



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL

NATHÁLIA CORRÊA CHAGAS DE SOUZA

IDENTIFICAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VARIANTES DE PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) NO ESTADO DE ALAGOAS E DESENVOLVIMENTO DE “KIT”
DE DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO EM AMOSTRA BIOLÓGICA

Maceió - AL

2016

NATHÁLIA CORRÊA CHAGAS DE SOUZA

IDENTIFICAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE VARIANTES DE PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) NO ESTADO DE ALAGOAS E DESENVOLVIMENTO DE “KIT”
DE DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO EM AMOSTRA BIOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, com ponto focal na Universidade Federal de Alagoas - UFAL, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto

Maceió - AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S729i Souza, Nathália Corrêa Chagas de.
Identificação da prevalência de variantes de papilomavírus humano (HPV)
no estado de Alagoas e desenvolvimento de “Kit” de detecção e tipificação em
amostra biológica / Nathália Corrêa Chagas de Souza. – 2016.
[145] f. : il. tabs. e grafs.

Orientador: Cícero Eduardo Ramalho Neto.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO.
Maceió, 2016.

Bibliografia: f.121-134.

Anexos: f.135-[145].

1. Câncer cervical. 2. Neoplasia - Diagnóstico. 3. Reação em cadeia da
polimerase (PCR). I. Título.

CDU: 616-072:616.97-53.6



renorbio
rede nordeste de biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Instituto de Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas
Campus A. C. Simões - Av. Lourival Melo Mota, s/n° - Cidade Universitária
57072-970, Maceió- AL - Telefone: (82) 3214-1144 - E-mail: renorbioufal@gmail.com

ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna NATHÁLIA CORRÊA CHAGAS DE SOUZA. Aos trinta e um (31) dias do mês de março do ano de dois mil e dezesseis, às 15:06h, reuniu-se na sala de Reuniões do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia/IQB da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, a banca de Defesa de Tese composta pelo Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto - (Orientador/Presidente – UFAL); Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta (UNCISAL); Prof. Dr. Josealdo Tonholo (UFAL); Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu Galdino (UFAL) e Prof. Dr. João Gomes Costa (EMBRAPA), perante a qual Nathália Corrêa Chagas de Souza, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, defendeu, para preenchimento do requisito de doutora, sua Tese intitulada “*Identificação da Prevalência de Variantes de Papilomavirus Humano (HPV) no Estado de Alagoas e Desenvolvimento de Kit de Detecção e Tipificação em Amostra Biológica*”. A defesa da referida tese ocorreu, das 16:20h às 18:00, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda aprovada por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito máximo.

Eu, Cícero Eduardo Ramalho Neto, que presidi a Banca de Tese, assino a presente ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Maceió - AL, 31 de março 2016.

Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto [assinatura]
Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta [assinatura]
Prof. Dr. Josealdo Tonholo [assinatura]
Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu Galdino Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Prof. Dr. João Gomes Costa [assinatura]

ADENDO:

O mundo é construído por mulheres fortes que, apesar da luta constante, do pré-conceito e da desvalorização, não abaixam a cabeça e renascem a cada dia com mais garra e resiliência.

Este trabalho é dedicado a todas estas mulheres, em especial às pacientes que participaram deste estudo e à maior guerreira que conheci, a mulher que me gerou.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi fruto de uma construção científica, emocional e cultural. Sua elaboração foi um desafio vencido devido à doação de muitos, inclusive pregressos a mim, uma vez que esta é a continuação de uma extensa linha de pesquisa do Laboratório GEMPRO. Além de profissionais e alunos de diferentes áreas, todos envolvidos na construção do saber e desejosos de um futuro melhor.

Agradeço primeiramente às pacientes que concordaram em participar desta pesquisa, me permitiram espiar um pouco de seu mundo e, assim, construir mais um pedaço do meu.

Ao Prof. Dr. Eduardo Ramalho, mentor intelectual deste trabalho, pelo convite para participar de sua equipe e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao amigo Prof. Dr. Velber Xavier pelos ensinamentos, atenção e cumplicidade.

Aos meus companheiros de jornada, que compartilharam vitórias e dissabores, e fizeram os dias de trabalho serem prazerosos, Mayara, Nildo, Pablo e Yamina, além de contribuírem de tantas formas para minha formação tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus irmãos por me incentivarem mesmo a distância, através de ameaças cheias de afeto.

Aos amigos que me apoiaram e me ouviram mesmo, por vezes, não compreendendo a real dimensão que este trabalho tem pra mim. Nunca ouvi tantas vezes a expressão “vai dar tudo certo”.

Ao Prof. Dr. José Humberto pela disposição em abrir as portas para que as coletas fossem feitas e pela alegria com que sempre nos recebeu.

A toda a equipe médica e aos alunos e alunas envolvidos nestes anos de pesquisa, em especial a Raissa Jardim pela dedicação e carinho.

Ao Prof Euzébio pela compreensão e presteza.

Ao Programa de Pós Graduação RENORBIO.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E por último por ser muito importante: a Marius Belluci, meu companheiro de vida, pelas noites em claro, pelo carinho honesto, por não me deixar desistir, e por acreditar mais em mim do que eu mesma, em muitos momentos.

O VELHO E A JABUTICABEIRA

Um jovem se aproximou de um senhor idoso e perguntou:

- Que planta é esta que o senhor está cuidando?
- É uma jabuticabeira - respondeu o velho.
- E ela demora quanto tempo para dar frutos?
- Ah, pelo menos uns quinze anos - informou o homem.
- E o senhor espera viver tanto tempo assim? - indagou, irônico, o rapaz.
- Não, não creio que viva tudo isso, pois já estou no fim da minha jornada- disse o ancião.
- Então, que vantagem você leva com isso, meu velho?

E o velhinho respondeu calmamente:

- Nenhuma, exceto a vantagem de saber que ninguém colheria jabuticabas se todos pensassem como você...

Que seria de nós, se não plantássemos hoje a semente que servirá de alimento amanhã?

Não podemos estar voltados somente para nós mesmos. Temos que pensar, também, nas gerações que estão por vir. Temos que dar nossa colaboração. Muitas medidas tomadas hoje repercutirão no futuro. Tomara que você sinta orgulho de poder fazer, de alguma forma, parte dele e ter dado a sua contribuição.

Autor desconhecido

RESUMO

Mundialmente ocorrem mais de 500 mil novos casos de câncer cervical uterino (CCU) por ano, sendo a terceira neoplasia mais comum entre mulheres, e a segunda causa de morte na faixa etária entre 14 e 44 anos. Há uma conhecida associação entre CCU e a presença do papilomavírus humano (HPV). No Brasil, uma em cada quatro mulheres sexualmente ativas está infectada pelo HPV (no Nordeste, uma em três), resultando em 19 casos de câncer uterino por 100 mil habitantes. Evidências laboratoriais revelam que a detecção e tipagem do DNA viral para prevenção do câncer causado por HPV, pode estar associado à redução da mortalidade entre pacientes infectados. Sabe-se que há discrepância entre os resultados citomorfológicos e histológicos na detecção de lesões por HPV nos exames rotineiros, por isso o teste molecular assume grande importância. O presente trabalho teve como objetivos definir a prevalência do HPV no Estado de Alagoas e o perfil sociodemográfico das mulheres infectadas, com o intuito de propor um “kit” de baixo custo para detecção dos HPV de alto risco mais prevalentes. Amostras cervicais de mulheres residentes no Estado foram analisadas; as pacientes foram submetidas a um questionário, para a coleta de informações referentes aos principais cofatores comumente associados ao desenvolvimento de lesões cervicais. A extração do DNA genômico foi realizada conforme metodologia do kit *Illustra* (Asmersham Biosciences), enquanto a concentração de DNA em cada amostra foi estimada através de espectrofotometria. A comprovação da presença viral foi feita por PCR, através da amplificação de uma região de 450pb do DNA viral (gene L1), com iniciadores degenerados MY09 e MY11. Como controle positivo utilizou-se a co-amplificação do gene humano β -globina (268 pb) com os iniciadores GH20 e PC04, além de um controle negativo, DNA humano sem HPV. Os produtos de PCR foram sequenciados automaticamente. Para identificar o tipo viral, as sequências foram alinhadas e comparadas a outras utilizando-se a ferramenta *Blastn* no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foi possível estabelecer que das 757 amostras analisadas 123 (16,3%) foram positivas para HPV. Houve prevalência dos tipos de HPV de alto risco (58,5%), sendo o HPV16 observado em 12,3% das amostras positivas. O HPV de maior frequência foi o HPV 6 (21,5%), considerado de baixo risco. Sobre os cofatores, pôde-se observar diferença significativa em relação à idade das pacientes; número de parceiros; número de filhos; e ser gestante no momento da coleta de dados. O kit de detecção proposto possibilitará a determinação dos principais tipos oncogênicos presentes no Estado por PCR multiplex. Os iniciadores utilizados responderam bem às análises estabelecidas. Novas etapas se fazem necessárias para implementação do “kit”.

Palavras-chave: Câncer cervical; neoplasia; PCR; diagnóstico.

ABSTRACT

There are more than 500,000 new cases of uterine cervical cancer (CCU) worldwide, which is the second most common cancer among women, and the second leading cause of death among women aged between 14 and 44 years. There is a known relationship between the CCU and the presence of human papillomavirus (HPV). In Brazil, one in four sexually active women are infected with HPV (in the Northeast, one in three), resulting in 19 cases of uterine cancer per 100,000 inhabitants. Laboratory evidence shows that, at present, preventive molecular test HPV-linked cancer through the detection and typing of viral DNA, may be associated with reduced mortality between men and women infected with HPV. It is known that there is a discrepancy between the histological and cytomorphological detection of HPV lesions in routine tests, so the molecular test is very important in this scenario. Thus, this study aimed to determine the HPV prevalence and the socio-demographic profile of infected women in State of Alagoas, hence propose a low cost kit for the more prevalent high risk HPV detection. Cervical samples from women living in the state of Alagoas - Brazil were assessed; these patients were submitted to a questionnaire and signed the free and informed consent form, through which we could collect information relating to the main co-factors commonly associated with the development of cervical lesions. Genomic DNA extraction was performed according to *Illustra kit* methodology (Asmersham Biosciences), while the DNA concentration in each sample was estimated using spectrophotometry. Viral evidence was obtained by PCR amplification of a 450bp viral DNA region (L1 gene) using the degenerate primers MY09 and MY11. We used the co-amplification of human β - globin gene (268 bp) as positive control, through GH20 and PC04 primers, and human DNA without HPV as negative control. The expected size PCR products were sequenced automatically. To identify the virus type, the sequences were aligned and compared with others using the Blastn tool in NCBI (National Center for Biotechnology Information). From the 757 samples analyzed, 123 (16.3%) were positive for HPV. There was a prevalence of high-risk HPV types (58,5%), with 12,3% HPV 16 positive samples. Individually, the most frequent type was the HPV 6 (21.5%), considered low risk. Regarding the co-factors, it was observed significant difference in the age of the patients; number of partners; number of children; and being pregnant at the time of data collection. The proposed kit will enable detection of the main oncogenic types present in the state by multiplex PCR analysis. The primers used responded well to the established analysis. Further steps are being taken towards the implementation of a commercial test kit.

Keywords: cervical cancer; neoplasia; PCR; diagnostic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Partículas de papilomavírus (PV) e proteínas da superfície capsídica	19
Figura 2. Esquema representativo do genoma do papilomavírus humano (PV) e da produção das proteínas virais, ao longo da replicação dos PV, em função dos genes expressos	22
Figura 3. Relação evolutiva entre os cinco gêneros dos Papilomavírus humanos (HPV)	23
Figura 4. Quadros de condiloma acuminado, em diferentes regiões anatômicas de homens e mulheres. a. Verrugas penianas; b. Lesões condilomatosa extensa que envolve na vagina, vulva, região periuretral e ânus. c. Múltiplas verrugas no dorso da mão; d. condiloma na região oral	28
Figura 5. Visualização da região genital feminina normal e acometida do câncer cervical uterino (CCU).	29
Figura 6. Prevalência mundial, por região, e os tipos mais frequentes de HPV entre mulheres com citologia normal: meta-análise incluindo mais de 1 milhão de mulheres nos 5 continentes	33
Figura 7. Variação dos tipos de HPV entre as regiões do Brasil	36
Figura 8. Variações das Taxas de incidência de câncer cervical uterino pelo mundo*, 2012	37
Figura 9. Taxas brutas de incidência de câncer estimadas para 2016 por sexo, segundo Estado e capital (Alagoas/ Maceió)	39
Figura 10. Fluxograma da utilização do kit de detecção e/ou tipificação de HPV de alto risco oncogênico desenvolvido.	62
Figura 11. DNA total de alto peso molecular (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10); amostra com falha na extração (4) e amostra com DNA degradado (5) em gel de agarose 1,2%. M: marcador molecular.	69
Figura 12. Detecção do DNA do HPV de amostras clínicas selecionadas e amplificadas com os iniciadores MY09 E MY11, banda de 450 pb (amostras ímpares) em gel de agarose (1,2%). DNA da globina humana, banda de 268 pb (amostras pares), controles. M: marcador molecular.	70
Figura 13. Detecção do DNA do HSV de amostras clínicas selecionadas e amplificadas com os primers 1A e 1B (HSV1) / 2A e 2B (HSV2) banda de 270 pb em gel de agarose (2,5 %). M: marcador molecular.	106
Figura 14. Visualização de fragmentos amplificados do papilomavírus humano, utilizando-se eletroforese em gel de agarose (2%). a) HPV 16, formação de bandas de 476 pb na quinta e sexta canaleta. b) HPV 58, formação de bandas de 968 pb na quinta canaleta.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tipos de HPV considerados de alto-risco oncogênico	24
Tabela 2- Tipos de Papilomavírus em lesões anogenitais	27
Tabela 3- Estimativas do número de casos novos de câncer, entre as mulheres do Brasil e da região do Nordeste brasileiro, 2016	38
Tabela 4- Iniciadores utilizados para detecção do gene da globina e do HPV	57
Tabela 5- Conjunto de iniciadores utilizados para detecção do HSV	60
Tabela 6- Conjunto de iniciadores utilizados para tipagem do HPV	63
Tabela 7- Distribuição das pacientes avaliadas por Centros de saúde e por número de amostras positivas para HPV	71
Tabela 8- Prevalência dos HPV de alto e baixo risco oncogênico detectados em Maceió, Alagoas.	107
Tabela 9- Avaliação dos exames cito-histopatológicos e colposcópicos de pacientes atendidas no Hospital Universitário e no Pam Salgadinho de março de 2012 a dezembro de 2014.	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Proporção da IDADE das pacientes avaliadas	75
Gráfico 2- Proporção da IDADE das pacientes POSITIVAS PARA HPV	76
Gráfico 3- Proporção da MENARCA das pacientes por faixa etária	78
Gráfico 4- Proporção da idade de MENARCA das pacientes POSITIVAS PARA HPV	78
Gráfico 5- Proporção do I.A.S. das pacientes avaliadas	81
Gráfico 6- Proporção do I.A.S. das pacientes POSITIVAS PARA HPV	81
Gráfico 7- Proporção do Nº de PARCEIROS das pacientes avaliadas	84
Gráfico 8- Proporção do Nº de PARCEIROS das pacientes POSITIVAS PARA HPV	84
Gráfico 9- Proporção do Nº de FILHOS das pacientes avaliadas	86
Gráfico 10- Proporção do Nº de FILHOS das pacientes POSITIVAS PARA HPV	86
Gráfico 11- Proporção de ABORTOS das pacientes avaliadas	88
Gráfico 12- Proporção do Nº de ABORTOS das pacientes POSITIVAS PARA HPV	88
Gráfico 13- Proporção das GESTANTES dentre as pacientes avaliadas	90
Gráfico 14- Proporção das pacientes HPV POSITIVAS GESTANDO	91
Gráfico 15- Relação das Gestantes analisadas para a presença do HPV	91
Gráfico 16- Proporção da IDADE da PRIMEIRA GESTAÇÃO das pacientes avaliadas	93
Gráfico 17- IDADE DA PRIMEIRA GESTAÇÃO das pacientes POSITIVAS PARA HPV	93
Gráfico 18- Proporção das pacientes praticantes de SEXO ORAL	95
Gráfico 19- Proporção das pacientes POSITIVAS PARA HPV que praticam SEXO ORAL	95
Gráfico 20- Proporção das pacientes praticantes de SEXO ANAL	96

Gráfico 21- Proporção das pacientes POSITIVAS PARA HPV que praticam SEXO ANAL	97
Gráfico 22- Proporção das pacientes que utilizavam CONTRACEPTIVO ORAL	98
Gráfico 23- Proporção das pacientes POSITIVAS para HPV que utilizam CONTRACEPTIVO ORAL	99
Gráfico 24- Proporção de pacientes que apresentavam DST	100
Gráfico 25- Proporção das pacientes POSITIVAS PARA HPV que alegaram apresentar DST	101
Gráfico 26- Proporção de TABAGISTAS dentre as pacientes avaliadas	102
Gráfico 27- Proporção das pacientes TABAGISTAS POSITIVAS PARA HPV	103
Gráfico 28- Proporção de ETILISTAS dentre as pacientes avaliadas	104
Gráfico 29- Proporção das pacientes ETILISTAS POSITIVAS PARA HPV	104
Gráfico 30- Determinação do risco de oncogenicidade do HPV em relação à MENARCA das pacientes	111
Gráfico 31- Determinação do risco de oncogenicidade do HPV em relação ao Nº de PARCEIROS	112
Gráfico 32- Determinação do risco de oncogenicidade do HPV em função da GESTAÇÃO	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å –	Ångstrom
AIDS –	(“Acquired Immune Deficiency Syndrome”) - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASO4 –	Adjuvante (MPL + LPS + hidróxido de alumínio)
bp –	pares de base
°C –	Graus Celsius
CCI –	carcinoma cervical invasivo
CCU –	câncer do colo do útero
DNA –	ácido desoxirribonucléico
DNTP –	Trifosfato desoxirribonucleotídeo
DST –	doenças sexualmente transmissíveis
E –	(“early region”) - região codificadora precoce
EDTA –	ácido etilenodiamino tetra-acético
et al. –	e colaboradores
Fase S –	fase de síntese celular
g/mL –	Gramas por mililitro
GEMPRO	Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica
HCl –	Ácido clorídrico
HIV –	Vírus da imunodeficiência humana
HPV –	(“Human papillomavirus”) - papilomavírus humano
HSPG –	(“heparan sulfate proteoglycans”) - proteoglicanas heparan sulfato
HSV –	Vírus Herpes simplex
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
IARC –	Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer
I.A.S. –	Início das atividades sexuais
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
JEC –	células da junção escamo – colunar

Kb –	Quilobase
KCl –	Cloreto de potássio
kDa –	Quilodalton
L1 –	(“Late protein”) - proteína tardia 1
L2 –	(“Late protein”) - proteína tardia 2
LCR –	(“Long Control Region”) - região não codificadora,
LEEP –	(“loop electrosurgical excision procedure”) – procedimento de excisão eletrocirúrgico
LPS –	lipopolissacarídeo
LSIL –	(“high -grade” SIL) - lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LSIL –	(“low-grade” SIL) - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MgCl ₂ –	Cloreto de magnésio
mM –	Milimolar
MPL –	monofosforil lipídio A
NCBI –	“National Center for Biotechnology Information”
ng –	nanograma
NIC –	neoplasia intraepitelial cervical
OCE –	Orifício Cervical Externo
ORF –	(“Open Reading Frames”) - regiões abertas de leitura
pb –	Pares de bases
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
pH –	potencial hidrogeniônico
<i>Primer</i> –	Oligonucleotídeo iniciador
PRR –	papilomatose respiratória recorrente
PV –	Papilomavírus
S –	(Svedberg) - Coeficiente de Sedimentação
TCLE –	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1/Th2-	Respostas imunológicas do linfócito T auxiliar
Tris –	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

- TZ – (“transformation zone”) - zona de transformação cervical
- VLP – (“Virus-like particles”) - partículas semelhantes aos vírus
- μL – Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Aspectos gerais dos papilomavírus	19
a)	Componentes da estrutura viral e propriedades físicas	19
b)	Genoma, expressão proteica e replicação do HPV	20
2.2	Taxonomia e aspectos filogenéticos dos HPV	22
2.3	Formas de Transmissão de HPV	25
2.4	Manifestações clínicas das infecções por HPV	26
2.4.1	Câncer cervical e lesões neoplásicas	29
2.5	A influência dos cofatores	31
2.5.1	Coinfecções: o papel do Herpesvírus na infecção por HPV	32
2.6	Epidemiologia	32
2.6.1	Epidemiologia do Câncer cervical	36
2.7	Diagnóstico	39
2.8	Métodos de detecção de HPV	41
2.8.1	Métodos não moleculares	41
2.8.1.1	Citologia	42
2.8.1.2	Colposcopia	43
2.8.1.3	Histologia	44
2.8.2	Métodos Moleculares	45
2.8.2.1	Captura Híbrida® versão II; HC2 (Qiagen, Gaithersburg, Germany)	46
2.8.2.2	Métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	46
2.8.2.2.1	PCR convencional	47
2.8.2.2.2	PCR específica	47
2.8.2.2.3	PCR multiplex	47
2.8.2.2.4	PCR “real time”	47
2.8.2.3	Genotipagem do HPV	48
2.8.2.3.1	Métodos Comerciais de Genotipagem do HPV	48
2.9	Tratamento	49
3	JUSTIFICATIVA	51
4	OBJETIVOS	52
4.1	Objetivo geral	52

4.2	Objetivos específicos	52
5	MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.1	Seleção das participantes	53
5.1.1	Critérios de Inclusão	53
5.1.2	Critérios de Exclusão	53
5.2	Identificação das pacientes e armazenamento de dados	53
5.3	Aspectos Éticos	55
5.4	Coleta das Amostras	55
5.5	Variáveis	55
5.5.1	Ensaio	55
5.6	Procedimentos do Estudo	55
5.6.1	Controle de qualidade da avaliação de prevalência e do kit desenvolvido	55
5.7	Isolamento do DNA	56
5.8	Amplificação do gene da globina e detecção do DNA Viral - HPV	57
5.9	Amplificação do DNA Viral – Herpes vírus Humano (HSV)	59
5.10	Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese	60
5.10.1	Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese	60
5.11	Visualização e Armazenamento das sequências amplificadas	61
5.12	Análise e edição das sequências	61
5.12.1	Análise Filogenética	61
5.13	Análise Estatística	61
5.14	Desenvolvimento do “kit” de detecção de HPV	62
5.14.1	Determinação dos iniciadores específicos	63
5.14.2	Genotipagem por PCR tipo-específica	64
5.14.2.1	Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese	66
5.14.2.2	Visualização e Armazenamento das sequências amplificadas	66
5.14.3	Genotipagem por PCR multiplex	67
5.14.3.1	Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese	68
5.14.3.2	Visualização e Armazenamento das sequências amplificadas	68
5.15	Estrutura e composição do “kit” proposto	68
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	Obtenção das amostras para estudo	69

6.2	Análise qualitativa do material genético extraído	69
6.3	Determinação das amostras positivas por PCR convencional	70
6.4	Características sociodemográficas e comportamentais	73
6.4.1	Idade em anos completos	73
6.4.2	Menarca	76
6.4.3	Início das atividades sexuais (I.A.S.)	79
6.4.4	Número de parceiros	82
6.4.5	Número de filhos	85
6.4.6	Número de abortos	87
6.4.7	Gestante no momento da coleta	89
6.4.8	Idade da primeira gestação	92
6.4.9	Prática do sexo oral	94
6.4.10	Prática do sexo anal	96
6.4.11	Declara utilizar contraceptivo oral	97
6.4.12	Declara possuir DST	99
6.4.13	Tabagismo	101
6.4.14	Etilismo	103
6.5	Amplificação do DNA Viral – Herpes vírus Humano (HSV)	105
6.6	Determinação dos tipos de HPV por sequenciamento automático	106
6.6.1	A relação dos cofatores com os tipos virais detectados	110
6.7	Desenvolvimento e padronização do kit de detecção	113
6.7.1	Análise dos diferentes tipos virais por PCR convencional	113
6.7.2	Análise das amostras por PCR multiplex	114
6.7.3	Análises cito-colposcópicas-histopatológicas	115
6.8	Análises cito-colposcópicas-histopatológicas	115
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
8	CONCLUSÕES	120
	REFERÊNCIAS	121
	ANEXOS	135

1 INTRODUÇÃO

Entre os mais de 200 tipos de papilomavírus humano (HPV), 110 já foram caracterizados e 50 deles estão associados com carcinoma cervical invasivo (CCI) e neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) (IARC 2007). Mundialmente ocorrem mais de 500 mil novos casos de câncer cervical; este tipo de neoplasia é a terceira mais comum entre as mulheres, além de ser a segunda causa de morte entre aquelas na faixa etária dos 14 aos 44 anos (BRUNI et al. 2010; WHO, 2012).

