquisador 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 pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador



Impressão do dedo polegar  
Caso não saiba assinar