No Brasil, este tipo de câncer também é a segunda causa mais comum de morte entre mulheres em regiões como o Centro-oeste e o Nordeste (INCA 2015), e a terceira quando todo o país é considerado. Com relação à presença dos HPV entre as habitantes, uma em cada quatro mulheres sexualmente ativa está infectada pelo HPV (no Nordeste, uma em três), resultando em estimativas de mais de 15 casos de câncer uterino por 100 mil habitantes para 2016 (INCA 2015). Esses são considerados valores altos quando comparados aos números levantados em países desenvolvidos, nos quais foram estimados menos de 8 casos por 100 mil habitantes para 2012, segundo a Organização mundial de saúde (WHO, 2012). Existem no Brasil em torno de 34 milhões de homens e mulheres contaminados por HPV (IARC, 2007). Destes, estima-se que 10 milhões de brasileiras possuam o vírus latente e são então portadoras, mesmo sem desenvolver a doença.

A relação entre variantes de HPV de alto risco, câncer cervical e suas lesões precursoras ainda não é bem estabelecida em relação a todos os tipos do vírus. Desta forma, o estudo de variantes moleculares é de grande importância, uma vez que dados epidemiológicos e moleculares sugerem que variantes de alguns tipos de HPV são biologicamente distintos e podem apresentar risco patogênico diferenciado (DE BOER et al. 2005; BERNARD et al. 2006; SICHERO et al. 2007). Porém, poucos estudos longitudinais estão disponíveis (HERRERO et al., 2005) e os resultados existentes do impacto da infecção pelo HPV de alto risco na etiologia na lesão intraepitelial cervical não são claros (BOSCH et al. 2003; CASTLE et al. 2009). Além disso, a análise da diversidade de variantes de HPV é

de grande importância, pois permitirá a criação de bancos de dados de sequências, que serão empregados em estudos evolucionários e epidemiológicos, para o desenvolvimento de diagnósticos precisos e para um programa eficiente de vacinação (NTOVA et al., 2012).

É importante salientar ainda que, alguns fatores parecem estar relacionados com a capacidade de infecção do vírus, e, posteriormente, com o desenvolvimento do câncer cervical. Entre esses fatores, também conhecidos como cofatores, podem ser citados o tabagismo, o uso de contraceptivo oral, paridade, início da atividade sexual, número de parceiros e, finalmente, outras doenças sexualmente transmissíveis (GIORDANO et al. 2007). Estudos, que envolvam estratégias para um diagnóstico preciso do vírus e sua possível associação com os aludidos cofatores, podem contribuir decisivamente para reduzir as taxas de mortalidade por câncer do colo uterino.

Evidências laboratoriais revelam que, no presente momento, o teste molecular preventivo do câncer causado por HPV através da detecção e tipagem do DNA viral, pode estar associado à redução da mortalidade entre mulheres e homens infectados pelo vírus do papiloma humano. Sabe-se que existe uma discrepância entre os resultados citomorfológicos e histológicos na detecção de lesões por HPV nos exames rotineiros (RONCO et al., 2010), por isso o teste molecular assume grande importância, principalmente em países em desenvolvimento. Estas análises permitirão às instituições desenvolverem estratégias que objetivem um melhor entendimento dos mecanismos de infecção, da persistência de alguns tipos virais, do papel da carga viral e da função do papilomavírus na progressão de lesões precursoras do câncer do colo do útero. Desta forma, um “kit” de detecção molecular, direcionado para variantes prevalentes no Estado de Alagoas, permitirá, com sua rapidez e sensibilidade, o estabelecimento de um protocolo de ação que minimizará as intervenções e custos de tratamento. Do ponto de vista epidemiológico, a implementação do “kit” possibilitará um estabelecimento mais preciso dos genótipos presentes no Estado, além de contribuir positivamente para a qualidade de vida das pacientes, que poderão ser acompanhadas e orientadas adequadamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

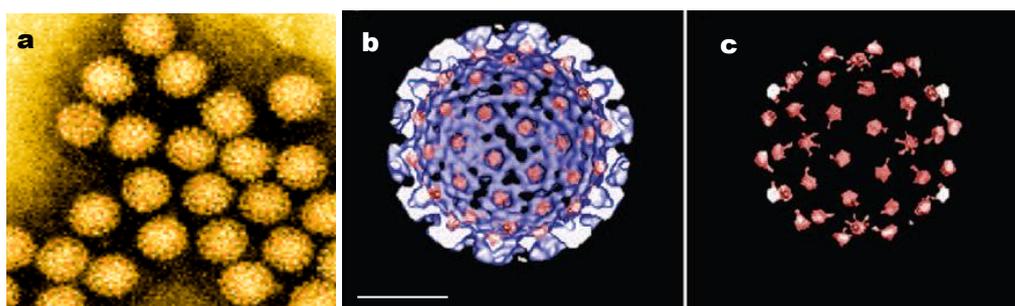
2.1 Aspectos gerais dos papilomavírus

Os papilomavírus (PV) são vírus espécie específicos que foram inicialmente observados em mamíferos, mas têm sido encontrados em epitélios de diferentes grupos animais – incluindo aves e répteis – e provavelmente infectam todos os amniotas (BRAVO; DE SANJOSE; GOTTSCHLING, 2010); no caso da espécie humana o vírus é chamado de papilomavírus humano (“Human papillomavirus” – HPV) (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; TERENCE, 2006; BRAVO; DE SANJOSE; GOTTSCHLING; 2010).

(a) Componentes da estrutura viral e propriedades físicas:

As partículas virais são pequenas, apresentam de 50 a 60 nm de diâmetro, não são envelopadas e se caracterizam por possuírem capsídeos de simetria icosaédrica, formados por duas proteínas estruturais. Desta forma, cada partícula viral contém 72 capsômeros pentaméricos, formados pela proteína tardia 1 (“Late” – L1), que possui 55 kDa e corresponde a 80% das proteínas virais totais. A distribuição da L1 forma uma estrutura intra e interpentamérica de interações dissulfídicas, responsável tanto pela estabilidade do capsídeo, quanto pela adsorção à superfície celular (SAPP, 1995; LONGWORTH; LAIMINS, 2004; ZUR HAUSEN, 2009). Para que ocorra a montagem do capsídeo os pentâmeros associam-se à proteína tardia 2 (L2), que possui 75 kDa, um variado número de cópias e está localizada na parte mais interna do capsídeo, ocluindo o centro de cada capsômero, Fig. 1 (BUCK; CHENG; THOMPSON, 2008; CONWAY; MEYERS, 2009).

Figura 1. Partículas de papilomavírus (PV) e proteínas da superfície capsídica. a. Fotomicrografia eletrônica de partículas virais. b. Reconstrução computadorizada do capsídeo, L1 + L2 (L1 em azul e L2 em vermelho). c. Densidade específica da proteína L2. Barra = 200 Å. Fontes: Adaptado de (STANNARD, 1995; BUCK et al., 2008).



O *virion* (partícula viral completa) tem uma densidade de 1,34 g/mL em cloreto de cério e um coeficiente de sedimentação de 300 S (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; TERENCE, 2006; IARC, 2007).

(b) Genoma, expressão proteica e replicação do HPV

Na porção central dos PVs está localizado o genoma, que consiste de uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) de duplo filamento, circular, com peso molecular de aproximadamente 8 mil pares de base (bp), que é associado às histonas celulares, e formam assim estruturas semelhantes às cromatinas (LARSEN; STORGAARD; FEY, 1987; DOOBAR, 2005 apud CONWAY; MEYERS, 2009). Esse genoma apresenta 8 regiões abertas de leitura (“Open Reading Frames” - ORF) que podem ser divididas em três partes funcionais: a região codificadora precoce (“early region” – E), que codifica proteínas necessárias à replicação viral (E1 – E7), bem como à sua regulação, atua no controle da transcrição e na transformação da célula hospedeira, e que representa cerca de 4kb do genoma viral; uma região L, que codifica as proteínas estruturais (L1 – L2), necessárias à montagem dos vírions, com aproximadamente 3kb; e uma região não codificadora, LCR (“Long Control Region”), que contém elementos *cis*, essenciais para a regulação da replicação e transcrição do DNA viral, com 1kb Fig. 2 (MUNGER et al. 2004; BERNARD; CALLEJA-MACIAS; TERENCE, 2006). Partículas semelhantes aos vírus (“Virus-like particles” - VLPs) podem ser produzidas pela expressão do gene *L1* apenas ou por associação com o gene *L2*, tanto em mamíferos quanto em outros grupos.

As proteínas virais E são transcritas a partir do promotor precoce, enquanto as proteínas L são transcritas a partir do promotor tardio. As proteínas E1 e E2 do HPV atuam como fatores de reconhecimento da origem de replicação; a proteína E2 também é o principal regulador da transcrição gênica do HPV. E4 está envolvida nos estágios tardios do ciclo de replicação viral e E5 atua tanto nos estágios iniciais quanto tardios. As proteínas E6 e E7 marcam reguladores negativos do ciclo celular, primariamente p105Rb e p53, respectivamente. Durante a replicação viral, tais proteínas facilitam a manutenção da estabilidade dos episomas virais e estimulam a diferenciação das células para que elas entrem

novamente na fase S – fase de síntese celular (FEHRMANN; LAIMINS, 2003; IARC, 2007).

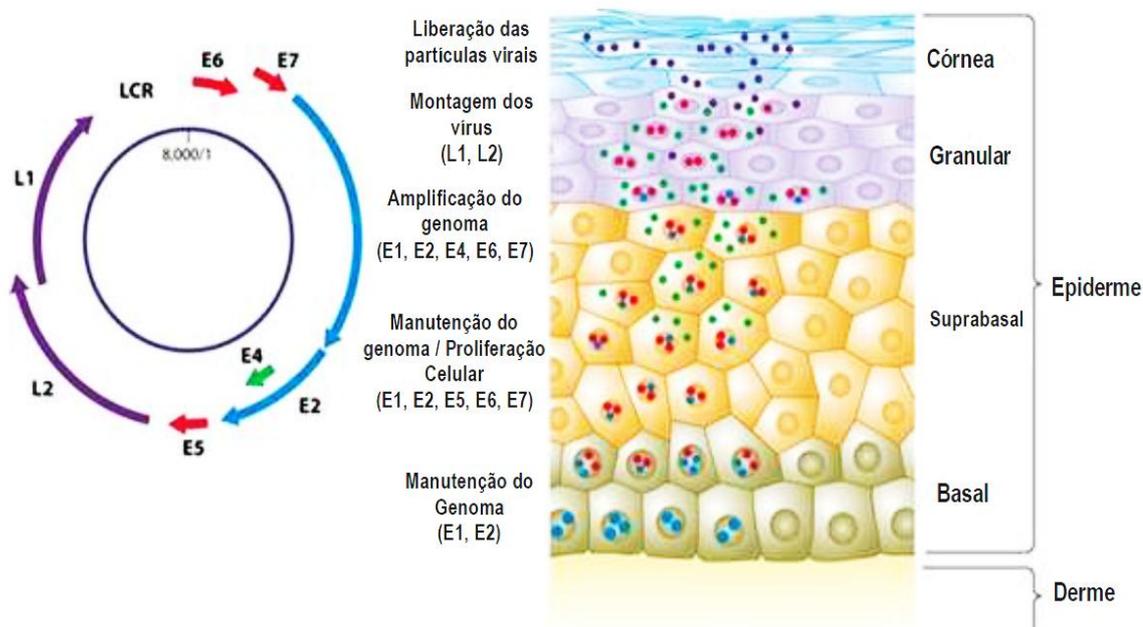
O ciclo replicativo do HPV é dependente da diferenciação celular do hospedeiro infectado e da replicação proteica (GALLOWAY; LAIMINS, 2015), que tem lugar a partir da atuação da maquinaria celular.

Mirkovic et al. (2015) propõem ainda que determinados grupos celulares apresentam maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasia cervical, como as células da junção escamo - colunar (JEC). Os vários apêndices presentes no epitélio, regiões consideradas especializadas como: folículos capilares, glândulas sebáceas, sudoríparas, entre outras, representam sítios mais vulneráveis à infecção por HPV.

De forma geral, as partículas virais são replicadas no interior do núcleo das células da camada basal da epiderme, composta de múltiplas camadas de queratinócitos, pelos quais os HPV demonstram tropismo. Nesta região, os vírus mantêm-se na forma estável, episomal, e em múltiplas cópias, garantindo uma infecção persistente (CONWAY; MEYERS, 2009). Nas camadas mais superficiais acontece uma replicação vegetativa e a consequente produção dos *virions*, Fig. 2. O genoma viral pode ser encontrado no interior das células de lesões benignas sob a forma de episomas. Já nas células indiferenciadas o DNA do HPV é encontrado inserido ao genoma celular.

A infecção pelo HPV ocorre, primordialmente, através de microfissuras na pele, que possibilitam o contato das partículas virais com a camada basal do epitélio. O receptor associado a este evento ainda é desconhecido, sabe-se, porém, que a ligação inicial dos *virions* à superfície celular é mediada por proteoglicanas heparan sulfato (“heparan sulfated proteoglycans” - HSPGs) (SHAFTI-KERAMAT, 2003). Uma vez que as células da camada basal consistem de células tronco e células em diferenciação há uma reserva interessante para as regiões suprabasais, pois estes tipos celulares estão em constante divisão. Assim, a infecção por HPV nesta região leva a uma cascata de expressão gênica, que resulta na produção de, aproximadamente, 20 a 100 cópias de DNA viral extracromossomal, que podem permanecer nesta forma episomal por meses, anos, ou serem integrados ao genoma da célula hospedeira (LONGWORTH; LAIMINS, 2004).

Figura 2. Esquema representativo do genoma do papilomavírus humano (PV) e da produção das proteínas virais, ao longo da replicação dos PV, em função dos genes expressos. Fonte: modificado de NEJDL, L et al., 2014.

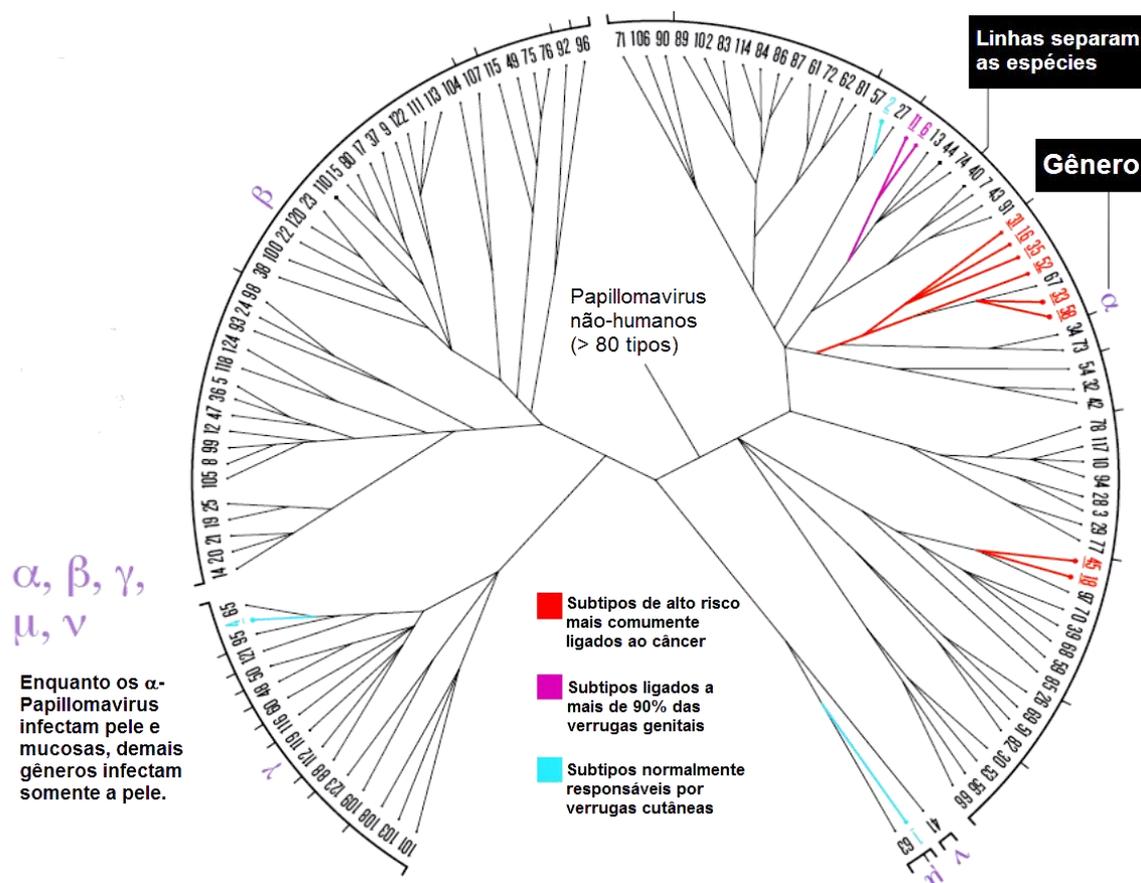


2.2 Taxonomia e aspectos filogenéticos dos HPV

Os PV pertencem à família Papillomaviridae, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (“International Committee on Taxonomy of Viruses” – ICTV), e são classificados em 37 gêneros, que diferem entre si em mais de 40% na sequência nucleotídica do gene *L1*, região altamente conservada (BERNARD, 2010). Uma classificação ideal integraria a filogenia, a organização genômica, biologia e patogenicidade; porém, especialmente pela não descrição de vários tipos de PV, esta implementação não é possível atualmente (BERNARD, 2010).

Os HPV são englobados nos gêneros *Alpha-papilomavirus*, *Beta-papilomavirus*, *Nu-papilomavirus*, *Mu-papilomavirus* e *Gamma-papilomavirus*, Fig. 3.

Figura 3. Relação evolutiva entre os cinco gêneros dos Papilomavírus humanos (HPV).



Adaptado de: Nature, 2012.

O termo espécie é reservado a associações filogenéticas de múltiplos HPV dentro de um gênero que demonstrem em torno de 60% a 70% de identidade gênica e que sejam considerados biologicamente similares (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; TERENCE, 2006). Outras classificações importantes para a comunidade científica, em relação aos PV, são: tipo, subtipo e variante; considera-se um tipo de PV quando há diferença gênica de, pelo menos, 10% da sequência *L1* (BERNARD, 2010). Os subtipos são determinados quando há variações no genoma do gene entre 2% e 10% e os variantes de PV diferem em menos de 2% na sequência de nucleotídeos de *L1* (IARC 2007). O estudo de variantes moleculares assume atualmente grande importância, uma vez que dados epidemiológicos e moleculares sugerem que variantes de alguns tipos de HPV são biologicamente distintos e podem conferir risco patogênico diferenciado (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; TERENCE, 2006).

Apesar da organização dos HPV, em sequências baseadas em relações filogenéticas, possibilitarem associações de patogenia, preciosas para os estudos dos mesmos, é necessário que se observe que alguns tipos, ainda que próximos na escala evolutiva, estão associados a patologias distintas. Por exemplo, tanto o HPV6 quanto o 11 estão contidos no gênero *Alphapapillomavirus*, e, apesar de ambos causarem lesões de aparência similar, o HPV6 apresenta um tropismo maior pela área genital, enquanto o HPV11 é mais proeminente na região oral (WONG, 2010; FERRARO, 2011; EGAWA, 2015). Estudos ainda buscam compreender tropismos como estes, mas, de qualquer forma, eles indicam diferenças nas funções e expressões dos genes virais e na regulação epitelial de diferentes regiões anatômicas.

Mais de 300 PV já foram identificados e sequenciados, incluindo mais de 200 HPV, entre tipos, subtipos e variantes; pode-se, assim, considerar as infecções por PV como uma das viroses mais bem-sucedidas entre os vertebrados (VAN DOORSLAER, 2013; EGAWA, 2015). Dentre os tipos de HPV, a Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC), classificou 25 tipos como carcinogênicos, uma vez que eles estão associados epidemiologicamente ao desenvolvimento de câncer anogenital, TAB. 1 (IARC, 2007). Todos os genótipos de HPV relacionados ao câncer cervical pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus*. As espécies *Human Papillomavirus 16* e *Human Papillomavirus 18* foram os primeiros tipos de HPV isolados diretamente de biópsias de câncer cervical (DE VILLIERS, 2004).

Tabela 1. Tipos de HPV considerados de alto-risco oncogênico

Espécies de <i>Alpha</i> HPV	Tipos classificados como carcinogênicos
5	51, 26, 69, 82
6	56, 66, 30, 53
7	18, 45, 39, 59, 68, 70, 85, 97
9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
11	34, 73

Fonte: (IARC, 2012; BRAVO & FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Estudos que relacionam os HPV com lesões cutâneas passaram a ser divulgados entre 1974 e 1976, quando pesquisadores começaram a analisar o

possível papel do HPV no desenvolvimento do câncer cervical. Em 1976, foram publicados trabalhos que apontavam a existência de coilócitos¹ em esfregaços cervicais, que indicavam a ocorrência de infecção por HPV (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Foi sugerida também a diferenciação entre lesões benignas – que não evoluiriam para o câncer cervical – e lesões malignas, o que foi corroborado pela identificação de HPV típicos em cada situação. Assim, estabeleceu-se uma divisão dos HPV em dois grupos denominados de alto e baixo risco de desenvolvimento de neoplasias malignas, nos quais se observa a separação dos diferentes tipos virais.

2.3 Formas de Transmissão de HPV

A transmissão se dá por contato direto do epitélio ou mucosas com a pele infectada (STRAUSS, 2003). Desta forma, a principal via é o contato sexual, com ou sem penetração vaginal ou anal, uma vez que o contato com genitais ou mucosas infectados é suficiente para o contágio. Neste contexto, o HPV pode ser considerado uma das principais causas de lesões anogenitais e, possivelmente, a principal doença de transmissão sexual (BURCHELL, 2006). Estudos com crianças e indivíduos que nunca tiveram relações sexuais demonstram que outras vias de transmissão são possíveis e podem levar ao desenvolvimento de diferentes quadros clínicos (CASTELLSAGUE, 2009; SMITH, 2010; HOULIHAN, 2014). A transmissão vertical pode levar ao desenvolvimento, por exemplo, de lesões anogenitais e/ou de papilomatose respiratória (SILVERBERG, 2003). A manipulação durante o parto, ou na primeira infância, também pode estar envolvida nesta transmissão (CASTELLSAGUE, 2009) bem como a autoinoculação. Outras formas, como fômites ou objetos contaminados, apesar de possíveis não são muito abordados (BURCHELL, 2006; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

A carga viral parece ser um fator importante neste processo; a transmissão por via sexual pode ocorrer após uma única relação sexual com um parceiro

¹ O Coilócito é uma célula epitelial escamosa de tipo intermediário ou metaplásica, aumentada de volume, contendo 1, 2 ou vários núcleos hiper cromáticos, discretamente irregulares. A cromatina é densa e pode ser granulosa e grosseira. Pode ser considerado um indicador da infecção HPV, pois em 90% dos condilomas com alteração coilocitótica foram detectados antígenos HPV, com técnicas imunoenzimáticas (SILVEIRA, 2005).

infectado (SOPER, 2006), o que é evidenciado pela alta taxa de mulheres jovens contaminadas.

2.4 Manifestações clínicas das infecções por HPV

As manifestações clínicas das infecções por PV dependem de múltiplos fatores que incluem o genótipo viral, a resposta imune do hospedeiro, o grupo celular com o qual o vírus entra em contato, além de fatores ambientais relacionados aos hábitos do indivíduo, que podem ser definidos como cofatores para o desenvolvimento da infecção. Mas, de uma forma geral, a maior parte das infecções por HPV são subclínicas e tendem a não causar lesões, é, inclusive, comum os HPV serem encontrados em pele e mucosas de indivíduos saudáveis, o que pode estar relacionado à evolução do vírus ao longo de milhares de anos, que teria ocorrido de forma paralela à da espécie humana (ANTONSSON; HANSSON, 2002; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

A partir da contaminação pelo HPV, pode-se observar o estabelecimento de infecções transitórias ou persistentes (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). Os HPV podem persistir durante um período mais longo, permitindo o desenvolvimento de alterações das células, que podem evoluir para as doenças relacionadas ao vírus (HPV, 2012).

No caso das transitórias, presentes em 90% dos casos, observa-se a formação de lesões benignas, auto-limitantes, que podem ocorrer em diferentes regiões do corpo como dedos, plantas dos pés ou mãos, lábios ou olhos, e que, após um período variável, não é mais possível detectar o DNA viral; são normalmente associadas a grupos de HPV classificados como de baixo risco oncogênico (GRCE; MRAVAK-STIPETIC, 2014). As alterações nas células podem causar condiloma acuminado (conhecido como verruga genital ou crista de galo), vários tipos de cânceres, como os de colo do útero, vagina, vulva, ânus, pênis e orofaringe, bem como a papilomatose respiratória recorrente (PRR). Embora seja extremamente rara, a PRR geralmente se desenvolve em crianças nascidas de mães infectadas pelos tipos de HPV que causam a maioria das verrugas genitais como nos casos descritos por Araújo Neto et al. (2002), e podem levar o paciente a necessitar de diversos procedimentos cirúrgicos, diminuindo sua qualidade de

vida ou levando-o ao óbito. Os HPV comumente associados a estes quadros são classificados como de baixo risco (BOSCH, 2002), como observado na TAB. 2.

Tabela 2. Tipos de Papilomavírus em lesões anogenitais

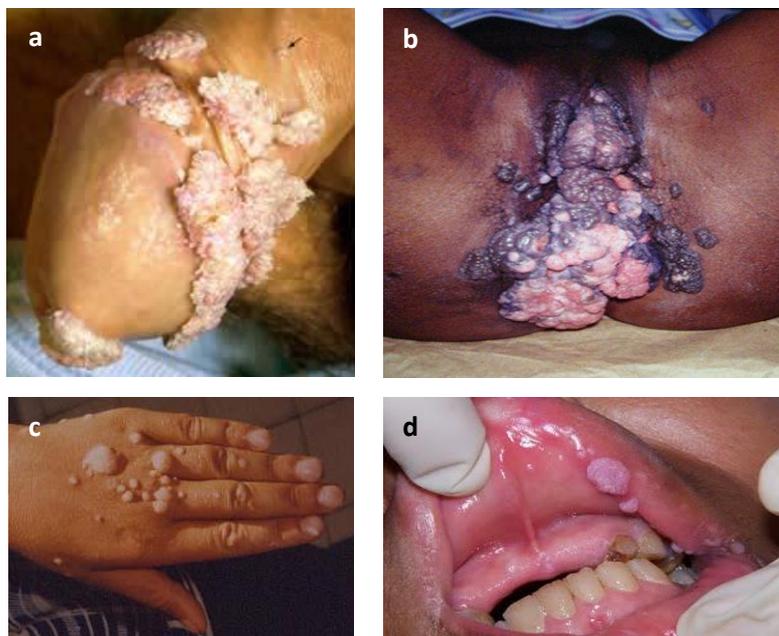
Tipo de lesão genital	Tipo de HPV	
	Menor prevalência	Maior prevalência
Condiloma acuminado	40,42,43,44,51,53,83	6,11
Neoplasias intraepiteliais	6,11,18,26,30,31,33,34,35,39,40,42,43,45,51,52,53,54,55,56,57,58,59,61,62,64,66,67,68,69,70,71,73,74,79,81,82,83,84	16
Câncer cervical e outros anogenitais	(6,11),18,31,33,35,39,45,51,52,54,56,58,59,66,68,69	16

Os tipos de Papilomavírus humano (HPV) entre parênteses indicam uma prevalência rara.

Fonte: Adaptado de (ZUR HAUSEN, 2002).

Os condilomas acuminados, quadro mais frequente associado à presença destes tipos virais, são erupções da pele, de cor branca ou avermelhada, frequentemente causadas por certos tipos de HPV. Aparecem rotineiramente nos genitais externos ou próximas ao ânus, em homens e mulheres, como pode ser visto na Fig. 4. Embora com menor frequência, podem aparecer dentro da vagina ou no colo do útero. As verrugas genitais às vezes causam sintomas como ardor, coceira ou corrimento. Os tipos de HPV que causam verrugas genitais são diferentes daqueles que provocam o câncer de colo do útero. As verrugas genitais podem aparecer semanas ou meses após o contato sexual com uma pessoa infectada (HPV, 2012).

Figura 4. Quadros de condiloma acuminado, em diferentes regiões anatômicas de homens e mulheres. a. Verrugas penianas; b. Lesões condilomatosa extensa que envolve na vagina, vulva, região periuretral e ânus. c. Múltiplas verrugas no dorso da mão; d. condiloma na região oral.



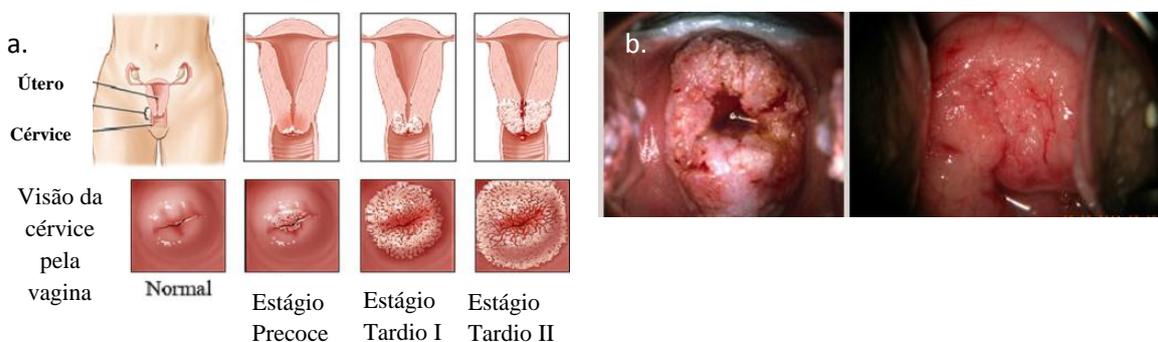
Fontes:<http://www.gustavolemos.com.br/imagens/tratamentos/penis-condiloma-2.jpg>
<http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v40n2/gin12214.pdf>
<http://dstemfoconocmpa.blogspot.com.br/2012/08/candiloma-acuminado.html>
<http://www.institutocrescer.com/2014/04/hpv-cancer-do-colo-do-utero.html?m=1>

Apenas um número limitado de HPV levam a infecções persistentes, que podem evoluir para lesões precursoras do câncer de cabeça e pescoço, laringe e anogenital (GIULIANO, 2002; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015) TAB 2. O potencial para o desenvolvimento de lesões oncogênicas tem sido fortemente atribuído a alguns tipos de HPV, considerados de alto risco, e alta carga viral. Estão relacionados à ação dos oncogenes (E5, E5 e E7) e podem levar ao desenvolvimento da neoplasia cervical e lesões pré-malignas, especialmente em mulheres jovens (LONGWORTH; LAIMINS, 2004; MOSCICKI, 2006; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). As infecções por HPV têm sido identificadas como carcinógenos humanos definitivos para seis tipos de câncer: cervical, peniano, vulvar, anal e orofaríngeo (que inclui a base da língua e as tonsilas), segundo Forman et al. (2012).

2.4.1 Câncer cervical e lesões neoplásicas

Apesar de diversos tipos de células epiteliais poderem ser infectadas com o HPV, observa-se uma maior frequência do desenvolvimento de câncer do colo do útero (CCU) ou cérvix, Fig. 5 (TIMMONS; AKINS; MAHENDROO, 2010). O câncer cervical, como também é conhecido, ocorre preferencialmente na zona de transformação cervical (“transformation zone” – TZ), localizada na divisão entre o epitélio escamoso da ectocérvix e o epitélio colunar da endocérvix. As células basais da TZ têm grande habilidade de diferenciação, o que permite uma elevada taxa de produção de partículas virais (CRUM; MCKEON, 2010); além disso, a presença de hormônios como o estrogênio e a progesterona, que atuam no período menstrual e na gravidez, podem influenciar tanto na infecção por HPV, quanto no desenvolvimento de neoplasias (CHUNG, 2008; TIMMONS; AKINS; MAHENDROO, 2010). Desta forma, há um crescimento anormal de células do colo, parte inferior do útero (HPV, 2012).

Figura 5. Visualização da região genital feminina normal e acometida do câncer cervical uterino (CCU).



a. Esquema da região genital com os estágios de desenvolvimento do CCU em comparação à região normal. b. Fotografias da região cervical com câncer feitas durante exame citológico.

Fontes: adaptado de <http://induswomen.com/article.php?id=238#.VIK2e9KrS70>

<http://www.gynaecancer.com/medical-info/cervix-cancer.html>

O desenvolvimento do CCU é hoje diretamente associado a infecção pelo HPV, apesar da influência de outros fatores, uma vez que estudos apontam que em até 99,7% dos casos de CCU observa-se a presença do vírus, isto é, virtualmente em todos os casos (WALBOOMERS, 1999). Esta correlação começou a ser estabelecida com um estudo publicado pelo médico italiano

Rigoni-Stern, em 1842, (RIGONI-STERN, 1842 *apud* FONSECA, et al. 2015), que, ao revisar obituários de mulheres em Verona no período de 1760 a 1839, observou uma elevada frequência de CCU em mulheres casadas, viúvas e prostitutas, mas uma baixa ocorrência em mulheres virgens e freiras, e o histórico sexual deveria influenciar no desenvolvimento deste tipo de câncer. Os primeiros trabalhos que buscaram determinar o agente etiológico do CCU apontaram para o vírus da herpes (RAWLS, et al., 1968 *apud* FONSECA, et al. 2015). Apenas no final dos anos 70, estudos publicados por Harald zur Hausen (ZUR HAUSEN et al., 1977 *apud* FONSECA, et al. 2015) , demonstraram de forma concreta a relação entre o CCU e um agente causal viral, altamente transmissível sexualmente, que hoje sabe-se ser o HPV, observados pela primeira vez por microscopia eletrônica em 1949 (STRAUSS et al., 1949 *apud* ZUR HAUSEN, et al. 2009).

O câncer cervical é uma doença crônica que pode ocorrer a partir de mudanças intraepiteliais e que pode, no período de 5 a 6 anos, se transformar em um processo invasor, responsável pelo óbito de 5.430 mulheres em 2013 (INCA, 2013). O câncer de colo cervical invasor, em cerca de 90% dos casos, evolui a partir de uma lesão pré-maligna não invasiva (INCA, 2010), podendo ser uma neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou uma lesão intraepitelial escamosa (SIL). Essas lesões pré-malignas são classificadas histologicamente em graus variados, fundamentado em atipias celulares. A NIC I é considerada uma discariose leve, NIC II uma discariose moderada e NIC III discariose severa e carcinoma “in situ”. NIC I é também classificada citologicamente como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (“low-grade” SIL – LSIL) e NIC II/III como lesão intraepitelial escamosa de alto grau (“high-grade” SIL– HSIL) (INCA, 2010). A infecção, tanto por HPV oncogênicos como não oncogênicos, pode causar LSIL na cérvix uterina, enquanto que a maioria das lesões cervicais classificadas como HSIL, carcinoma “in situ” ou câncer invasivo, apresenta infecção por tipos oncogênicos do HPV.

2.5 A influência dos cofatores

Apesar de 95% das biópsias de CCU atestarem a presença do genoma de HPV de alto risco, esta não seria uma condição suficiente para o desenvolvimento do quadro (SCHLECHT, 2001; ZUR HAUSEN, 2009). Segundo estudos, a participação de outros fatores, denominados de cofatores ou fatores de risco, influenciariam, direta ou indiretamente, na instalação do processo carcinogênico no epitélio escamoso cervical (HUSSAIN, 2008). O risco de adquirir a infecção pelo HPV seria maior, por exemplo, com o aumento do número de parceiros sexuais, relações sexuais mais frequentes e pelo estabelecimento de relações sexuais com parceiros infectados (GIORDANO et al. 2007; SERRAVALLE, 2009). Mas outros cofatores teriam papel neste processo, como idade da menarca e da primeira relação sexual, a associação com a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) – assim como com outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) tais como, Herpesvírus tipo 2 e *Chlamydia trachomatis* – fatores genéticos como o polimorfismo da proteína p53, o tabagismo, a ingestão constante de álcool e o uso de anticoncepcionais orais influenciariam no desenvolvimento do processo de imortalização e carcinogênese (MINKOFF, 2004). Há ainda aspectos relacionados com a resposta imunológica do hospedeiro e aqueles relacionados ao próprio vírus, tais como genótipo do HPV, coinfeção com outros tipos, variantes, carga viral e integração.

É necessário, porém, observar que, apesar do destaque que os cofatores recebem, análises mais contundentes devem ser estabelecidas, pois, em alguns casos, a evidência epidemiológica ainda é inconsistente (IARC, 2012; GIAKOUMELOU; WHEELHOUSE; CUSCHIERI, 2015).

Outro fator que vem sendo abordado como diferencial no desenvolvimento de CCU é o próprio comportamento das mulheres em relação à detecção e ao tratamento das lesões, que é profundamente afetado pelo acesso à informação (SANDERSON, 2015). Isto se deve à necessidade de reconhecimento da seriedade da enfermidade e do potencial de evolução de alguns tipos de lesões para o quadro de câncer invasivo. Desta forma, o comprometimento com um tratamento, que pode requerer diversas consultas, portanto tempo, e até mesmo o

emprego de técnicas invasivas, para a remoção das lesões, levam algumas mulheres a protelarem os cuidados necessários.

2.5.1 Coinfecções: o papel do Herpesvírus na infecção por HPV

A família Herpesviridae inclui mais de 200 espécies que infectam não apenas os mamíferos, mas quase todo o reino animal. Segundo a Organização mundial de saúde, os integrantes desta família podem ser encontrados em 90% da população mundial. Os seres humanos são os únicos hospedeiros de, pelo menos, nove espécies de herpes, sendo o herpesvírus simplex humano 1 (HSV 1) o mais prevalente. O HSV é frequentemente associado com coinfecções, especialmente entre pacientes HIV positivos (KUKHANOVA et al., 2014).

Durante as décadas de 1960 e 1970, as infecções por Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) foi considerado o possível agente causador do câncer cervical, após o HPV ter sido detectado nas lesões cancerígenas, propôs-se que as infecções por HSV 2 iniciariam mutações e carcinogêneses nas células infectadas por HPV (SMITH et al., 2002) Desta forma, ainda hoje estudos buscam demonstrar se existe correlação entre a coinfecção por estes agentes e o desenvolvimento de câncer cervical. Trabalhos como de Zhao et al. 2012 sugerem que a coinfecção do HSV 2 com o HPV estão relacionadas ao desenvolvimento do quadro, mas que a presença do HSV 1 não interferiria no desenvolvimento do processo carcinogênico. Por outro lado, Guimarães et al. (2012), apontam que a presença do HSV, seja 1 ou 2, juntamente com o HPV, só afeta significativamente o desenvolvimento de câncer cervical em pacientes HIV positivas.

2.6 Epidemiologia

Infecções por HPV são muito comuns na população mundial, com taxas de prevalência que variam entre diferentes regiões geográficas, de acordo com o nível de desenvolvimento e escolaridade dos indivíduos. Estima-se que entre 50%–80% dos homens e mulheres sexualmente ativos serão infectados em algum momento de suas vidas (PETO et al., 2004; FORMAN et al., 2012).

A prevalência viral só é definida, na maioria dos países, pelos trabalhos científicos, pois a pesquisa do DNA viral ainda não é difundida na rotina clínica, estando presente apenas em alguns países, como a Inglaterra. Nos demais normalmente a busca é por indicadores da presença do vírus, pela detecção de lesões em diferentes partes do corpo, sobretudo nas regiões genital e oral, especialmente em casos de condilomas e de lesões cancerígenas, ou com esta tendência. Porém, grande parte dos indivíduos não apresenta sintomas, assim apenas métodos de diagnóstico molecular podem comprovar a presença viral.

Uma meta-análise que envolveu mais de um milhão de mulheres com citologias cervicais normais e incluiu mais de 194 estudos, que tiveram como base análises de reações de PCR e captura híbrida II[®] (Qiagen Gaithersburg, Inc., MD, USA), Bruni et al. (2010) indicaram que a prevalência mundial de infecção por HPV estaria entre 11 e 12%, Fig. 6. Foi possível observar ainda a grande variação regional desta prevalência e um maior número de casos nos países considerados em desenvolvimento, com poucas exceções. Particularmente as maiores prevalências foram observadas no Caribe e na África oriental, nas quais os índices excederam os 30% e a menor na Ásia ocidental (1,7%). Na América do Sul a taxa observada foi de 15,3%, acima da considerada média mundial, 11,7%.

Figura 6. Prevalência mundial, por região, e os tipos mais frequentes de HPV entre mulheres com citologia normal: meta-análise incluindo mais de 1 milhão de mulheres nos 5 continentes



Adaptado de Bruni et al. (2010).

Os estudos utilizados na meta-análise desenvolvida por Bruni et al. (2010) permitiram ainda a determinação dos tipos de HPV mais prevalentes no mundo, assim dentre as amostras consideradas positivas os cinco tipos mais prevalentes foram: HPV16 (3,2%), HPV18 (1,4%), HPV52 (0,9%), HPV31 (0,8%) e HPV58 (0,7%). Todos os outros tipos de HPV tiveram prevalência de 0,6% ou menos, incluindo o HPV45 (0,5%, normalmente o terceiro tipo mais associado ao desenvolvimento de câncer cervical após os HPV16 e 18); e os tipos HPV6 (0,5%) e HPV11 (0,2%), comumente associados a lesões genitais.

A prevalência baseada na distribuição geográfica é bastante variável. Resultados obtidos por Sun et al. (2010), na China, indicam que o HPV16 foi mais prevalente (19,64%), seguido pelo HPV58 (8,39%), enquanto os tipos 53 e 66 estiveram presentes em 3,18% e 1,80%, respectivamente. Em outro estudo realizado por Eren et al. (2010) na Turquia, o HPV16 também foi o mais prevalente com 34%, o HPV53 esteve em 11% e o HPV66 em 10% dos casos.

Segundo a Dr^a. Luisa Villa, coordenadora do Instituto do HPV da Santa Casa de São Paulo, os HPV6 e 11 causam aproximadamente 90% das verrugas genitais, uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comumente notificadas em todo o mundo, e cerca de 10% das lesões displásicas de baixo grau do colo do útero. A cada ano, são diagnosticados em torno de 30 milhões de novos casos de verrugas genitais no mundo, considerando apenas as mulheres (HPV, 2012).

Entre os mais de 200 tipos de HPV descritos, os HPV16 e 18 são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical (CASTELLSAGUE, 2009; LIU; TAIOLI, 2014), sendo o HPV16 o mais prevalente no mundo e responsável por cerca de 50% destes casos (CASTELLSAGUÉ, 2007). Outros tipos oncogênicos como o HPV31, 45, 53, 52 e 58 têm sido frequentemente detectados em amostras cervicais de mulheres que desenvolveram o CCU, porém com menor frequência (CASTELLSAGUÉ, 2007; SUN, 2010; EREN, 2010). O HPV31, por exemplo, é normalmente encontrado em coinfeções com o HPV16 em biópsias de tecidos com lesões cancerígenas (BALDEZ DA SILVA et al., 2012).

Esta grande variação de prevalência da presença do HPV detectada no mundo também pode ser observada no Brasil, seja por sua grande dimensão, seja pelas diferenças socioeconômicas presentes no país. Segundo Ayres e Silva

(2010), a prevalência de infecções cervicais por HPV varia entre 13,7% e 54,3%, dentre mulheres com alterações citológicas, e entre 10% e 24,5% dentre as que apresentaram citologia normal.

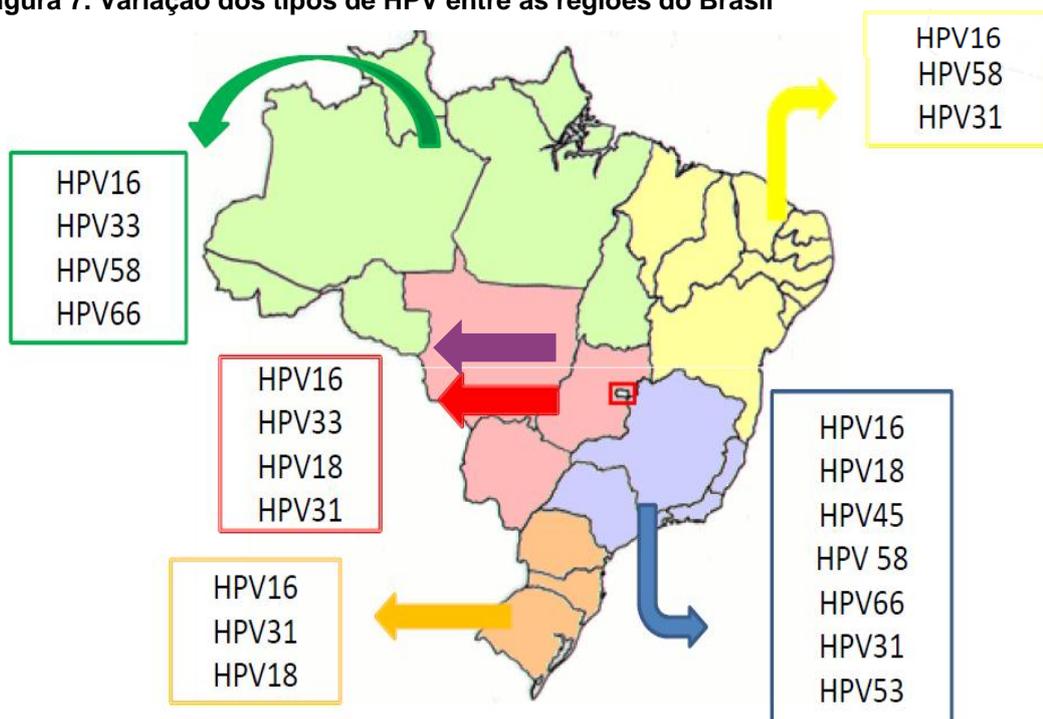
Pode-se observar ainda que no Brasil há uma tendência a se verificar os mesmo tipos de HPV determinados para outras partes do mundo, porém com algumas exceções, especialmente no que tange a prevalência dos mesmos. De maneira geral, o tipo mais prevalente no Brasil é o HPV16, quando os tipos de alto risco são abordados. Em trabalhos como de Baldez da Silva, et al. (2012), no Nordeste do Brasil, fica evidente a prevalência do HPV16, seguido do HPV31, tanto em infecções simples quanto em coinfeções. O HPV18 foi encontrado em menos de 2% das amostras de cérvix uterina, assim como o HPV31. Ainda no Nordeste, esta tendência também foi verificada por Bruno et al. (2014), neste estudo os tipos HPV56 e 39 só não foram mais prevalentes do que o HPV16; enquanto em relação ao HPV18 houve baixa prevalência, presente em 5,4% das amostras positivas. Quando observados os HPV de baixo risco, o HPV 42, seguido do HPV 6 e dos tipos HPV 44 e 55 foram os mais prevalentes; enquanto o HPV 11 foi o menos frequente com menos de 3%, o que também é corroborado em outros trabalhos, como o de Tamegão-Lopes et al. (2014), desenvolvido no Norte do Brasil.

No trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2013) no Sul do Brasil a tendência de maior prevalência do HPV16 permaneceu, seguida do HPV58, dentre os de alto risco oncogênico e do HPV6 dentre os de baixo risco. Porém, neste caso, assim como em outros trabalhos desenvolvidos neta região, a presença do HPV18 foi significativa.

No Brasil, os dados relacionados à distribuição dos tipos oncogênicos de HPV menos prevalentes não são conclusivos. De acordo com Krambeck et al. (2008), a prevalência do HPV53 foi de 4,0% e do HPV66 de 4,5%.

Esta variação dos diversos tipos de HPV fica evidenciada na literatura e é abordada por Alves (2013), que associa os principais tipos de HPV às diferentes regiões do Brasil, Fig.7.

Figura 7. Variação dos tipos de HPV entre as regiões do Brasil



Adaptado de Alves, 2013.

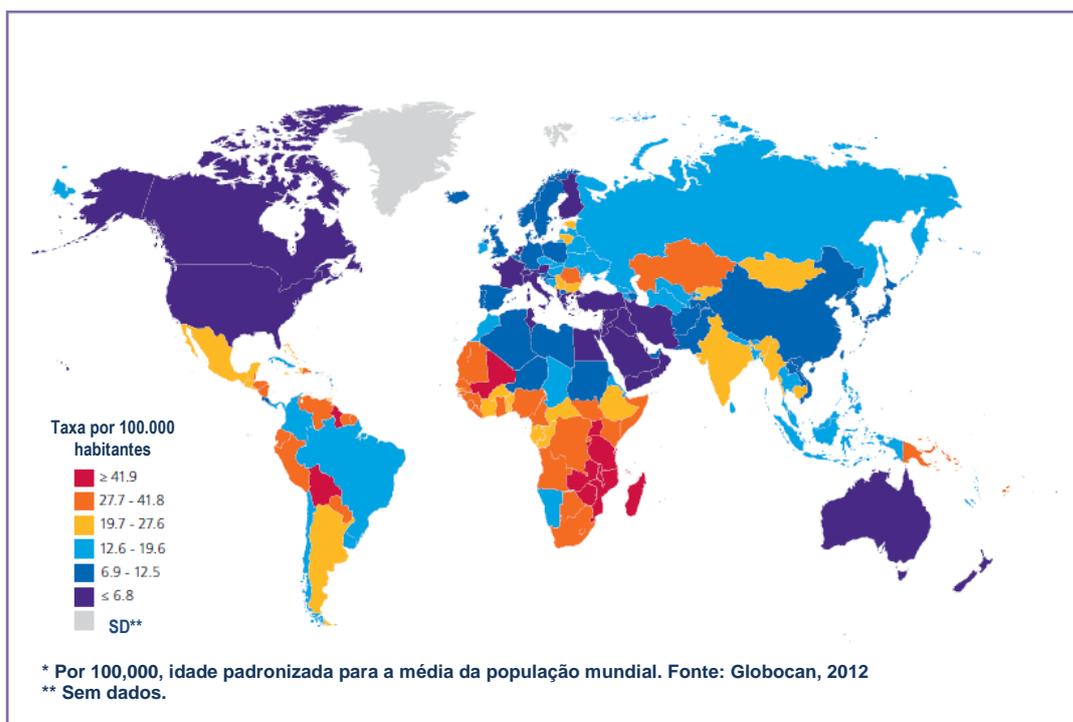
2.6.1 Epidemiologia do Câncer cervical

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as estimativas mais recentes apontaram a ocorrência de mais de 500 mil novos casos de câncer cervical no mundo (WHO, 2012). Desta forma, este tipo de neoplasia é a quarta mais comum entre as mulheres, porém, é considerada a segunda, quando apenas países em desenvolvimento são observados, nos quais ocorrem cerca de 90% das mortes por CCU. Assim, dentre as pacientes positivas, mais de 230 mil teriam ido a óbito, sendo que em torno de 30% das vítimas seriam menores de 25 anos (WHO, 2012; CASTELLSAGUE, et al., 2009).

A incidência de CCU é cerca de dez vezes maior em países em desenvolvimento. Segundo o INCA (2012), na América Latina são registrados 72 mil novos casos da doença e 33 mil mulheres morrem a cada ano, sendo a primeira causa de morte em mulheres de 15 a 44 anos (HPV, 2012). A figura 9 permite a observação desta variação nas diversas partes do globo. No Brasil a

taxa de incidência do CCU varia entre 12,6 e 19,6/ 100,000 mulheres, segundo a Agência Internacional de pesquisa do câncer (American Cancer Society, 2015).

Figura 8. Variações das Taxas de incidência de câncer cervical uterino pelo mundo*, 2012



Adaptado de: American Cancer Society, 2015.

É interessante observar ainda a grande discrepância entre incidência e mortalidade, pela enfermidade em questão, quando países desenvolvidos e em desenvolvimento são comparados. No primeiro caso, a incidência seria de 9,9/ 100 mil mulheres, com uma taxa de mortalidade de 3,3 mulheres/ 100 mil. No segundo cenário seriam 15,7/ 100 mil mulheres positivas, com um índice de mortalidade de 8,3 mulheres/ 100 mil (American Cancer Society, 2015).

As estimativas mais recentes apontam que mais de 16 mil novos casos de CCU são esperados para 2016 no Brasil, com uma incidência de 17,54 casos/ 100 mil mulheres. Sendo que, apenas para a região Nordeste do Brasil, mais de 5.600 casos de CCU devem ser diagnosticados no referido ano, com uma incidência de 19,49/ 100 mil mulheres, dados verificáveis na TAB. 3. Este pode ser considerado o segundo tipo de câncer mais incidente na região (INCA, 2015).

Tabela 3. Estimativas do número de casos novos de câncer, entre as mulheres do Brasil e da região do Nordeste brasileiro, 2016

Localização Primária do câncer	BRASIL		NORDESTE	
	Casos novos	%	Casos novos	%
Mama Feminina	57.960	28,1%	11.190	20,5%
Cólon e Reto	17.620	8,6%	5.630	10,3%
Colo do Útero	16.640	7,9%	2.530	4,6%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	2.100	3,9%
Estômago	7.600	3,7%	1.940	3,6%
Corpo do Útero	6.950	3,4%	1.320	2,4%
Ovário	6.150	3,0%	1.420	2,6%
Glândula Tireóide	5.870	2,9%	1.810	3,3%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	760	1,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	950	1,7%
Leucemias	4.530	2,2%	1.070	2,0%
Cavidade oral	4.350	2,1%	1.190	2,2%
Esôfago	2.860	1,4%	540	1,0%
Pele Melanoma	2.670	1,3%	390	0,7%
Bexiga	2.470	1,2%	390	0,7%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%	160	0,3 %
Laringe	990	0,5%	310	0,6%
Todas as Neoplasias sem pele*	205.960		41.750	
Todas as Neoplasias	300.870		54.500	

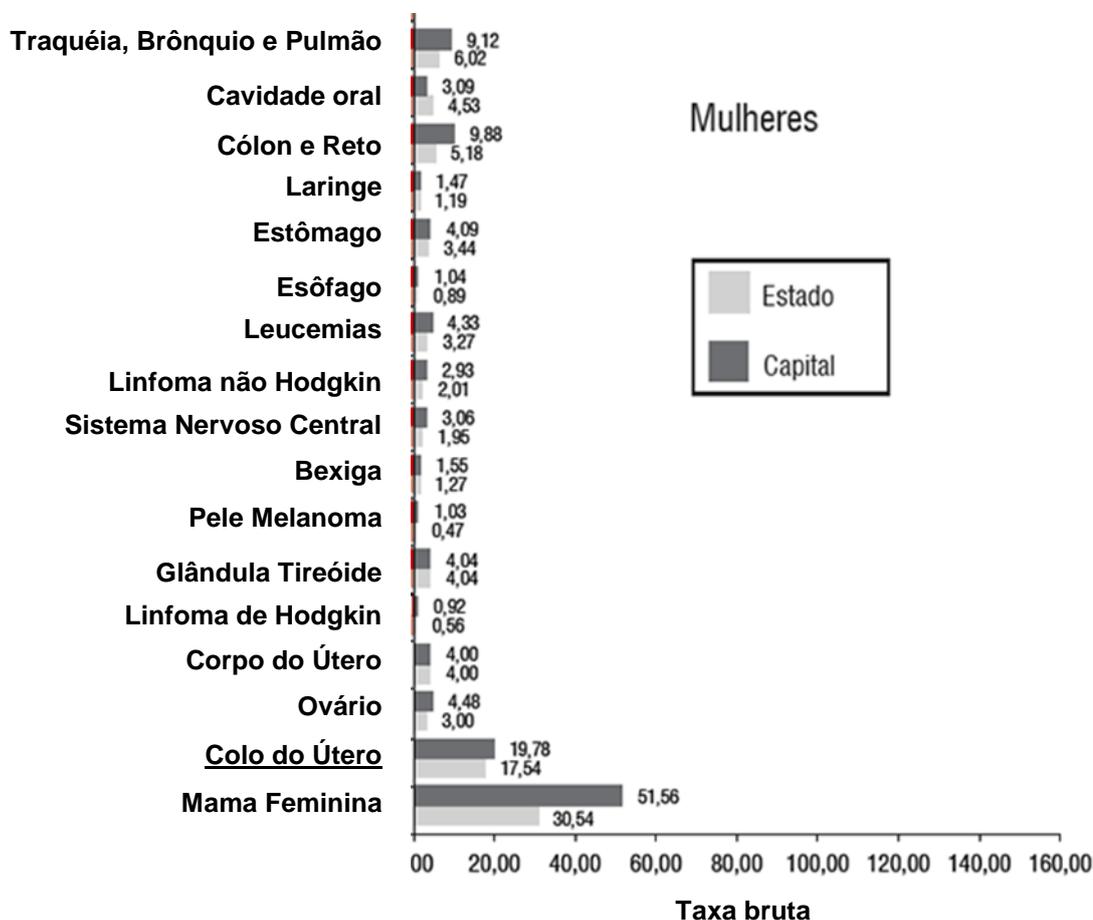
*Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma.

Fontes: Ministério da Saúde, INCA, Estimativa de câncer no Brasil, 2016.

A taxa de incidência de câncer de colo do útero estimada para 2016 no Estado de Alagoas pode ser considerada alta, porém compatível com as observadas em diversas regiões dos países em desenvolvimento, 17,54 mulheres, segundo dados divulgados pelo INCA, 2015, Fig. 10.

Apesar de seu inegável destaque, tanto em cenário nacional, quanto mundial, o CCU não é o único tipo de câncer relacionável ao HPV, sabe-se que neoplasias de cólon e reto, do corpo do útero, da cavidade oral e, até mesmo, de mama podem ser associadas à presença do vírus, especialmente dos considerados de alto risco oncogênico. O HPV16 se destaca, estima-se que em 2016 haja uma prevalência deste tipo de quase 53%, nos casos de câncer cervical entre as mulheres brasileiras.

Figura 9. Taxas brutas de incidência de câncer estimadas para 2016 por sexo, segundo Estado e capital (Alagoas/ Maceió)



Adaptado de: INCA, 2015

2.7 Prevenção – Vacinas anti-HPV

A imunização, com o objetivo de prevenção da infecção, é uma alternativa que, apesar de controversa em alguns países, pode contribuir para o controle da incidência de diferentes patologias, desde verrugas até o próprio câncer do colo do útero, dependendo do tipo de vacina eleita.

Na década de 90 foram iniciados os testes clínicos com várias vacinas potenciais que tinham como alvo os tipos mais comuns do HPV. Atualmente, existem duas vacinas profiláticas disponíveis: a Gardasil® (Merck&Co), chamada de HPV4 e a Cervarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals) chamada de HPV2. Ambas são compostas por proteínas L1 recombinantes do capsídeo viral, que

espontaneamente se unem formando partículas semelhantes às partículas virais (VLP). Este tipo de vacina é considerada segura, pois as partículas formadas, apesar de conferirem imunidade, não são infecciosas (SCHILLER et al., 2008). As VLPs são geradas em cultura de *Saccharomyces cerevisiae* com tecnologia recombinante, no caso da Gardasil[®] e em cultura de células de insetos *Spodoptera frugiperda* Sf-9 e *Trichoplusia ni* Hi-5, no caso da Cervarix[™].

Estas vacinas imunizam contra diferentes tipos de HPV e promovem respostas imunológicas distintas quando o organismo é desafiado com uma ou outra. A Cervarix[™] previne infecções pelos HPV16 e 18, considerados oncogênicos e relacionados a mais de 70% dos casos de câncer do colo do útero no mundo. Enquanto a Gardasil[®] inclui L1 dos HPV6, 11, 16 e 18 (SCHILLER et al., 2008), isto é, também estão presentes, os dois tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico, porém frequentemente associados aos quadros de condilomas acuminados. Já a resposta imunológica gerada estará especialmente vinculada ao tipo de adjuvante empregado. A Gardasil[®] usa somente adjuvante de alumínio (sulfato hidroxifosfato alumínio) enquanto a Cervarix[™] usa um sistema de adjuvante chamado ASO4, que é composto por monofosforil lipídio A (MPL), lipopolissacarídeo (LPS) e hidróxido de alumínio. Adjuvantes baseados em sais de alumínio induzem resposta imune do tipo Th2. No entanto, MPL ativa resposta imune inata via receptor *toll-like* e podem induzir um padrão de diferenciação misto, com resposta Th1/Th2 de linfócitos T auxiliares. Estas vacinas foram desenhadas para gerar anticorpos neutralizantes e prevenir infecção, mas há evidências de que geram resposta imune mediada por células.

No Brasil, a inclusão da vacina no programa nacional de vacinação teve início em 2014, sendo o público-alvo meninas entre 11 e 13 anos. Ambas são administradas via intramuscular em três doses num período de seis meses (1º dia, 1º mês - Cervarix[™] ou 2º mês - Gardasil[®] e 6º mês) (VILLA, 2008).

Recentemente foi aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) uma vacina que, além dos quatro tipos de VLPs já citados contém VLPs do HPV 31, 33, 45, 52, and 58, a Gardasil 9 (Merck & Co., Inc). Esta vacina visa uma maior cobertura frente aos tipos de alto risco oncogênico e poderá, segundo a empresa produtora, ser administrada mesmo àqueles que já fizeram uso das vacinas até então no mercado.

2.8 Métodos de detecção de HPV e do Câncer no Colo Uterino

Atualmente, no Brasil a detecção do HPV ocorre de forma indireta, ao invés de se detectar o vírus, observa-se a presença de lesões e, desta forma, o diagnóstico é sugestivo para a presença do vírus, quando lesões epiteliais e de mucosa são encontradas. Esta forma de detecção pode ser onerosa tanto para a rede de saúde, quanto para a paciente, pois no caso de falso positiva a mulher passa por procedimentos invasivos tão desnecessários quanto os gastos despendidos com eles. No caso de falsos negativos, a mulher não é corretamente acompanhada e pode ter lesões que progridam para outras mais graves, e até para o próprio câncer invasivo. Os métodos de eleição no Brasil para esta detecção são não moleculares, que incluem: inspeção visual, colposcopia, citopatologia e histopatologia. Estas técnicas são consideradas indiretas porque não detectam a presença do vírus, mas sim alterações citopatológicas e histopatológicas decorrentes da infecção pelo HPV, o que também exclui a possibilidade de tipagem do DNA, que permitiria identificar os tipos de alto risco oncogênico e, conseqüentemente, além de obter a informação epidemiológica, orientar corretamente a mesma (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Uma possibilidade de detecção das partículas virais é a visualização por microscopia eletrônica, porém, este é um método moroso e oneroso, utilizado apenas para fins científicos. Os métodos moleculares são desta forma, os mais indicados, sendo empregados como complementares aos não moleculares em alguns países. São considerados diretos e detectam a presença do genoma do HPV, ou seus transcritos, na amostra clínica (IARC, 2007).

2.8.1 Métodos não moleculares

O diagnóstico morfológico da infecção pelo HPV utilizando esfregaços celulares e corte de tecido são amplamente utilizados. No século XX, o rastreamento do câncer cervical foi implementado em vários países utilizando o exame de Papanicolaou (KITCHENER; CASTLE; COX, 2006), técnica citomorfológica de esfregaços cervicais. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, este é o mais aceito e recomendado método de prevenção do câncer cervical, para mulheres dos 25 aos 64 anos de idade (INCA, 2012). No entanto,

sofre limitações por vários fatores, como os erros de amostragem pelo clínico e erros de avaliação do microscopista (ROSENBLATT et al., 2005). A ocorrência de resultados falso negativos nos exames citopatológicos fica evidenciada, por exemplo, no trabalho de Rama et al. (2008) o qual demonstra que 86,5% das pacientes com alterações citológicas e 92,8% com alterações histológicas haviam feito exame citopatológico anterior, em período inferior a três anos.

2.8.1.1 Citologia

A triagem feita pela colpocitologia, ou apenas citologia, tem sido o meio mais utilizado para se detectar as lesões pré-cancerosas do colo uterino. Após ter sido usada pela primeira vez em 1943 por Papanicolau e Traut, a triagem citológica muito tem contribuído para a detecção precoce do câncer cervical (LEE et al, 2005). O exame de Papanicolau consiste no estudo das células descamadas esfoliadas da ectocérvice e endocérvice do colo uterino, sendo atualmente o meio mais utilizado na rede de atenção básica à saúde por ser indolor, de baixo custo e eficaz, podendo ser realizado em qualquer localidade por um profissional treinado. No Brasil, o exame é oferecido gratuitamente pelos municípios, pelo Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero (BEZERRA et al, 2005). A citologia é indicada em mulheres de 25 a 60 anos e deve ser feito a, no máximo, cada três anos, se houver dois resultados negativos anteriormente para controle do câncer do colo do útero. Para qualquer lesão encontrada, seja ela a mais simples, deve-se repetir o exame para controle a cada ano (ARAÚJO et al., 2014). Assim como a colposcopia, também é um método de triagem. Este exame é o método de escolha desde a década de 1950, o que tem sido muito valioso para triagem em massa, por ser capaz de detectar lesões e orientar o tratamento adequado. Contudo, o teste tem sensibilidade limitada, sendo relatada taxa geral de resultado falso-negativo de 20% a 30% (CARESTIATO et al, 2006; CARMO, FIORINI, 2007) e, em lesões pré-malignas e malignas, de 15% a 50%. O exame fornece resultado falso-positivo em cerca de 30% (JACOBS et al, 1999). Assim, métodos complementares foram sendo estabelecidos ao longo dos anos, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce da doença cervical.

2.8.1.2 Colposcopia

A colposcopia se popularizou como método de valor na propedêutica do colo uterino após 1945 em todo o mundo. É um exame direto, realizado por profissional médico, com a ajuda de um aparelho, com luz e lentes, chamado colposcópico que consegue aumentar de 10 a 40 vezes o tamanho normal do colo do útero. Por ser realizado apenas por profissional médico, não está acessível à boa parte da população mais carente do país e por se tratar de um método visual, não há como diagnosticar com exatidão as possíveis lesões encontradas. Após observar essas lesões, o profissional pode retirar fragmentos da mesma para posterior estudo histopatológico, este sim, método diagnóstico definitivo (DE PALO, 2009). É indicada a pacientes após o início da atividade sexual para o controle do câncer ou outras afecções do colo do útero. É um método de triagem, portanto não conclusivo do ponto de vista de diagnóstico. O seu papel principal seria reconhecer a presença de lesões anormais no colo uterino e vagina, determinando sua topografia em relação à Junção Escamo Colunar (JEC) e ao Orifício Cervical Externo (OCE), bem como orientando o melhor local para as biópsias. O custo elevado do aparelho e a necessidade de especialização do profissional médico limitam o seu uso em larga escala (CARTIER, 2008). Outra dificuldade do exame consiste no fato de não se ter como arquivá-la e nem fazer revisão dos laudos, ao contrário do que ocorre com a citologia oncótica e a histopatologia, pois o uso de colpofotografia para documentação é um processo demorado, caro e impreciso. Dentre os fatores que poderiam influenciar na correta avaliação colposcópica, citam-se ainda: a inexperiência do examinador, excessiva rapidez no exame, presença e sobreposição de alterações virais (HPV) ou de outra natureza, como as induzidas pela gestação, infecções bacterianas, prolapso genital e após tratamento radioterápico (CARTIER, 2008).

2.8.1.3 Histopatologia

O exame histopatológico do colo uterino é aceito como procedimento definitivo (padrão-ouro) para o diagnóstico de lesões pré neoplásicas e neoplásicas do colo uterino (IARC, 2010). É um procedimento de grande importância, e é nele que se baseia a maioria das decisões terapêuticas até o momento. Além de auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HPV, o estudo histopatológico é capaz de graduar as lesões de acordo com seu potencial proliferativo (SOUZA, MELO & CASTRO, 2001). As lesões neoplásicas invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva. Microscopicamente, isto se observa como uma gama de eventos que progridem da atipia celular a graus variados de displasia ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC) antes da progressão ao carcinoma invasivo (IARC, 2010). A classificação histopatológica vigente é a da Organização Mundial da Saúde na qual as lesões intraepiteliais são divididas em três graus, com gravidade crescente: NIC I, NIC II e NIC III (TRAVASSOLI & DEVILLE, 2003). O parecer sobre a presença de NIC em uma amostra tecidual cervical e o seu grau depende das características histológicas relativas a diferenciação, maturação e estratificação das células e anomalias nucleares. A proporção da espessura das células do epitélio com células maduras e diferenciadas é empregada na classificação da NIC. Graus mais graves de NIC têm maior probabilidade de apresentar uma maior proporção da espessura do epitélio composto de células indiferenciadas com apenas uma fina camada de células maduras e diferenciadas na superfície (IARC, 2010).

Contudo, é importante salientar que as modificações na estrutura celular, observadas pelo microscopista para fechar o laudo de presença de HPV, podem estar associadas a outros fatores que não à presença do vírus. Esta análise visa à definição de modificações como os coilócitos, observados como confirmatórios para o HPV, porém, outros fatores, como a idade avançada da mulher, podem levar à sua formação. Assim, o diagnóstico, utilizando-se apenas técnicas visuais não permite a certeza da presença do HPV, apenas a detecção do seu material genético nas amostras analisadas poderia confirmar o sugestivo clínico.

2.8.2 Métodos moleculares

Após o advento das técnicas moleculares para detecção do genoma do HPV tornou-se evidente que os achados citológicos e histológicos não são indicadores sensíveis da presença do vírus (IARC, 2007). Ronco et al. (2010), em um estudo realizado na Itália com 94.370 mulheres, de 25 a 60 anos de idade, demonstraram que o rastreamento do CCU baseado em teste molecular para DNA-HPV é mais efetivo do que o baseado em citologia convencional porque detecta lesões de alto grau persistentes precocemente e amplia o intervalo entre os testes com segurança. Esta possibilidade é abordada por Dillner et al. (2008), que mostram que mulheres com testes citopatológico e molecular para DNA-HPV positivos apresentam uma taxa de incidência de NIC III de 34%, nos seis anos seguintes à realização dos testes. Para mulheres com teste citopatológico normal e molecular positivo esta taxa é de 10%, e quando o teste citopatológico é anormal e o molecular negativo 2,7% e com ambos os testes negativos 0,28%. Após seis anos de seguimento, a taxa de NIC III foi significativamente menor entre mulheres negativas no teste molecular do que as com resultado normal no teste citopatológico. Além disso, fica evidente que o intervalo entre os testes para mulheres com resultado DNA-HPV negativo pode ser ampliado com segurança, o que levaria a uma diminuição dos custos (DILLNER et al., 2008).

Dentre os métodos moleculares mais comuns, utilizados para a detecção do HPV, estão a hibridização "in situ", captura híbrida e a reação de polimerase em cadeia - PCR. Nos Centros de saúde em geral, eles só são indicados a pacientes que apresentem lesões colposcópicas não características, citologia cérvicovaginal sugestiva de ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e AGUS (células glandulares de significado indeterminado). Também é indicado para diagnósticos de lesões de baixo grau em colo, vagina e vulva, com presença de HPV ou lesão intraepitelial de grau 1, determinada pela citologia e/ou histopatologia, especialmente quando for feita somente a observação clínica sem tratamento (IARC, 2012).

Os testes que provêm a genotipagem do HPV normalmente utilizam a técnica de PCR seguida da técnica de hibridização ou técnica de arranjo (comumente conhecida como *array*). Em comparação ao método de captura híbrida, estudos

demonstram uma especificidade que varia de 78,3 a 93% para captura híbrida e 92,8 a 100% para a PCR (SZOSTEK et al. 2006; WEYNAND, 2010).

2.8.2.1 Captura Híbrida® versão II; HC2 (Qiagen, Gaithersburg, Germany)

A principal técnica molecular utilizada atualmente no Brasil, para a detecção do HPV, é a captura híbrida II (Digene Diagnostics, Gaithersburg, MD, EUA), apesar de ainda não ser adotada pelo sistema público de saúde. Baseia-se em sondas de RNA para 13 tipos de HPV de alto risco e cinco tipos de baixo risco. Esta técnica não especifica o tipo de HPV, apenas indica se a amostra é positiva ou negativa e se o vírus é de baixo ou alto risco. A especificação do HPV em diferentes tipos oncogênicos é essencial para fins epidemiológicos, inclusive no tocante ao monitoramento da resposta da população à vacinação, e possibilitam melhor acompanhamento da paciente, pois, alguns tipos virais como o HPV16, têm se demonstrado mais oncovirulentos que outros (VIDAL et al. 2012).

Além disso, devido à forma de leitura das reações, através da reação das sondas presentes nas amostras, a técnica não permite a leitura de infecções mistas, isto é, com mais de um tipo de HPV, o que pode levar à detecção de falsos negativos.

2.8.2.2 Métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA viral através de PCR oferece maior sensibilidade. Como é uma reação que não requer altos índices de pureza das amostras de DNA a serem testadas, a utilização de PCR simplifica a preparação do material coletado e permite, inclusive, a utilização de tecidos fixados e empacotados em parafina. O câncer de colo uterino, mesmo sendo uma doença silenciosa, pode ser prevenido, uma vez que os tumores progridem lentamente. Essa técnica pode ser decisiva no diagnóstico e tipagem do vírus, e no acompanhamento clínico de pacientes.

Assim, a especificidade e sensibilidade do PCR, seja individualmente ou como apoio a técnicas não moleculares, permite a detecção antecipada de eventuais anormalidades que podem culminar no câncer. Além de todo o viés econômico óbvio, a detecção prévia influencia positivamente no psicológico das pacientes, contribuindo de forma significativa para a qualidade de vida das mesmas.

2.8.2.2.1 PCR convencional

Reações de PCR que utilizam iniciadores consenso podem amplificar um grande espectro de tipos de HPV. Esses conjuntos de iniciadores têm como alvo regiões do genoma viral conservadas dentre os diferentes tipos de HPV, como por exemplo, a região L1, região mais conservada do genoma do HPV e, portanto alvo da maioria dos protocolos de PCR genéricos (MOLIJN et al., 2005). Os protocolos de PCR convencionais mais utilizados visam amplificar parte da região L1, sendo capazes de detectar todos os tipos de HPV que infectam a região de mucosa (VILLA E DENNY, 2006).

2.8.2.2.2 PCR tipo específico

Os PCR tipo específicos são desenhados com o objetivo de amplificar um único tipo de HPV. No entanto, para determinar a presença de DNA de HPV numa única amostra múltiplas reações de PCR devem ser realizadas separadamente. Esse método é trabalhoso, caro e a especificidade de cada conjunto de iniciadores deve ser validada (MOLIJN et al., 2005).

2.8.2.2.3 PCR multiplex

Neste tipo de técnica mais de uma sequência alvo pode ser amplificada devido à inclusão de mais de um par de iniciadores na reação. Este processo possibilita a geração de uma grande quantidade de dados, economizando tempo sem, contudo, comprometer a qualidade da detecção. As condições da reação, como a compatibilidade entre os iniciadores, que não devem reagir entre si na mistura de reagentes requerida para a reação, tem uma grande importância na definição da técnica (ELFATH, et al. 2000).

2.8.2.2.4 PCR em tempo real (Real Time PCR)

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de monitorar a amplificação do material genético enquanto a reação acontece e tem sido utilizada para detectar ou quantificar o DNA do HPV. Este método utiliza o momento do ciclo da reação

no qual a amplificação de um alvo ultrapassa um limite (cutoff/threshold), ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Existem vários sistemas para detecção dos produtos de PCR, entre estes os mais empregados são o sistema TaqMan® e o sistema do corante SYBR® Green I (KUBISTA et al., 2006). Os iniciadores tipo específicos podem ser combinados com sondas fluorescentes complementares a mais de um genótipo de HPV em reações de multiplex PCR em tempo real (MOLIJN et al., 2005).

2.8.2.3 Genotipagem do HPV

O sequenciamento do produto da reação de PCR é utilizado em muitos estudos como meio de tipagem do vírus, sendo considerado “padrão ouro” por alguns autores, pois permite a identificação precisa de quase todos os tipos, inclusive os raros e novos. Contudo, a identificação da sequência do DNA não é possível quando a amostra clínica contém múltiplos genótipos do HPV, o que pode ser comum em alguns grupos de pacientes. O uso do sequenciamento pode ainda, em alguns casos, subestimar a prevalência dos tipos em infecção múltipla, uma vez que pode ocorrer a amplificação apenas do tipo de maior prevalência na amostra (CAPRA et al, 2008).

2.8.2.3.1 Métodos Comerciais de Genotipagem do HPV

Grandes empresas como a Roche comercializam “kits” prontos para detecção de HPV, como o “kit” Cobas® HPV Test, que utiliza a técnica de PCR com posterior hibridização; neste caso 14 tipos de HPV de alto risco são detectados, mas apenas os tipos HPV 16 e 18 são especificados. Outros “kits” utilizam a técnica de PCR seguida da *array* como o AMPLICOR HPV Test e o Linear Array HPV Genotyping Test. O primeiro detecta 13 tipos de HPV de alto risco, enquanto o segundo detecta tanto tipos de alto quanto de baixo risco, totalizando 37 tipos de HPV (VIDAL et al. 2012). O PapilloCheck® da empresa Greiner Bio-One, também é um teste baseado na tecnologia de *microarray* para a detecção e genotipagem de 24 tipos de HPV de alto e baixo risco.

Desta forma, observa-se que no mercado atual os “kits” comerciais têm como alvo de detecção diversos tipos de HPV, em especial os considerados altamente oncogênicos, porém esta variabilidade eleva os custos, o que impossibilita sua utilização nos grandes centros de saúde, especialmente em países em desenvolvimento. Esta falta de especificidade está relacionada ao fato de os estudos utilizados como base para a confecção dos “kits” serem desenvolvidos em outros países, assim estes “kits” se propõem a fazer a determinação de variados tipos de HPV, inclusive daqueles que não são recorrentes na região a qual se destina o emprego dos mesmos. Outro fator que dificulta a implementação destes “kits” é a maquinaria necessária à leitura das reações, muitas vezes de alto custo, como é o caso dos citados acima.

2.9 Tratamento

As formas atuais de tratamento são direcionadas aos sintomas associados à presença do vírus e não ao HPV em si. As opções para o tratamento das lesões variam conforme a severidade da doença e da localização anatômica.

No caso das verrugas anogenitais preconiza-se, principalmente, a remoção das mesmas, o que possibilita períodos livres destas lesões. Algumas, inclusive, tendem a desaparecer, mesmo sem tratamento, e podem também aumentar em tamanho ou número. Ainda não é possível definir se o tratamento das verrugas anogenitais afetam a transmissão genital do HPV. Além da remoção das lesões, outros tratamentos são empregados, conforme o quadro apresentado pelo paciente, e podem variar desde cremes e loções aplicados pelo próprio paciente, até intervenções clínicas como a crioterapia, o emprego de ácido tricloroacético ou remoção cirúrgica (VPD, 2011).

Lesões pré cancerígenas podem ser tratadas com o procedimento de excisão eletrocirúrgica (LEEP), que remove o tecido anormal com uma alça aquecida por corrente elétrica; crioterapia, remoção do tecido à laser; ou conização, remoção de uma porção do tecido em formato de cone, contendo o tecido anormal.

O câncer cervical invasivo normalmente é tratado com cirurgia ou radiação (tanto interna quanto externa) combinada com quimioterapia. A quimioterapia

sozinha normalmente é utilizada no tratamento de doenças avançadas. Porém, é sugerida a complementação do tratamento com diferentes tipos de drogas, nos casos de metástase ou câncer cervical persistente (American Cancer Society).

Através de acompanhamento regular e apropriado é possível identificar e tratar a maior parte das lesões precursoras do câncer cervical, interrompendo a progressão para a doença invasiva.

Na maior parte dos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil, tanto as lesões precursoras quanto os quadros de câncer invasivo são diagnosticados com base apenas em exames histopatológicos, através de tecidos obtidos por biópsia ou excisão, os resultados obtidos são então utilizados como os principais parâmetros para o tratamento da paciente.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar do vasto conhecimento acerca do potencial de geração de alterações epiteliais, associado aos diferentes tipos de HPV, que podem, inclusive, culminar em câncer invasivo cervical, ainda se observa frequentemente sua participação no desenvolvimento desta enfermidade no cenário mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. Esta associação pode ser atribuída à parca definição da presença do vírus nas comunidades, nas quais ainda são rastreadas lesões já formadas e custosas à paciente e à sociedade; aos quase inexistentes programas de acompanhamento das pacientes e ao baixo nível de conhecimento da população em geral. A busca de melhoria deste panorama fica atrelada, então, às diversas formas de prevenção, mais recentemente atribuídas às imunizações por vacinação; além de se apoiar em técnicas de detecção, que devem ser mais eficazes e precisas, mas que ainda valem-se, quase que totalmente, de exames cito-histopatológicos.

Desta forma, existe grande preocupação em torno do aperfeiçoamento dos métodos de detecção do HPV, razão pela qual a introdução de novas abordagens diagnósticas, tais como as moleculares, representa notável avanço. Devido aos resultados rápidos e precisos destas técnicas é provável que os laboratórios a utilizem como rotina de trabalho e também para a confirmação do diagnóstico realizado por outros métodos. A genotipagem do vírus ao longo dos últimos anos vem se tornando um componente importante na abordagem do câncer cervical. A busca por um método de genotipagem eficaz para o HPV tem sido motivo de muitas investigações, devido à sua importância e à grande contribuição no diagnóstico das infecções e melhor entendimento da relação do HPV no processo da patogênese do câncer, além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas tipo-específicas. O presente estudo buscou determinar a prevalência do HPV no Estado de Alagoas com o intuito tanto de caráter epidemiológico, quanto de culminar em uma proposta de método, eficiente e a baixo custo, capaz de promover a genotipagem do vírus e, conseqüentemente, contribuir para a redução da participação do HPV nos índices de lesões cervicais e câncer do colo do útero.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar as variantes moleculares de HPV, através do sequenciamento do gene *L1*, em Alagoas - Brasil, para estabelecer um “kit” de detecção com base na prevalência observada.

4.2 Objetivos específicos

- Traçar o perfil genético atual da população de HPV em mulheres do Estado de Alagoas;
- Determinar a ocorrência de tipos específicos de HPV em mulheres com lesões cervicais em Alagoas;
- Identificar as variações nucleotídicas nas sequências do gene *L1* de HPV alto risco por meio de sequenciamento;
- Associar a infecção por HPV a outras DSTs e sua contribuição no grau de oncogenicidade viral;
- Identificar cofatores, como início da atividade sexual, multiparidade, número de parceiros sexuais, DST prévia, uso de contraceptivos orais, fumo e etilismo, associados à infecção persistente por HPV alto risco;
- Identificar as sequências nucleotídicas, associadas aos principais tipos de HPV encontrados, a serem utilizadas no “kit” de detecção molecular;
- Estabelecer a estrutura do “kit” e seus componentes;
- Desenvolver e descrever o método de execução para o teste em estudo na detecção de DNA de HPV alto risco, definindo um método-padrão.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Seleção das participantes

As pacientes que participaram do estudo foram selecionadas entre aquelas que compareceram para atendimento ginecológico regular no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA), Posto de Atendimento Médico do Salgadinho (PAM Salgadinho), Unidade de Saúde Hamilton Falcão e Unidade de Saúde João Paulo II, todas situadas na cidade de Maceió, no Estado de Alagoas, Brasil; no período de março de 2012 a dezembro de 2014.

5.1.1 Critérios de Inclusão

- a) Amostras de mulheres sexualmente ativas.
- b) Assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pela participante.
- c) Mulheres que possuíam útero com colo presente.
- d) Alterações na região cervical, principalmente sugestiva de HPV.

5.1.2 Critérios de Exclusão

- a) Amostras de mulheres que se declararam sexualmente inativas.
- b) Foram excluídas da análise amostras com falhas na reação de controle interno para amplificação da globina humana ou que apresentaram baixa eficiência durante a análise do DNA total, antes da amplificação do material.
- c) Mulheres que fizeram uso de medicações via vaginal nos dois dias precedentes ao da coleta da amostra cervical.

5.2 Identificação das pacientes e armazenamento de dados

A coleta de dados foi estabelecida conforme questionário de pesquisa clínica e as informações compiladas através de um banco de dados codificados e armazenados em planilha de Microsoft Excel, versão 2010.

Foram tomados para registro e identificação das pacientes, o nome completo, estado civil, profissão, idade, endereço, telefone, procedência e ocorrência dos fatores de risco que podem estar relacionados ao desenvolvimento da infecção por HPV e/ou carcinoma (Anexo A). Houve ainda, em uma parte das amostras, a inclusão dos resultados dos exames citológicos, histológicos e colposcópicos, obtidos por meio de revisão de prontuários.

5.3 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética da instituição (Anexo B), processo número 022997/2011-61. As pacientes autorizaram a doação do material biológico através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE (Anexo C).

5.4 Coleta das Amostras

Esfregaços cervicais foram coletados por profissionais da equipe médica, com o uso de escovas ginecológicas, introduzidos em microtubos contendo solução tampão (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) e em seguida foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica – GEMPRO.

5.5 Variáveis

a) Prevalência viral: foi determinada a presença do vírus HPV nas amostras cervicais através do emprego de iniciadores degenerados, por PCR, com posterior eletroforese em gel de agarose. O teste foi categorizado em negativo ou positivo para cada amostra avaliada.

b) Lesão em colo de útero por HPV: a presença ou não de lesão por HPV no momento da coleta das amostras, definida pelo resultado citológico, colposcópico e/ou histopatológico de biópsia de colo ou conização (*LEEP-Electrosurgical Excision Procedure*, ou seja, excisão eletrocirúrgica por alça)

foram utilizados em um percentual das amostras para comparação com os resultados moleculares e definição de sua sensibilidade. Foi considerado o diagnóstico mais grave e categorizado em:

- NIC1+: Neoplasia Intraepitelial de grau 1;
- NIC2+/ NIC3+: Neoplasia Intraepitelial de grau 2 ou 3;
- Câncer cervical
- Negativo: sem detecção de anormalidades histopatológicas.

5.5.1 Ensaio

a) Teste de referência: foi adotado o sequenciamento automático com *software* para genotipagem.

O teste foi categorizado em negativo ou positivo para os sete tipos de hrHPV (HPV de alto risco). Em casos selecionados e discordantes, o sequenciamento foi repetido para confirmação, inclusive nos casos de infecção mista.

b) Teste em estudo: “kit” molecular desenhado com o objetivo de detectar a presença do HPV e tipificar as amostras positivas em sete tipos de hrHPV, tipos 16, 18, 31, 33, 53, 58 e 66, em conjunto, pelo emprego de iniciadores com alvo nas regiões virais E6, E7 ou LCR. A técnica de eleição para identificação das amostras clínicas positivas foi o PCR multiplex com verificação por eletroforese em gel de agarose. O teste foi categorizado em negativo ou positivo para cada HPV detectado.

5.6 Procedimentos do Estudo

5.6.1 Controle de qualidade da avaliação de prevalência e do “kit” desenvolvido

a) Meio e temperatura de conservação das amostras – O material cervical coletado das pacientes foi mantido em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8), inicialmente a 4°C, porém, após extração de DNA, o volume sobressalente foi mantido a -20°C, assim como o DNA extraído.

b) PCR da β -globina - Para controle da extração do DNA foi amplificado um fragmento de 268pb do gene da β -globina humana por PCR convencional e leitura em gel de agarose. A positividade da detecção do gene da β -globina representa, indiretamente, a possibilidade de recuperação de material genético na amostra, selecionando, dessa forma, os espécimes adequados para serem submetidos à execução da pesquisa de DNA de HPV. A positividade do gene da β -globina ocorreu em todas as amostras avaliadas.

c) Quantificação de DNA - A concentração e pureza do DNA foi determinada em espectrofotômetro Jenway Genova (Dunmow, Essex CM63LB), por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260-280nm, e todas as amostras apresentaram a concentração esperada de 5-50ng e pureza de 1,80.

d) Avaliação do DNA total – todas as amostras foram avaliadas, após extração do DNA e previamente à amplificação do DNA viral, com relação ao DNA total, por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Aquelas que se apresentaram negativas ou cuja banda, referente ao DNA, mostrou-se irregular foram descartadas.

Em todos os ensaios foram incluídos controles negativos contendo material sabidamente negativo para o DNA viral, para monitoramento de possíveis contaminações, bem como controles positivos, com DNA obtido de amostras previamente conhecidas.

As amostras foram testadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2% ou 2%, corado com brometo de etídio 1 μ g/ml para análise.

5.7 Isolamento do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada conforme a metodologia do “kit” Illustra (Asmersham Biosciences) descrita abaixo:

Em tubo de 1,5mL foi adicionado 500 μ L de solução de extração e 300 μ L do esfregaço cervical, o material foi agitado e, em seguida, mantido em repouso por dez minutos. A mistura foi transferida para a coluna do “kit”, centrifugada a

8.000 rpm por um minuto e o volume restante foi desprezado. Foi adicionado na mesma coluna 500µL de solução de extração, centrifugada a 8.000 rpm por um minuto e o volume restante foi desprezado. À mesma coluna foi adicionado 500µL de solução de lavagem, centrifugada a 13.000 rpm por três minutos e o volume restante foi desprezado. O DNA foi ressuspensão em 80µL de tampão pré-aquecido (70°C), incubado por um minuto e, por fim, centrifugado a 13.000 rpm por três minutos. O armazenamento foi feito por congelamento a -20°C.

A concentração do DNA de cada amostra foi estimada através de um espectrofotômetro (Genova). A qualidade do DNA presente na amostra também foi determinada pela corrida do DNA total, utilizando-se eletroforese em gel.

5.8 Amplificação do gene da globina e detecção do DNA Viral - HPV

A primeira amplificação para comprovação da presença do papilomavírus humano foi de uma região de aproximadamente 450pb do DNA viral (gene L1), utilizando os iniciadores degenerados MY09 e MY11, indicados na tabela 3. Neste primeiro momento, o tipo viral não foi determinado. A co-amplificação por PCR do gene humano β- globina (controle positivo, aproximadamente 268 pb) possibilitou o controle de qualidade da amostra, ao determinar a presença de células humanas, assim, as amostras que não amplificaram o gene da globina foram excluídas. Foram utilizados, como controle positivo, dois iniciadores: GH20 e PC04, indicados na tabela 4. Além disso, um controle negativo (amostra sem o HPV), também foi empregado.

Tabela 4. Iniciadores utilizados para detecção do gene da globina e do HPV			
Sistema	Sequências Nucleotídicas	Região do Genoma Viral	Fragmento Amplificado
GH20 PC04	5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3' 5'CAACTTCATCCACGTTACCC3'	-	268pb
Geral A (MY09) Geral B (MY11)	5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3' 5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3'	L1	450pb

As concentrações do conjunto de reagentes empregados (“mix”) para a amplificação do DNA viral e da globina humana, bem como os programas de amplificação estão discriminados abaixo:

“Mix” para PCR – sistema MY09/11

- ❖ 1 μ M de cada primer
- ❖ 0,2 mM de DNTP
- ❖ 3mM de MgCl₂
- ❖ 20Mm de tampão
- ❖ 1U de Taq DNA polimerase
- ❖ 40 ng de DNA

Programa no termociclador MJ Research PTC-100 (sistema MY09/11):

- ❖ 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
30 ciclos de:
 - ❖ 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
 - 55°C durante 60 segundos para o emparelhamento;
 - 72°C durante 60 segundos para que ocorra a extensão;
- ❖ 72°C durante 10 minutos para que ocorra a extensão final
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

“Mix” para PCR – sistema GH20/PC04

- ❖ 1 μ M de cada primer
- ❖ 0,2 mM de DNTP
- ❖ 3mM de MgCl₂
- ❖ 20Mm de tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)
- ❖ 1U de Taq DNA polimerase
- ❖ 40 ng de DNA

Programa no termociclador MJ Research PTC-100 (sistema GH20/PC04):

- ❖ 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
30 ciclos de:

- ❖ 90°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
- 54°C durante 60 segundos para o emparelhamento;
- 72°C durante 60 segundos para que ocorra a extensão;
- ❖ 72°C durante 10 minutos para que ocorra a extensão final
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

5.9 Amplificação do DNA Viral – Herpes vírus Humano (HSV)

Uma vez que dados da literatura associam uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer cervical com a coinfeção entre HPV e HSV a presença do Herpes vírus Humano (HSV), foi avaliada. Desta forma, foi feita a amplificação de uma região de aproximadamente 142 pb do DNA viral alvo, utilizando-se os oligonucleotídeos 1A e 1B, direcionados para o tipo viral HSV-1; e uma amplificação do fragmento de aproximadamente 270 pb também foi estabelecida utilizando-se os oligonucleotídeos 2A e 2B, direcionados para o tipo viral HSV-2, estabelecidos na tabela 5. A utilização de controles positivos pela co-amplificação por PCR do gene humano β - globina (aproximadamente 268 pb) através do iniciadores dispostos na tabela 3 e de amostras conhecidamente positivas para os vírus, bem como de um controle negativo, DNA humano sem HSV, também foram empregados.

“Mix” para PCR – sistemas 1A/1B e 2A/2B

- ❖ 1 μ M de cada primer
- ❖ 0,2 mM de DNTP
- ❖ 3mM de MgCl₂
- ❖ 20Mm de tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)
- ❖ 1U de Taq DNA polimerase
- ❖ 40 ng de DNA

Programa no termociclador MJ Research PTC-100:

- ❖ 50°C por 2 minutos;
 - ❖ 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 5 minutos;
- 40 ciclos de:

- 94°C durante 60 segundos para o emparelhamento;
- 58°C durante 45 segundos para o anelamento;
- 72°C durante 30 segundos para a extensão;
- ❖ 72°C durante 10 minutos para que ocorra a extensão final;
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Tabela 5. Conjunto de iniciadores utilizados para detecção do HSV		
Sistema	Sequências Nucleotídicas	Fragmento Amplificado
1A 1B	5'CCCTGTCTCGCGGAGCCAC3' 5'TCAGCCACCCATACGCGTAA3'	142 pb
2A 2B	5'GGACGAGGCGCCAAAGCAC3' 5'TCCGTCCAGTCGTTTATCTT3'	270 pb

5.10 Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese

Após a amplificação do material genético viral, as amostras foram submetidas à eletroforese a 4V/cm, em gel de agarose (1,2%) tratado com brometo de etídio (5%). Ao produto da PCR foram adicionados 2µl de corante azul de bromofenol (Sigma). Em cada canaleta do gel, foram aplicados 10µl do produto amplificado, padrão de peso molecular (50 ou 100 pb) e controles (positivo e negativo) da reação de PCR.

5.10.1 Visualização e Armazenamento das sequências amplificadas

As sequências amplificadas, presentes nos géis de agarose, indicaram a presença do DNA viral, foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (U.V.) e analisadas pela comparação visual dos fragmentos de DNA obtidos com o padrão de peso molecular.

Todos os géis foram fotografados pelo sistema de captura de imagem digital (LPIX – Loccus Biotecnologia) e gravados eletronicamente para arquivo.

5.11 Sequenciamento automático de DNA

Os produtos de PCR de tamanho esperado foram automaticamente sequenciados no sequenciador Megabace System 500 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) usando o “kit” DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBACETM Amersham Pharmacia Biotech), foram realizados dois sequenciamentos individuais a partir das reações de PCR independentes. As amostras foram sequenciadas diretamente sem haver necessidade de clonagem.

5.12 Análise e edição das sequências

Para identificação do tipo viral, as sequências foram alinhadas e comparadas com outras utilizando a ferramenta Blastn no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). O “BioEdit Sequence Alignment Editor” (version 7.0.9.0) e o “Chromas” 2 (versão 2.33) foram utilizados para editar e analisar cada sequência. Para edição, a sequência de nucleotídeos de cada isolado foi comparada ao eletroferograma correspondente. Para identificação das alterações nucleotídicas as amostras de cada tipo viral foram alinhadas com uma sequência referência proveniente do GenBank (NCBI).

5.12.1 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada através do método “neighbour joining” utilizando o programa Mega 4.1 (Tamura et al. 2007).

5.13 Análise Estatística

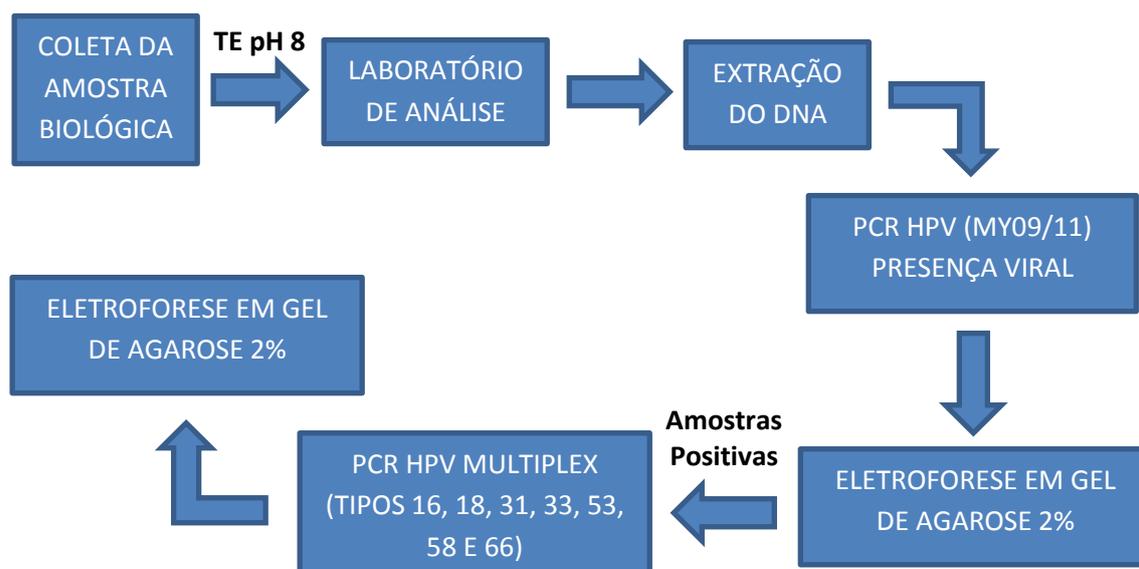
Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Biostat, versão 5.3. A análise dos Centros de saúde e dos cofatores abordados foi feita utilizando-se o teste χ^2 (qui-quadrado). A comparação dos cofatores com os tipos virais e a análise de significância dos tipos de HPV detectados foi determinada através do Teste G de tabelas de contingência. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.14 Desenvolvimento do “kit” de detecção de HPV

O presente “kit” refere-se a um método de detecção e tipificação *in vitro* de papilomavírus humano de alto risco oncogênico que possibilita tanto a detecção da presença viral de forma inespecífica, utilizando para isso os iniciadores degenerados citados anteriormente em 5.8, quanto a detecção específica dos HPV 16, 18, 31, 33, 53, 58 e 66. Foi estabelecida como técnica de eleição para a aplicação do “kit” a PCR multiplex de baixo custo, que pode ser empregada por qualquer laboratório clínico ou de biologia molecular.

Assim, o diagnóstico foi feito a partir da análise de amostras biológicas, por exemplo, cervicais, como o modelo apresentado neste estudo, e constituiu-se de duas etapas: na primeira foi estabelecida uma PCR, na qual os iniciadores universais para HPV (MY09 e MY11) foram empregados e, desta forma, a detecção da presença viral foi possível; e, na segunda etapa, com o conhecimento de quais amostras eram positivas para o HPV, foram utilizados iniciadores específicos, que possibilitaram a determinação genotípica do HPV, como demonstra o fluxograma a seguir, Fig. 10:

Figura 10. Fluxograma da utilização do “kit” de detecção e/ou tipificação de HPV de alto risco oncogênico desenvolvido.



5.14.1 Determinação dos iniciadores específicos

Com base nos dados obtidos pelo sequenciamento automático foi estabelecida a prevalência genotípica de HPV no Estado de Alagoas e iniciadores correspondentes aos tipos virais específicos, descritos na tabela 5, foram obtidos para posterior padronização do protocolo de detecção, através de PCR multiplex.

Inicialmente, as amostras conhecidamente positivas para os tipos de HPV encontrados, foram submetidas à PCR específica, isto é, a reação de PCR foi realizada individualmente para cada tipo de HPV, utilizando-se os pares de iniciadores abordados, com o intuito de se verificar a eficiência de detecção possibilitada por estes iniciadores.

Tabela 5. Conjunto de iniciadores utilizados para tipagem do HPV				
Nome do iniciador	Tipos	Sequências Nucleotídicas	Região do Genoma Viral	Fragmento Amplificado
16A	16	5'-GAAACCGGTTAGTATAAAAGCAGAC-3'	E6	476 pb
16B	16	5'-AGCTGGGTTTCTCTACGTGTTCT-3'		
18A	18	5'-TGGTGTATAGAGACAGTATACCCCA-3'	E6	247 pb
18B	18	5'-GCCTCTATAGTGCCCAGGTATGT-3'		
31A	31	5'-TGAACCGAAAACGGTTGGTA-3'	E6/E7	613 pb
31B	31	5'-CTCATCTGAGCTGTCCGGTA-3'		
33A	33	5'-TGTAACCGAAAGCGGTTCAA-3'	E7	562 pb
33B	33	5'- TAACGTTGGCTTGTGTCCTCTC-3'		
53A	53	5'- TGTGTGTATTTGTTGTCTGTGTTGT-3'	LCR	679 pb
53B	53	5'-CCTATTTCCGGTTACTCCCTGTC-3'		
58A	58	5'- TATCGTCTGCTGTTTCGTCC-3'	E7	968 pb
58B	58	5'- ACCGCTTCTACCTCAAACCA-3'		
66A	66	5'-TCATTTTACAAAACGGTTTACGG-3'	E6	697 pb
66B	66	5'-ATTGTAGGTCAATTTCCGTTTG-3'		

5.14.2 Genotipagem por PCR tipo-específica

Para a genotipagem por PCR, foram realizadas reações independentes para cada tipo de HPV, sendo pesquisados os tipos 16, 18, 31, 33, 53, 58 e 66.

As concentrações do conjunto de reagentes empregados (“mix”) para a amplificação do material genético dos diferentes tipos de HPV foram padronizadas como evidenciado abaixo.

Os programas de amplificação, utilizados para as reações de tipagem, foram padronizados segundo a temperatura ideal de anelamento de cada iniciador, conforme os programas indicados abaixo, e processados no termociclador MJ Research PTC-100. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (tratado com brometo de etídio) conforme descrito em 5.10.

“Mix” para PCR específica

- ❖ 1µM de cada primer específico para o tipo viral
- ❖ 0,2 mM de DNTP
- ❖ 3mM de MgCl₂
- ❖ 20Mm de tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)
- ❖ 1U de Taq DNA polimerase
- ❖ 40 ng de DNA

Programa de reação de PCR específica – HPV 16

- ❖ 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 60 segundos;
30 ciclos de
 - 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
- ❖ 55°C durante 2 minutos para o emparelhamento;
- ❖ 72°C durante 60 segundos para que ocorra a extensão;
- ❖ 72°C durante 10 minutos para que ocorra a extensão final
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Programa de reação de PCR específica – HPV 18

- ❖ 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 60 segundos;

30 ciclos de

- 90°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
- ❖ 58°C durante 2 minutos para o emparelhamento;
- ❖ 72°C durante 60 segundos para que ocorra a extensão;
- ❖ 72°C durante 10 minutos para que ocorra a extensão final
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Programa de reação de PCR específica – HPV 31

- ❖ 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 60 segundos;
- 30 ciclos de
- 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
 - ❖ 54°C durante 2 minutos para o emparelhamento;
 - ❖ 72°C durante 60 segundos para que ocorra a extensão;
 - ❖ 72°C durante 10 minutos para que ocorra a extensão final
 - ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Programa de reação de PCR específica – HPV 33

- ❖ 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 2 minutos;
- 35 ciclos de
- 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 15 segundos;
 - ❖ 63°C durante 30 segundos para o emparelhamento;
 - ❖ 72°C durante 45 segundos para que ocorra a extensão;
 - ❖ 72°C durante 7 minutos para que ocorra a extensão final
 - ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Programa de reação de PCR específica – HPV 53

- ❖ 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 30 segundos;
- 40 ciclos de
- 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 2 minutos;
 - ❖ 53°C durante 30 segundos para o emparelhamento;
 - ❖ 72°C durante 60 segundos para que ocorra a extensão;
 - ❖ 72°C durante 7 minutos para que ocorra a extensão final
 - ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Programa de reação de PCR específica – HPV 58

- ❖ 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 10 minutos;
35 ciclos de
- 94°C para realizar a desnaturação do DNA por 60 segundos;
- ❖ 57°C durante 30 segundos para o emparelhamento;
- ❖ 72°C durante 90 segundos para que ocorra a extensão;
- ❖ 72°C durante 8 minutos para que ocorra a extensão final
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

Programa de reação de PCR específica – HPV 66

- ❖ 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 5 minutos;
40 ciclos de
- 95°C para realizar a desnaturação do DNA por 60 segundos;
- ❖ 55°C durante 60 segundos para o emparelhamento;
- ❖ 72°C durante 2 minutos para que ocorra a extensão;
- ❖ 72°C durante 8 minutos para que ocorra a extensão final
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

5.14.2.1 Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese

Após a amplificação do material genético viral, as amostras foram submetidas à eletroforese a $4V.cm^{-1}$, em gel de agarose (2%) tratado com brometo de etídio (5%). Ao produto da PCR foram adicionados 2 μ l de corante azul de bromofenol (Sigma). Em cada canaleta do gel, foram aplicados 10 μ l do produto amplificado, padrão de peso molecular (50 ou 100 pb) e controles (positivo e negativo) da reação de PCR.

5.14.2.2 Visualização e Armazenamento das sequências amplificadas

As sequências amplificadas, presentes nos géis de agarose, indicaram a presença do DNA viral e foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta

(U.V.), e analisadas pela comparação visual dos fragmentos de DNA obtidos com o padrão de peso molecular.

Todos os géis foram fotografados pelo sistema de captura de imagem digital (LPIX – Loccus Biotecnologia) e gravados eletronicamente para arquivo.

5.14.3 Genotipagem por PCR multiplex

Após a determinação da presença viral por PCR convencional, através dos iniciadores consenso MY09 e MY11 e da análise das amostras positivas por PCR do tipo específica, as mesmas foram avaliadas por PCR multiplex, na qual os mesmos iniciadores específicos para os HPV 16, 18, 31, 33, 53, 58 e 66, descritos anteriormente, foram testados, porém, em um mesmo “mix”.

As condições, que devem ser preferencialmente utilizadas, para as reações de amplificação do material genético presente nas amostras biológicas devem ser observadas para o “mix” e para a execução da técnica.

O “mix” de PCR multiplex que compõe o “kit” de detecção, assim como o programa que deve ser utilizado, estão descritos a seguir:

“Mix” para PCR multiplex

- ❖ 1µM de cada primer específico para o tipo viral
- ❖ 0,2 mM de DNTP
- ❖ 3mM de MgCl₂
- ❖ 20mM de tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)
- ❖ 1U de Taq DNA polimerase
- ❖ 40 ng de DNA

Protocolo de reação de PCR multiplex

- ❖ 94°C por 15 minutos;
 - 8 ciclos de queda de temperatura (“touchdown cycles”)/ 1°C de redução de temperatura de anelamento para cada ciclo
- 65°C por 90 segundos (a partir do 7º ciclo – 1°C/ciclo);
- 95°C por 30 segundos;
- ❖ 72°C durante 45 segundos;

22 ciclos de

- 95°C por 30 segundos;
- ❖ 57°C durante 90 segundos;
- ❖ 72°C durante 45 segundos;
- ❖ 68°C durante 15 minutos;
- ❖ 04°C pós-reação por tempo indefinido e/ou para estoque.

5.14.3.1 Determinação da amplificação do DNA viral através de Gel de Eletroforese

Após a amplificação do material genético viral, as amostras foram submetidas à eletroforese a $4V.cm^{-1}$, em gel de agarose (2%) tratado com brometo de etídio (5%). Ao produto da PCR foram adicionados 2 μ l de corante azul de bromofenol (Sigma). Em cada canaleta do gel, foram aplicados 10 μ l do produto amplificado, padrão de peso molecular (50 ou 100 pb) e controles (positivo e negativo) da reação de PCR.

5.14.3.2 Visualização e Armazenamento das sequências amplificadas

As sequências amplificadas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (U.V.), e analisadas pela comparação visual dos fragmentos de DNA obtidos com o padrão de peso molecular. Todos os géis foram fotografados pelo sistema de captura de imagem digital (LPIX – Loccus Biotecnologia) e gravados eletronicamente para arquivo.

5.15 Estrutura e composição do “kit” proposto

A estrutura do “kit” foi estabelecida tendo como objetivo o baixo custo e a praticidade, desta forma, o mesmo é composto de dois microtubos que contêm as soluções correspondentes ao “mix” utilizado para a PCR convencional, com os iniciadores universais, e outro que contêm os reagentes para a PCR multiplex, com os iniciadores específicos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

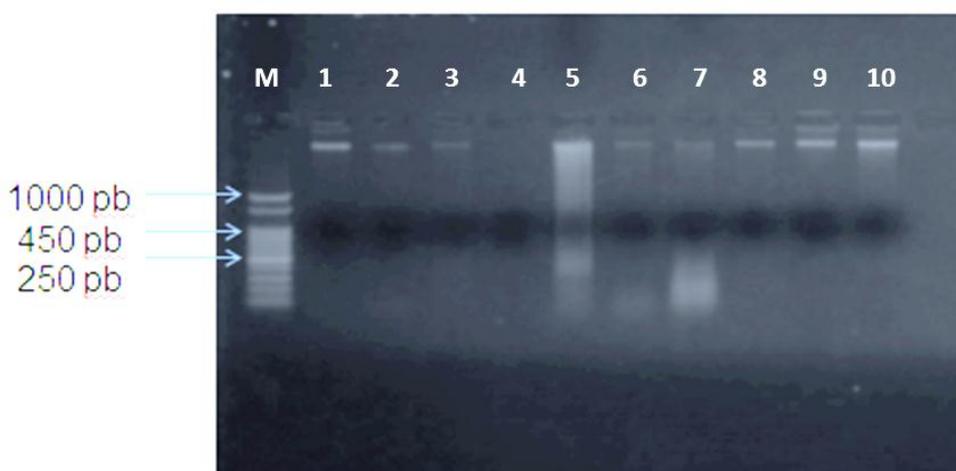
6.1 Obtenção das amostras para estudo

Foram selecionadas 767 pacientes atendidas nos Centros de saúde Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA), Posto de Atendimento Médico do Salgadinho (PAM Salgadinho), Unidade de Saúde Hamilton Falcão e Unidade de Saúde João Paulo II. Todas atenderam aos critérios de inclusão determinados, foram orientadas em relação ao estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

6.2 Análise qualitativa do material genético extraído

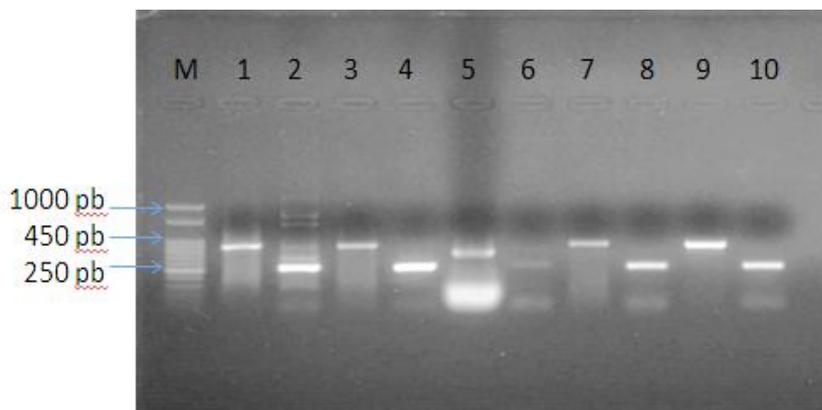
As amostras provenientes das coletas, após serem encaminhadas ao GEMPRO, foram avaliadas em relação aos critérios de qualidade do material, conforme estabelecido na metodologia, sendo assim, 10 amostras foram excluídas por: não apresentarem o grau de pureza ideal ou por seu DNA total não ter sido detectado por eletroforese em gel, após a extração do material genético, como fica exemplificado na figura 11, na qual a banda relacionada ao DNA total da amostra 4 não pode ser visualizada.

Figura 11. DNA total de alto peso molecular (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10); amostra com falha na extração (4) e amostra com DNA degradado (5) em gel de agarose 1,2%. M: marcador molecular.



Desta forma, 757 amostras foram consideradas para a obtenção dos dados sóciodemográficos e comportamentais das pacientes, bem como foram analisadas, a princípio, através de PCR convencional – utilizando-se os iniciadores consenso MY09 e MY11 – pelo qual se obteve fragmentos de 450 pb, correspondentes à região L1 do HPV, visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,2%). As amostras foram ainda avaliadas em relação à presença do gene β -globina humana, indicada pela observação de fragmentos de 268 pb. Todos os espécimes foram positivos para o referido teste, como indica a fig. 12.

Figura 12. Detecção do DNA do HPV de amostras clínicas selecionadas e amplificadas com os iniciadores MY09 E MY11, banda de 450 pb (amostras ímpares) em gel de agarose (1,2%). DNA da globina humana, banda de 268 pb (amostras pares), controles. M: marcador molecular.



6.3 Determinação das amostras positivas por PCR convencional

Após a extração do DNA genômico foi feita a amplificação do material genético viral, o que possibilitou a determinação das amostras positivas para o papilomavírus humano. Os resultados obtidos por PCR demonstraram que das 757 amostras avaliadas, 123 foram positivas para HPV, o que gerou um percentual de aproximadamente 16,3% das amostras, distribuídas conforme indicado na tabela 7. Houve diferença significativa tanto em relação à distribuição do número de amostras, quanto à prevalência das amostras positivas para HPV, entre os Centros de saúde, em ambos os casos $p < 0,0001$. Esse resultado, junto às variáveis analisadas em ambos os grupos, sugere que as populações atendidas pelos Centros de Saúde e pelo Hospital Universitário possuem características sociodemográficas e comportamentais similares. É interessante destacar que nos

Centros de saúde HUPAA e PAM Salgado foi observado um maior número de amostras, tanto de forma geral quanto em relação às positivas. Assim, caso apenas as amostras destes Centros fossem consideradas haveria 19,9% de positividade para HPV. Estes números podem estar relacionados a alguns fatores que limitam e dificultam a determinação da infecção pelo vírus, como o estágio de produção das partículas virais, e sua consequente liberação epitelial, e a forma de coleta, que pode não ter abrangido a região cervical o suficiente para capturar as células infectadas pelo vírus.

Tabela 7. Distribuição das pacientes avaliadas por Centros de saúde e por número de amostras positivas para HPV.

LOCAL	Nº AMOSTRAS (%)	Nº POSITIVAS (%)
PAM Salgado	469 (61,9%)	92 (75%)
Hospital Universitário (HUPAA)	79 (10,5%)	17 (13,6%)
Unid. Saúde João Paulo II	65 (8,6%)	5 (4,1%)
Centro de Saúde Dr. Hamilton Falcão	144 (19%)	9 (7,3%)
TOTAL	757	123 (16,3%)

Amostras analisadas por χ^2 , $p < 0,0001$.

Observando-se o trabalho desenvolvido por Soares et al. (2003), há mais de dez anos, também direcionado ao Estado de Alagoas, pode-se dizer que houve uma diminuição da prevalência do HPV uma vez que, de 341 amostras analisadas pelo grupo, 91 (26,6%) foram diagnosticadas com o vírus. Porém, em novos estudos, Gurgel et al. (2015) apontaram que em um total de 206 amostras, coletadas randomicamente em Unidades de Saúde do Estado de Sergipe e Alagoas, entre novembro de 2010 e julho de 2011, de mulheres que apresentaram alterações cervicais (de alto ou baixo grau) foi determinada prevalência de 121 amostras positivas para HPV (59%). É importante ressaltar, contudo, tanto a natureza das amostras, a partir de cérvices que apresentavam alterações, quanto a falta de determinação precisa das amostras, uma vez que variações entre os dois Estados podem estar presentes e não foram destacadas no estudo.

Alterações citológicas normalmente são associadas a uma maior prevalência de casos de HPV. Estudos de Nunes et al. (2014) demonstraram este dado ao analisarem 97 amostras coletadas de mulheres na faixa etária dos 14 aos 79 anos, residentes na cidade de São Luís, do Estado do Maranhão. Todas as amostras foram obtidas de mulheres com alterações cervicais, determinadas por exames citológicos, constatou-se então uma prevalência de 80,4% de amostras positivas para HPV.

Observando de uma forma geral, Bruni et al. (2010) apontaram que o HPV sexualmente transmitido tem uma prevalência em torno de 11,7%, na população feminina sexualmente ativa. Porém, variáveis vinculadas a países e regiões, pela influência de diferentes fatores, devem ser averiguadas.

Um percentual próximo ao observado no estudo aqui elucidado é definido por Oliveira et al. (2013), os mesmos demonstraram que das 302 mulheres analisadas, o HPV foi detectado em 55 (18,2%). Assim como por Coser et al. (2016), ao definirem que, das 300 mulheres analisadas, 47 (15,7%) foram diagnosticadas com HPV, ambos os estudos conduzidos no Sul do Brasil.

Ayres e Silva (2010) também apontaram que este é um valor comumente associado à população feminina positiva para HPV no Brasil, quando testes moleculares são considerados. Segundo o que foi averiguado pelo grupo através da análise de artigos brasileiros publicados no período de 1989 e 2008, a prevalência geral de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil variou entre 13,7% e 54,3%, e para as mulheres com citologia normal, variou entre 10,4% e 24,5%.

Esta variação, com possibilidade de alta prevalência, é corroborada por Carestiato et al. (2006) que definiram a prevalência de 41,1% de mulheres positivas para HPV, em um universo de 5.833 amostras, na cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro.

Rodrigues, et al. (2014) concluíram que das 85 mulheres, residentes na aldeia indígena Nãncepotiti, no Paraná, houve uma prevalência de 28,6% para o HPV, das quais 58,3% foram associadas com HPV de alto risco, o que indica a necessidade de ação junto a grupos específicos e de maior fragilidade social.

Em outras regiões do mundo essa variação também é observada e é constantemente associada às diferenças socioeconômicas enfrentadas pela

população. O estudo desenvolvido por Catarino et al. (2016) demonstrou, por exemplo, a ocorrência de 39% de prevalência do vírus em Camarões, África, e ainda que este índice pode variar de forma expressiva entre diferentes países daquele continente, como é o caso da prevalência de 10,5% na Nigéria, em comparação aos 47,9% na Guiné.

6.4 Características sociodemográficas e comportamentais

Os cofatores abordados no questionário, respondido pelas pacientes, foram avaliados em função de toda a população analisada e em função das amostras consideradas positivas para o HPV.

6.4.1 Idade em anos completos

A média de idade dentre as 757 pacientes avaliadas foi de 36 anos, com margem de erro de 0,95 anos. Houve predominância da faixa etária de 21 a 40 anos, com representação de 362 mulheres (47,8%); já em 265 casos (35%) as pacientes apresentaram mais de 40 anos e 110 delas (14,5%) menos de 21 anos; 20 mulheres (2,6%) não informaram a idade, conforme demonstrado no gráfico 1.

A relação entre as idades das pacientes e a positividade para o HPV foi significativa, ($p=0,0074$). Isto pode ser compreendido pelo fato de o estabelecimento da infecção por HPV estar associado à interação entre o vírus e o hospedeiro por um tempo mais prolongado. Desta forma, pode-se observar que em mulheres mais jovens a resolução da infecção é mais frequente, e os sintomas relacionados ao HPV, como o desenvolvimento de lesões, não é tão intenso. Assim, a investigação para a presença do HPV é normalmente direcionada às mulheres com mais de 29 anos, com o intuito de se evitar intervenções desnecessárias. As mulheres em uma faixa etária mais avançada apresentariam uma maior probabilidade de expressão das partículas virais e, conseqüentemente, das possíveis alterações vinculadas à interferência do material genético viral nas células epiteliais, que podem levar à modificação do padrão de expressão de proteínas de superfície celular. Esta relação fica evidenciada no presente estudo, pois, quando apenas as mulheres positivas para

o HPV foram analisadas ficou demonstrado que a maior parte delas, isto é, 51 (41,4%) apresentou de 21 a 40 anos; 38 (30,9%) tinham 41 anos ou mais; 30 (24,4%) possuíam menos de 20 anos e 4 (3,3%) não responderam a este quesito, como demonstrado no gráfico 2. O que corrobora a maior ligação da infecção com mulheres adultas jovens de forma significativa, uma vez que foi observado $p < 0,0001$.

A faixa etária dos 21 aos 40 anos de idade também pode ser destacada no trabalho de Coser et al. (2016), que estabeleceram que 30% das pacientes HPV, positivas analisadas pelo grupo, estavam contidas neste intervalo. O mesmo foi evidenciado no trabalho de Gaspar, et al. (2016), realizado no Estado de São Paulo, onde 494 mulheres foram diagnosticadas com HPV, isto é, quase 60% das pacientes analisadas, todas incluídas nesta faixa etária.

É interessante destacar que alguns estudos, como o desenvolvido por Rebolj et al. (2015), têm proposto uma nova abordagem nesta triagem de mulheres positivas para HPV. Neles as mulheres mais jovens, com menos de 30 anos de idade, seriam investigadas para tipos específicos de HPV (como 16 e 18), detectados através da verificação da presença do mRNA viral e não do DNA. Porém, a comprovação da detecção de falsos positivos, apesar da utilização de diferentes metodologias, tanto visuais, quanto moleculares, leva à manutenção do que é proposto pela maior parte dos estudos na área, isto é, a faixa etária mais crítica de desenvolvimento de lesões por HPV ocorre a partir dos 30 anos.. Inclusive, apesar de reconhecer que a utilização de técnicas de diagnóstico, na referida faixa etária, aumentaria as probabilidades de proteção contra o câncer cervical, os próprios autores sugerem que a detecção e tratamento de lesões com tendência a serem curadas naturalmente prejudicariam as pacientes, física e psicologicamente.

Coelho et al. (2015) também demonstraram que as alterações citológicas relacionadas à presença do HPV são significativamente mais graves em mulheres adultas que em adolescentes, apesar de mais frequentes neste segundo grupo.

Segundo Balbi, et al. (2015), a análise de 213 mulheres, dos 35 aos 60 anos de idade, consideradas no período de climatério, classificado como de grandes mudanças hormonais e fisiológicas, revelou prevalência de 11,7% de HPV genital.

Alguns cofatores como este – a idade ou faixa etária de maior associação ao desenvolvimento de infecções por HPV – podem ser considerados controversos na literatura. Enquanto há uma correlação bem estabelecida por vários grupos de pesquisa, trabalhos como o de Devarakonda et al. (2014), que analisaram um grande número de mulheres (20 mil), apontaram que a idade em relação à positividade para o HPV pode variar, no caso do estudo citado não houve relação entre esses fatores, com exceção da faixa etária entre 46 e 59 anos de idade.

Gráfico 1. Proporção da IDADE das pacientes avaliadas

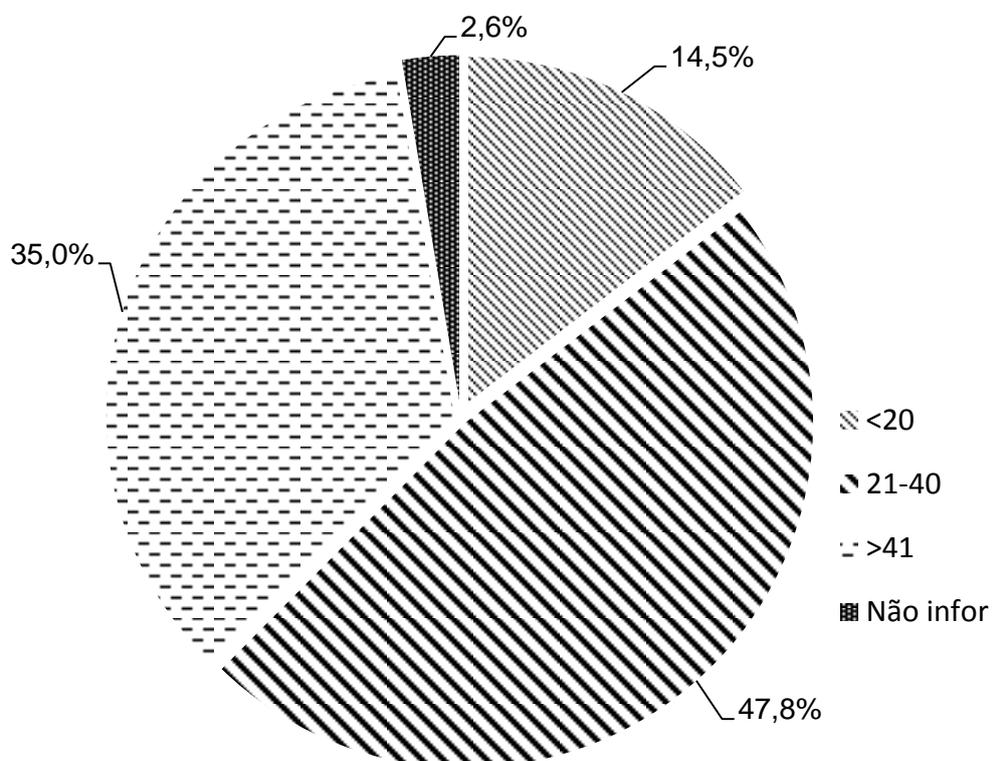
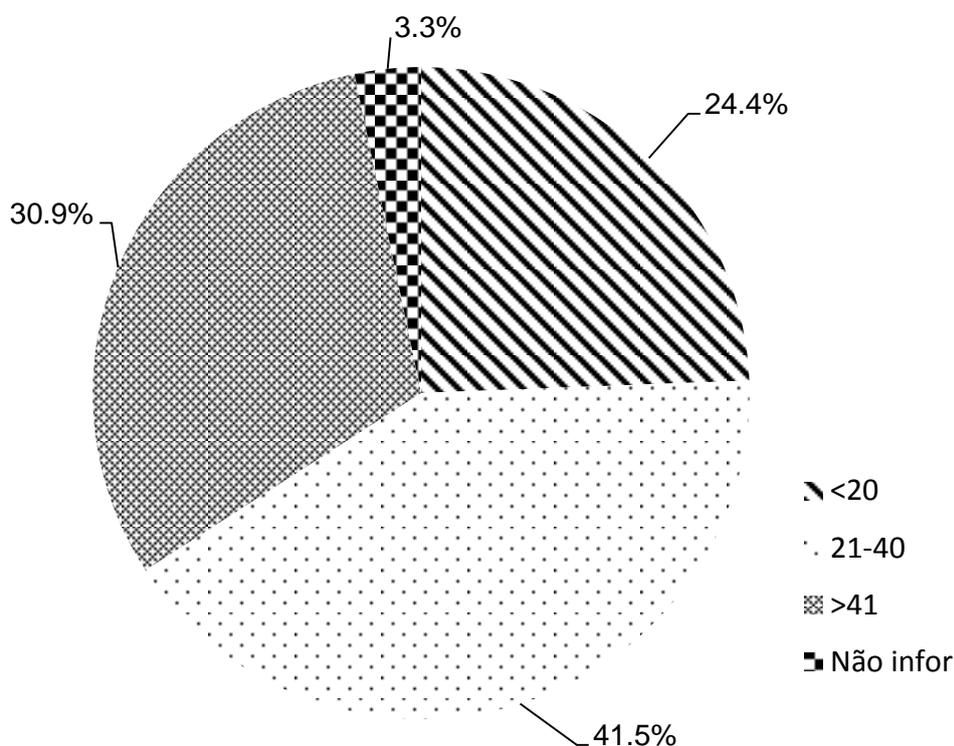


Gráfico 2. Proporção da IDADE das pacientes POSITIVAS PARA HPV



6.4.2 Menarca

Dentre as pacientes avaliadas, observou-se que 482 (63,7%) tiveram suas menarcas entre 12 e 14 anos de idade e 145 (19,2%) com menos de 11; o que significa dizer que a maior parte das mulheres avaliadas passou pela menarca até os 14 anos de idade, o equivalente a 627 delas (82,9%). Apenas 122 (16,1%) passaram pela menarca a partir dos 15 anos e oito (1,1%) não responderam, gráfico 3.

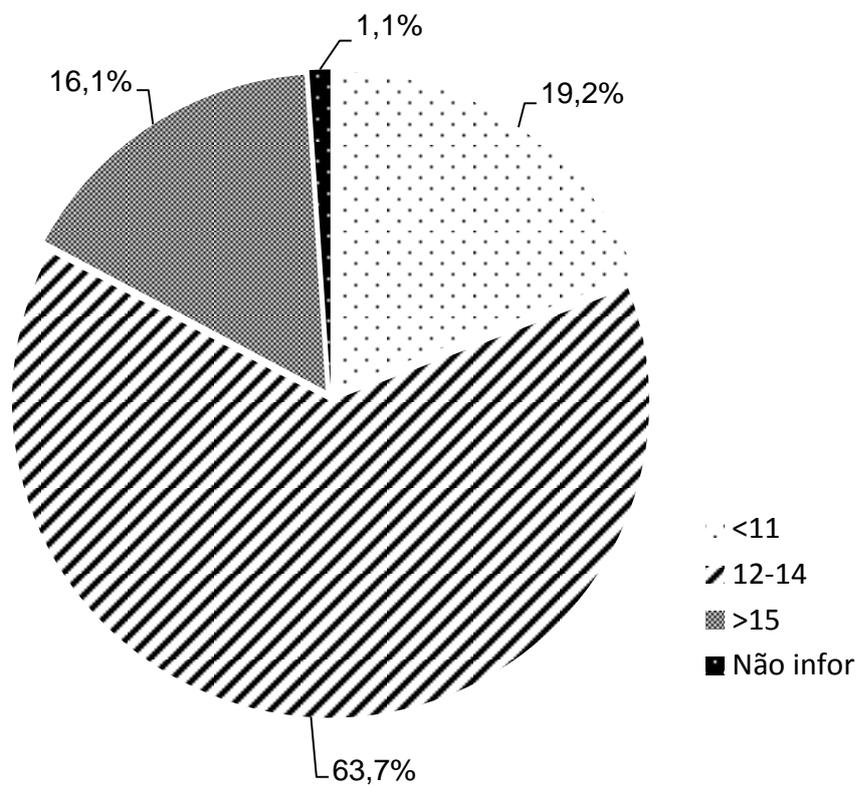
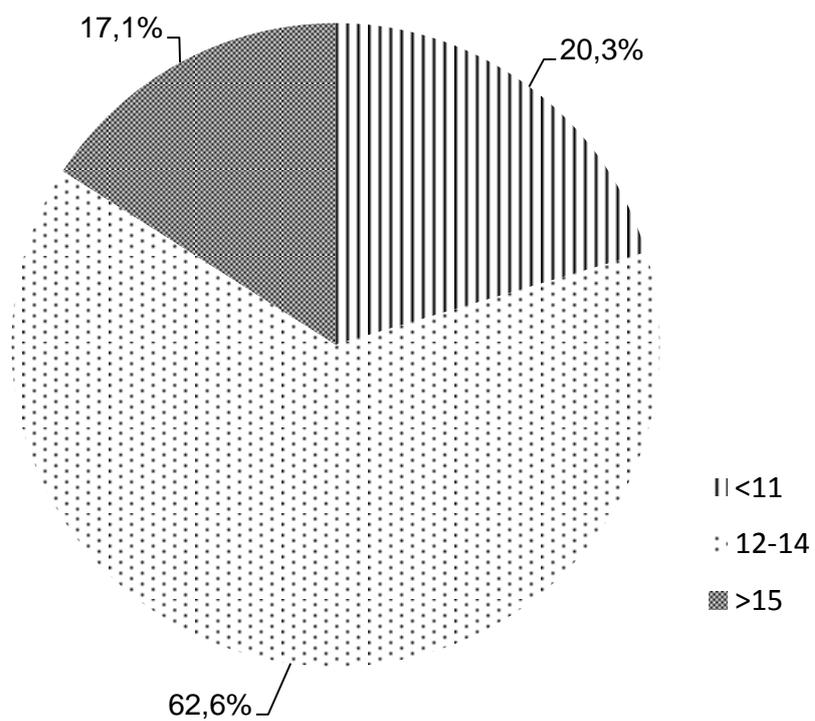
A relação entre a idade de menarca e a positividade das pacientes para HPV foi analisada, porém não foi significativa ($p=0,3841$). Apesar desta associação não ser estabelecida em toda a literatura ela é esperada e seria justificada pela possível variação no número de parceiros e, conseqüente, variação na possibilidade de contato com diferentes tipos virais. Isto porque o estabelecimento do ciclo menstrual pode ser associado com o início dos contatos sexuais entre as jovens em diversas regiões.

Verificou-se que dentre as pacientes diagnosticadas com HPV, houve predominância daquelas cuja menarca ocorreu entre os 12 e 14 anos, seguidas das que apresentaram a menarca até os 11 anos, com 77 (62,6%) e 25 pacientes (20,3%), respectivamente. As mulheres com menarca acima dos 15 anos de idade corresponderam a 21 do universo analisado (17,1%), gráfico 4. A relação entre as diferentes faixas etárias avaliadas, dentre as mulheres positivas, pode ser considerada significativa com $p < 0,0001$.

É interessante destacar que a menarca precoce, ou em mulheres mais jovens, como observado na maior parte das mulheres do presente trabalho, pode ser associada a um início também precoce da vida sexual, o que leva a uma maior chance de contato com o vírus. Além disso, as mudanças hormonais, relacionadas aos ciclos menstruais, também parecem contribuir para modificações, inclusive imunológicas. Este pode ser um estímulo suficiente para a indução ou aumento da carga viral no organismo feminino.

Assim, os dados estabelecidos corroboram observações de outros estudos que demonstram a relação entre a menarca em idades jovens e a infecção por HPV, como o de Nascimento et al. (2012), que definem que todas as 34 amostras positivas para o vírus foram provenientes de mulheres que tiveram sua menarca até os 16 anos de idade.

Por outro lado, Mesquita Filho (2015) associa a idade de menarca mais tardia à coinfeção, ao analisar 1.590 mulheres, com idades entre 14 e 54 anos, para a presença de HPV, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Esta relação pode ser explicada por haver maior probabilidade de contato com diferentes patógenos conforme aumenta a idade da adolescente, desta forma, as mudanças fisiológicas inerentes à puberdade, associadas à presença de uma patologia prévia levariam ao aumento no número de casos de infecções, como descrito pelo grupo citado.

Gráfico 3. Proporção da MENARCA das pacientes por faixa etária**Gráfico 4. Proporção da idade de MENARCA das pacientes POSITIVAS PARA HPV**

6.4.3 Início das atividades sexuais (I.A.S.)

Pôde-se observar que, dentre as pacientes que participaram do estudo, mais da metade iniciou a vida sexual entre 15 e 18 anos, o equivalente a 398 mulheres (52,6%). A faixa etária dos 11 aos 14 anos correspondeu a 178 pacientes (23,5%) e 170 (22,5%) do total de pacientes alegou ter mais de 19 anos, em sua iniciação sexual. Houve ainda a identificação de seis pacientes (0,8%) que apresentavam 10 anos ou menos durante este período e cinco (0,7%) que não responderam, Gráf. 5. É interessante perceber que uma parte significativa das mulheres participantes do estudo passou por este processo no período de sua vida em que são consideradas menores, segundo a justiça brasileira. Fato este que pode ser associado a parâmetros sociais ou culturais, e que merece atenção no tocante ao processo educacional, com o objetivo principal de melhor orientação. Algumas das pacientes, inclusive, declararam terem sido abusadas sexualmente (dado não demonstrado), e atribuíram o início extremamente precoce de suas vidas sexuais a este fato.

Não foi constatada significância entre a idade de início da atividade sexual e a presença do HPV, ($p=0,209$). A influência deste cofator está relacionada à maior probabilidade de contato do indivíduo com o vírus, uma vez que a forma de transmissão mais recorrente é através das relações sexuais, devido ao contato direto entre a pele da pessoa contaminada e seu parceiro (ou parceira), especialmente na presença de microfissuras (SHAFTI-KERAMAT, et al. 2003).

Analisando-se as faixas etárias nas quais, as pacientes diagnosticadas para HPV, iniciaram as atividades sexuais, observou-se em 52 casos (42,3%) a faixa etária dos 15 aos 18 anos; em 47 (38,2%), a faixa dos 11 aos 14 anos; com mais de 19 anos em 20 casos (16,3%) e, ainda, quatro (3,3%) alegaram ter menos de 10 anos de idade durante o período, Gráf. 6. As faixas etárias entre as mulheres consideradas positivas para HPV apresentaram uma relação significativa entre si, com $p<0,0001$. Pode-se constatar a partir dos dados obtidos que mais de 80% das mulheres avaliadas iniciaram a vida sexual antes dos 19 anos de idade, portanto, nas fases de pré-adolescência e adolescência.

Segundo o que é apontado pela literatura, o início precoce das atividades sexuais levaria a uma maior chance de contato com o HPV, isto permite inferir

que é, justamente, no início da vida sexual que os indivíduos têm uma maior probabilidade de contágio. Porém, como a infecção normalmente é resolvida pelo sistema imune de pessoas saudáveis, o vírus permanece em sua forma episódica ou as lesões, quando formadas nesta fase pela replicação viral, tendem a desaparecer (FERNANDES, et al., 2013). A falta de orientação sexual, bem como a promiscuidade em relação ao número de parceiros, podem ser fatores associados ao início precoce da vida sexual, quando comparados ao início tardio, o que estabelece uma maior chance de contaminação, inclusive de diferentes tipos, pelo vírus HPV.

Além disso, durante a puberdade e a adolescência a cérvix não está completamente formada, isso porque a zona de transformação do epitélio cervical é mais proliferativa neste período, sendo assim mais susceptíveis a fatores de risco associados à neoplasia, como o HPV. Assim a ocorrência de atividade sexual antes dos 18 anos está diretamente ligada ao aumento do risco do câncer uterino (DUARTE et al, 2011).

O estudo desenvolvido por Jia et al (2015) corrobora esta tendência, uma vez que, dentre vários fatores sócio comportamentais e sexuais abordados, apenas o início precoce das relações sexuais foi apontado como significativo na influência do desenvolvimento de infecção por HPV.

Assim como Oliveira et al. (2013), que em um trabalho conduzido no Sul do Brasil apontam que 45 pacientes (20,8%) diagnosticadas com o HPV tiveram o início da atividade sexual com 17 anos ou menos, em uma população analisada de 302 mulheres. Outros fatores também foram significativos na análise.

Porém, no abrangente trabalho desenvolvido por Devarakonda et al. (2014), que analisou 20 mil mulheres nos Estados Unidos, a idade do início das atividades sexuais não foi significativa. Assim como entre as 300 pacientes analisadas por Coser et al. (2016) no Sul do Brasil.

O estudo conduzido por Catarino et al. (2016), com 731 mulheres camaronesas, demonstrou que quanto mais tarde o início das atividades sexuais maior a chance de infecções pelo HPV de alto risco oncogênico, porém, também não consideraram significativa a relação deste fator com a positividade para HPV.

Gráfico 5. Proporção do I.A.S. das pacientes avaliadas

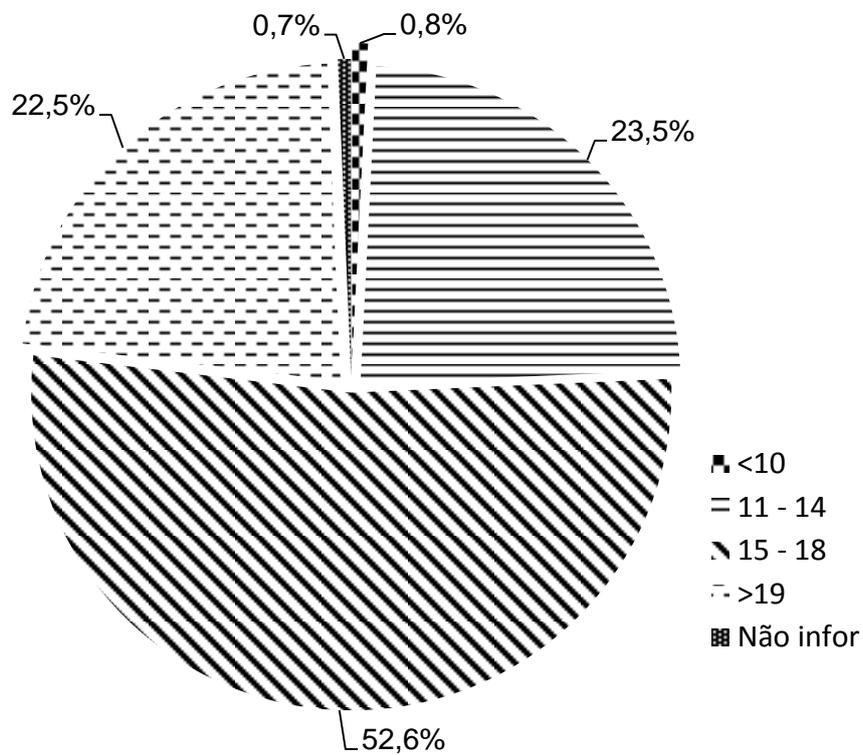
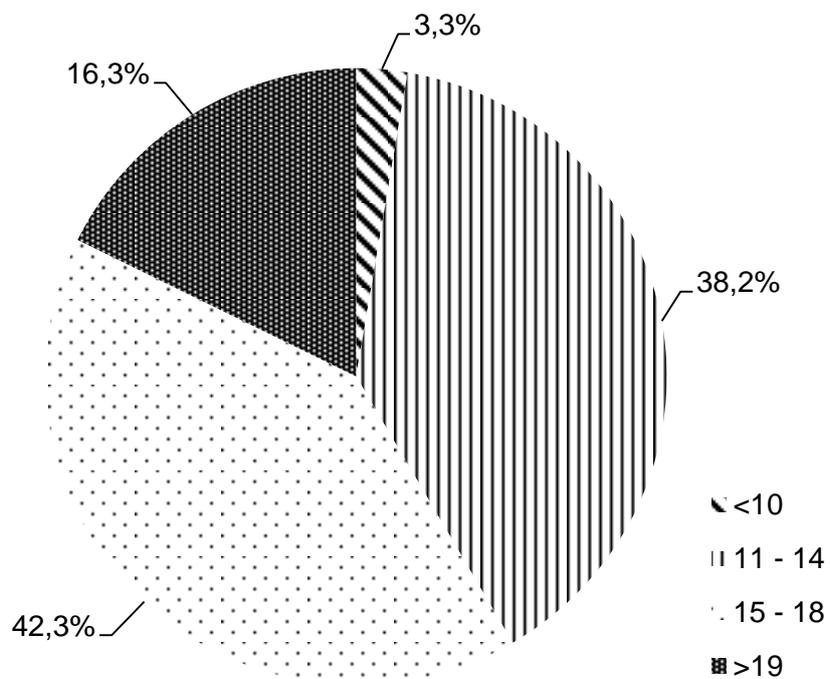


Gráfico 6. Proporção do I.A.S. das pacientes POSITIVAS PARA HPV



6.4.4 Número de parceiros

Houve predominância de pacientes que declararam ter mantido relações sexuais com até três parceiros, 464 delas (61,3%); enquanto em 196 dos casos (25,9%) o número de parceiros foi de 4 a 7; houve ainda as que declararam ter estado com mais de oito indivíduos, 68 no total (9%); a informação não foi fornecida por 28 mulheres (3,7%), gráfico 7.

As análises estatísticas revelaram significância entre o número de parceiros declarados pelas pacientes e a presença viral, ($p=0,0476$). Este é um resultado esperado e que apresenta um significado direto, uma vez que comportamentos de ordem sexual podem interferir na probabilidade de infecções pelo HPV.

Quando o diagnóstico para HPV foi considerado, e apenas o grupo das mulheres positivas foi observado, houve predominância daquelas que alegaram ter mantido relações sexuais com um menor número de parceiros, ao contrário do que é indicado na literatura. Assim 68 mulheres (55,3%) indicaram ter mantido relações com até 3 parceiros; em seguida são observados 35 casos (28,5%) de mulheres com 4 a 7 parceiros; e 18 das pacientes positivas para o vírus (14,6%) tiveram oito parceiros ou mais; o número não foi informado por duas mulheres (1,6%), gráf. 8. As relações neste grupo de mulheres positivas para o HPV podem ser consideradas significativas, com $p<0,0001$.

Pode-se observar na literatura dados inversos ao encontrado no presente trabalho, isto é, a multiplicidade de parceiros estaria associada a uma maior frequência de mulheres positivas para o HPV. Esta associação pode ser explicada pelo fato da multiplicidade levar a uma maior possibilidade de contato com o vírus. Além disso, mais episódios de contato permitiriam infecções recorrentes com diferentes tipos de HPV e poderiam conduzir a quadros crônicos, com geração de lesões e, caso este contato fosse prolongado ou associado a outros fatores, até mesmo o desenvolvimento de carcinoma.

Isto fica claro, por exemplo, no estudo proposto por Jia et al (2015), no qual foi feita uma abordagem comparando-se mulheres que trabalhavam como profissionais do sexo, portanto se relacionavam com muitos parceiros, e aquelas que não tinham esta atividade. Neste caso foi observada uma predominância de

61,9% de mulheres infectadas por HPV, dentre àquelas que tinham o sexo como atividade profissional, contra 21% em relação àquelas que não.

Diferenças muito expressivas também puderam ser observadas em alguns trabalhos, Devarakonda et al. (2014), por exemplo, determinou que a infecção por HPV dentre as mulheres que tiveram mais de 11 parceiros foi 3,7 vezes maior do que aquelas que tiveram nenhum ou um parceiro.

Porém, outras questões devem ser debatidas, como definições culturais e comportamentais de diferentes ordens, no presente caso o contato com poucos parceiros pode ter raízes no enlace, matrimonial ou não, precoce. Isto, contudo, pode levar a associação de monogamia por parte apenas da mulher, cenário frequentemente observado em sociedades de forte cunho patriarcal. Tanto este contexto, quanto a falsa sensação de segurança, devido ao relacionamento, pode levar a relações sexuais sem a adoção de medidas de proteção e, conseqüentemente, a uma maior probabilidade de contato do indivíduo com um parceiro (ou parceira) contaminado. Outra possibilidade que deve ser aventada é o desconforto gerado pelo questionário, o que pode levar a paciente a esconder o número exato de parceiros, especialmente no modelo de sociedade já citado.

Gráfico 7. Proporção do Nº de PARCEIROS das pacientes avaliadas

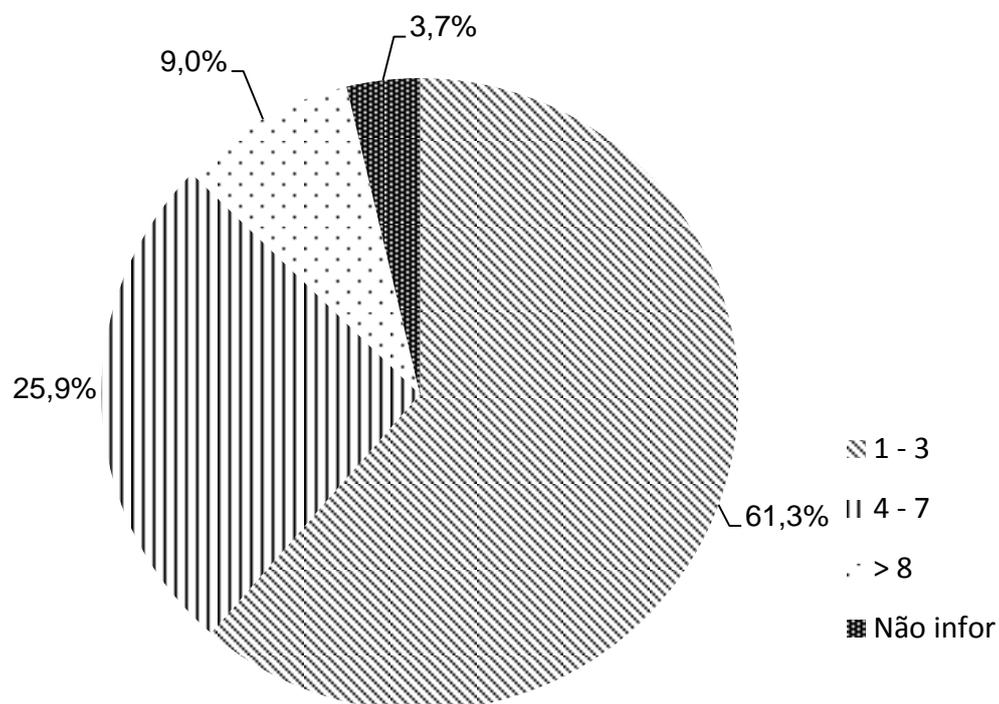
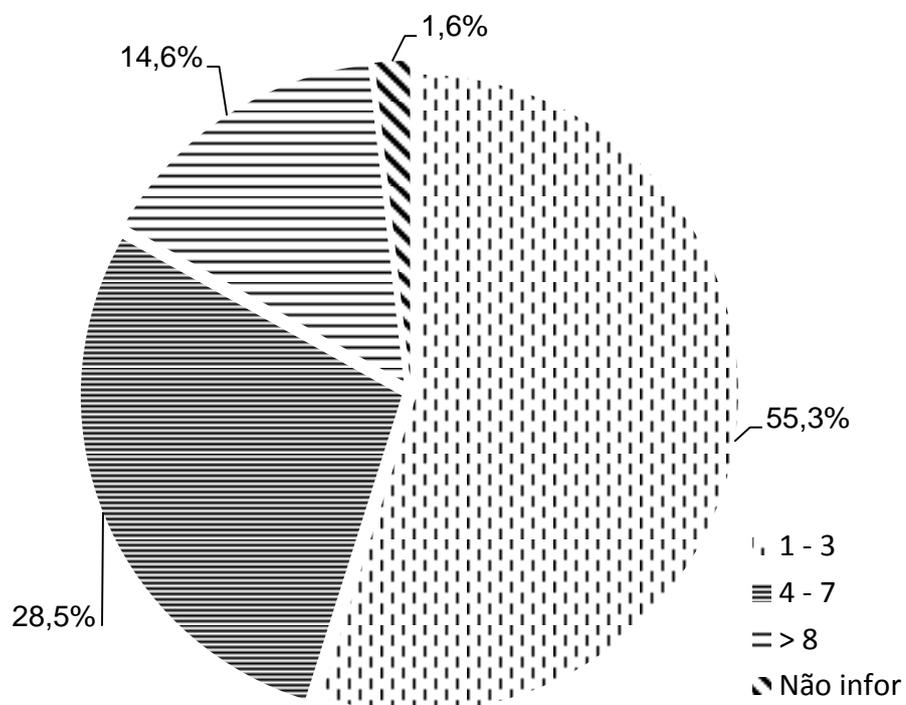


Gráfico 8. Proporção do Nº de PARCEIROS das pacientes POSITIVAS PARA HPV



6.4.5 Número de filhos

Seguindo a tendência de natalidade do Brasil², foi observado que a maior parte das pacientes, 439 (58%), teve até três filhos; seguido de 152 casos de mulheres que não tiveram descendentes (20,1%); ficou definido ainda que 108 pacientes (14,3%) tiveram entre 4 e 6 filhos e 52 (6,9%) tiveram sete ou mais filhos; cinco mulheres (0,7%) não informaram se possuíam filhos ou o número correspondente, gráfico 9.

A análise entre o número de filhos indicados pelas pacientes e a presença do HPV nas mesmas revelou uma relação significativa, com $p < 0,0001$. Tanto o processo de geração dos filhos, quanto as modificações fisiológicas na região cervical decorrentes do mesmo, podem ter influência na expressão das partículas virais.

Dentre as pacientes positivas para HPV, 55 (44,7%) tiveram até três filhos, 42 (34,1%) não tiveram filhos; em 13 dos casos (10,6%) elas declararam ter entre 4 e 6 filhos, assim como aquelas que tiveram sete filhos ou mais, 13 casos (10,6%), $p < 0,0001$, gráfico 10.

Esta predominância de casos positivos associados às mulheres com menos filhos também é apontada por Catarino et al. (2016), que define que mulheres que tiveram quatro filhos ou mais apresentaram menor probabilidade de desenvolver infecção por HPV.

O mesmo é evidenciado por Oliveira et al. (2013), que sugerem inclusive que a multiparidade teria se constituído como fator de proteção contra a infecção. Este dado pode estar relacionado à inibição da produção de E6 devido à expressão de hormônios, como o estrógeno, durante a gravidez, como foi constatado para o HPV16 (SALCEDO et al., 2015). A diminuição da produção das partículas virais pode permitir ao organismo combater o vírus de forma eficiente e, por consequência, diminuir a chance de expressões futuras.

Outra possibilidade, devido ao número de filhos, seria o contato da parturiente com o vírus através da interação com a equipe médica durante os partos, porém, este não parece ser o caso entre as pacientes analisadas.

² Segundo dados divulgados pelo IBGE em 2012 houve queda de 20,1% na fecundidade da população brasileira em comparação à década anterior à pesquisa (IBGE, 2012).

Gráfico 9. Proporção do Nº de FILHOS das pacientes avaliadas

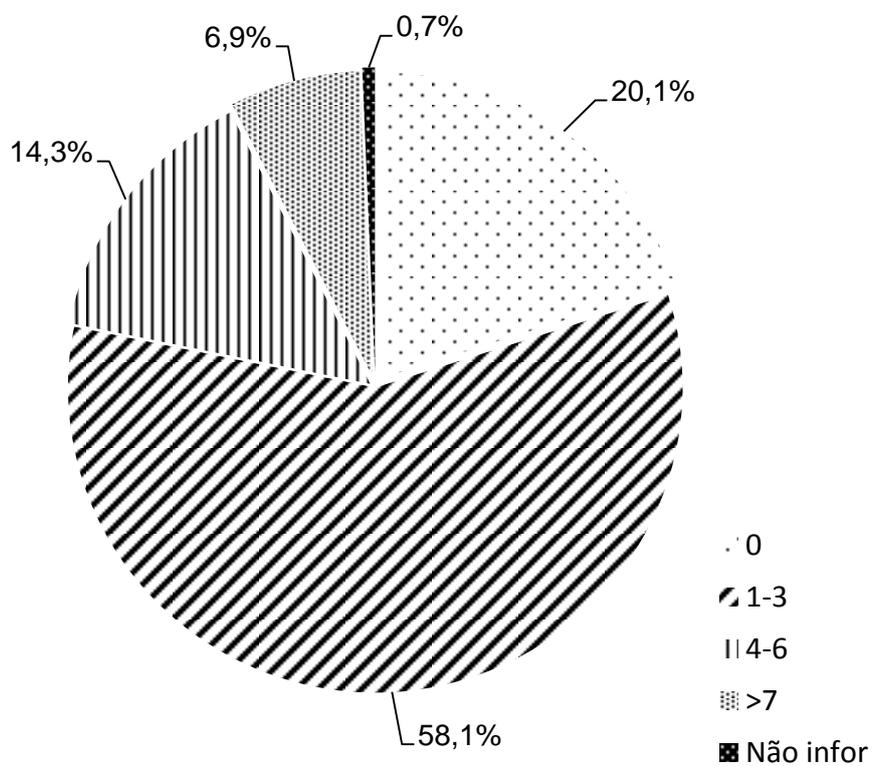
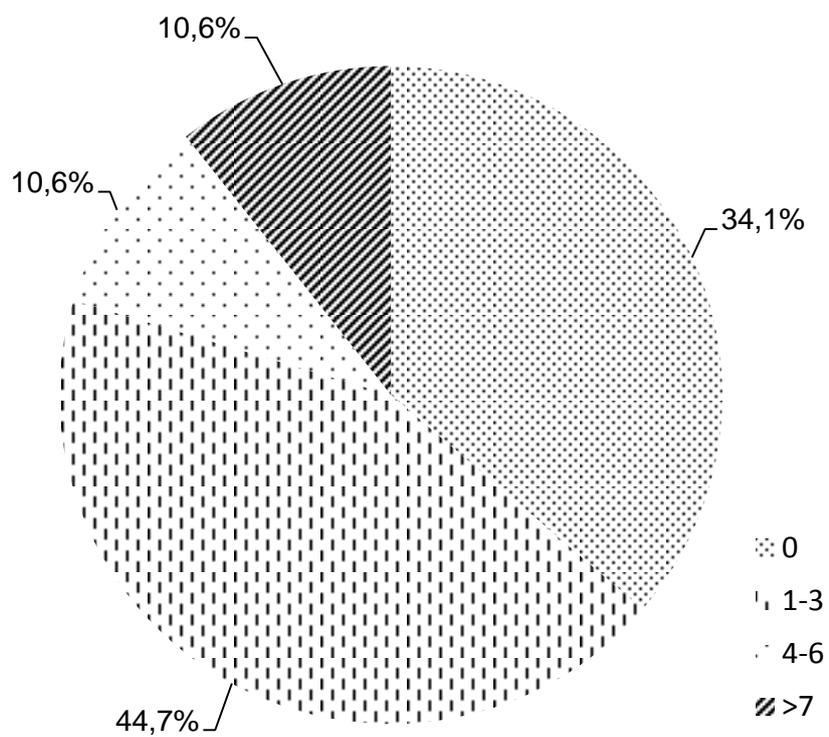


Gráfico 10. Proporção do Nº de FILHOS das pacientes POSITIVAS PARA HPV



6.4.6 Número de abortos

A maior parte das mulheres que participou do estudo nunca teve nenhum tipo de aborto, 564 (74,5%). Entre as que tiveram, 165 (21,8%), passaram por um ou dois episódios e 20 (2,6%) tiveram três ou mais casos, oito pacientes (1,1%) não informaram, gráfico 11.

A relação entre o número de abortos sofridos pelas pacientes do estudo e a positividade para HPV foi analisada ($p=0,07781$) e indicou que não houve significância entre estes fatores.

Em relação às mulheres que apresentaram diagnóstico positivo para o HPV, 89 (72,3%) não sofreram aborto, 27 (22%) apresentaram um ou dois episódios e sete (5,7%) tiveram mais de três casos, gráfico 12. Foi observado que a relação entre estes fatores foi significativa, com $p<0,0001$.

Apesar das ocorrências de aborto ser comuns, uma em cada cinco gestantes sofre com o processo, há evidências de que infecções que poderiam ser prevenidas levarem ao quadro, observando-se uma variação de 15% em abortos precoces e maiores de 66% em infecções tardias. Segundo Giakoumelou et al. (2015), os efeitos da presença de alguns agentes fúngicos e virais ainda precisam de mais estudos para serem compreendidos, como é o caso do HPV, pois em alguns casos há relatos de aumento da probabilidade de influenciar no processo abortivo, enquanto em outros a mesma é descartada.

A discrepância citada fica evidente quando trabalhos como os de Yang et al. (2013) e Perino et al. (2011) são comparados, pois, no primeiro não houve evidências da influência do HPV nos casos de aborto, enquanto no segundo 66,7% dos casos de aborto esteve relacionado à presença do vírus.

Outro fator interessante e que deve ser mais bem analisado é a importância do parceiro neste processo, uma vez que trabalhos na literatura, inclusive o citado anteriormente, apontam que há uma correlação entre parceiros infectados por HPV e processos abortivos.

Apesar de não haver consenso na literatura e trabalhos como o de Hanh, et al. (2013) relacionarem a transmissão vertical do HPV apenas com a passagem do neonato pelo canal vaginal durante o nascimento, outros, como o de Teixeira, et al. (2015) indicam a presença de partículas virais no cordão umbilical, na

placenta e no sangue materno, sugerindo a contaminação pré-parto e a possibilidade de interferência do HPV na gestação.

Gráfico 11. Proporção de ABORTOS das pacientes avaliadas

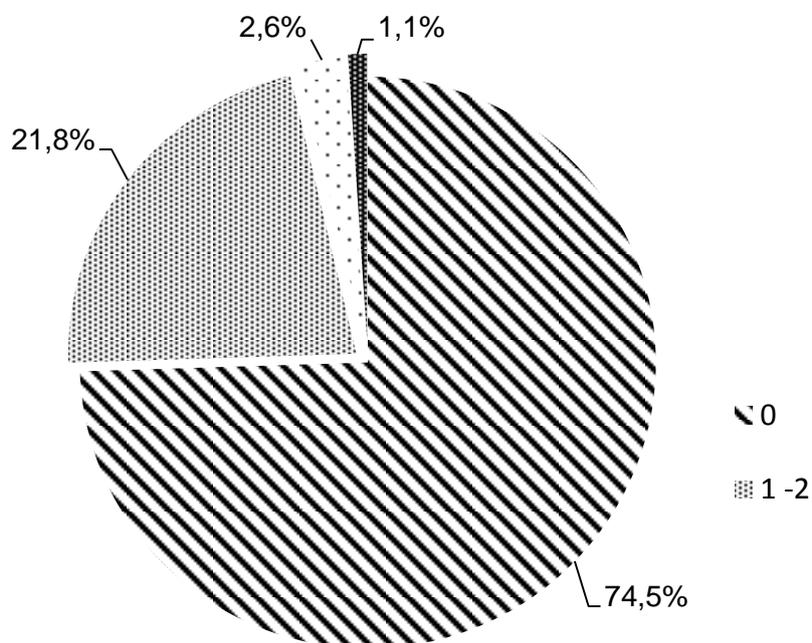
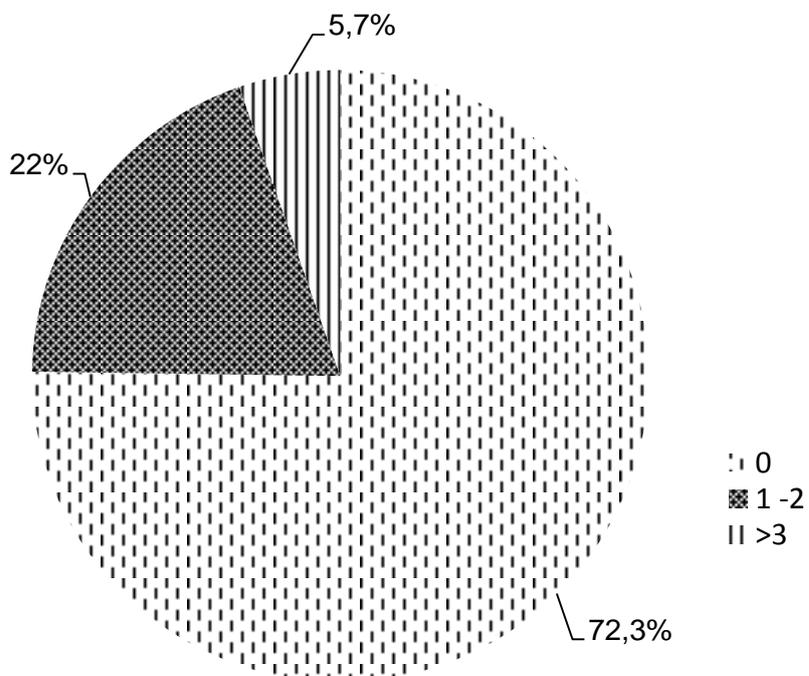


Gráfico 12. Proporção do Nº de ABORTOS das pacientes POSITIVAS PARA HPV



6.4.7 Gestante no momento da coleta

Foram verificadas 696 (91,9%) pacientes não gestantes durante a coleta dos dados e 61 (8,1%) estavam em período de gestação, gráfico 13.

A análise das pacientes gestantes em relação ao diagnóstico de HPV foi significativa, ($p=0,001$), assim a positividade para HPV foi, segundo os dados, influenciada pelo período gestacional.

A maior parte das pacientes positivas para o vírus não estava gestante, 104 (84,6%), enquanto apenas 19 (15,4%) eram positivas para este fator, $p<0,0001$, gráfico 14.

Observando de outro ponto de vista, dentre a população de gestantes, pôde-se verificar que 42 (68,8%) delas não foram diagnosticadas com o HPV, porém, 19 (31,2%) casos foram confirmados para o vírus, gráfico 15, ($p=0,0032$).

A respeito das modificações advindas do processo gestacional, que culminam em alterações imunes e hormonais, Oliveira et al. (2013) afirmam que

Sabe-se que altos níveis de hormônios esteroides produzem diminuição da síntese e atividade dos linfócitos e macrófagos. Assim, durante a gestação há depressão transitória e seletiva da imunocompetência celular. A atividade dos linfócitos T auxiliares e T supressores está diminuída, assim como da IgG e IgA no muco cervical.

O grupo citado ainda evidencia uma associação significativa para a presença do HPV nas pacientes gestantes avaliadas, quando comparadas às não gestantes da pesquisa, no universo de 96 gestantes avaliadas 24 (25%) foram consideradas HPV positivas ($p=0,04$). Desta forma, a gestação e todas as alterações decorrentes deste período, seriam responsáveis por uma maior incidência do HPV. O trabalho de Salcedo et al. (2015) também evidencia uma associação significativa em relação a este cofator. A análise entre amostras cervicais de mulheres gestantes e não gestante revelou que o HPV esteve presente em 25,3 % e 13 % dos grupos respectivamente abordados ($p = 0,035$).

Porém, em um estudo de coorte estabelecido por Trottier et al. (2015), no Estado de São Paulo, no qual 2462 mulheres foram avaliadas ao longo de dez

anos, não houve relação significativa entre a maior probabilidade de infecção pelo HPV e o período gestacional, pela avaliação das 122 mulheres que engravidaram durante o trabalho.

A importância de mais estudos com este grupo específico fica evidente, especialmente, quando se analisa as implicações da associação entre a presença do HPV e de síndromes desenvolvidas pelos recém nascidos, como a papilomatose respiratória recorrente, patologia do trato respiratório e digestivo superiores que, a princípio, é considerada benigna, mas que pode evoluir para uma doença pulmonar agressiva associada a procedimentos cirúrgicos e interferências de ordem médica por toda a vida do indivíduo (CARIFI et al., 2015). O trabalho realizado por Chun-Fu Tai et al. (2012), detectou diferentes tipos de HPV em oito espécimes respiratórias de neonatos, dos 108 pesquisados.

A associação com o câncer do colo do útero neste grupo de mulheres também deve ser pensada e pode implicar em procedimentos invasivos e danosos, como a interrupção da gravidez. Desta forma, a melhor estratégia é o planejamento familiar e gestacional, além, do acompanhamento pré-natal.

Gráfico 13. Proporção das GESTANTES dentre as pacientes avaliadas

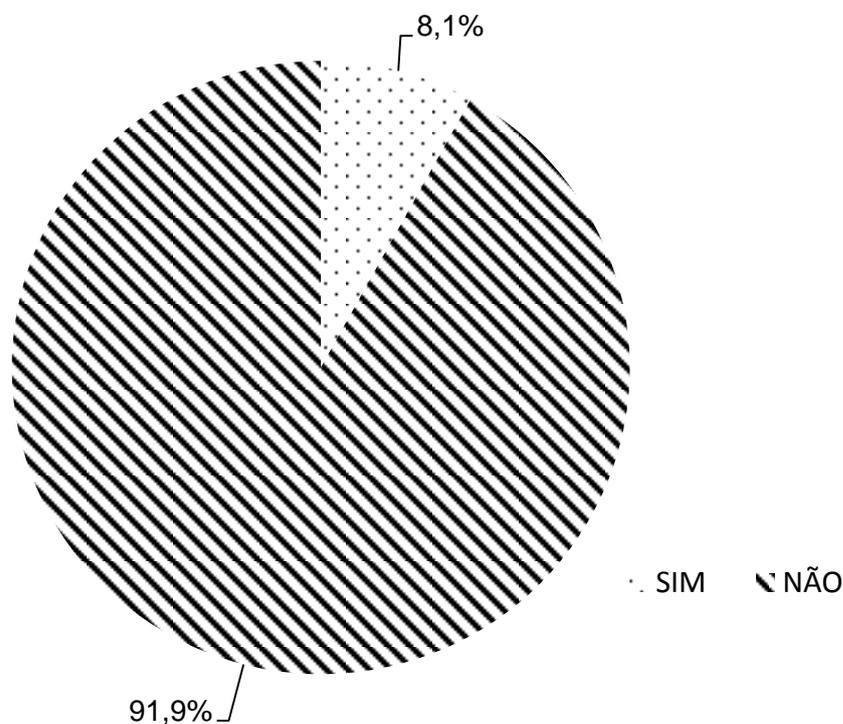
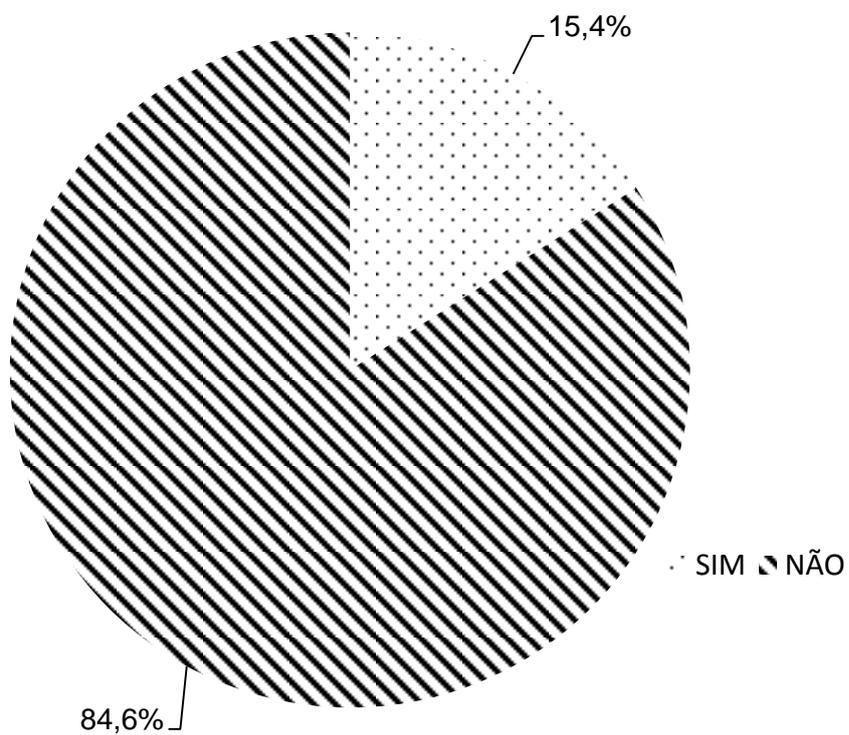
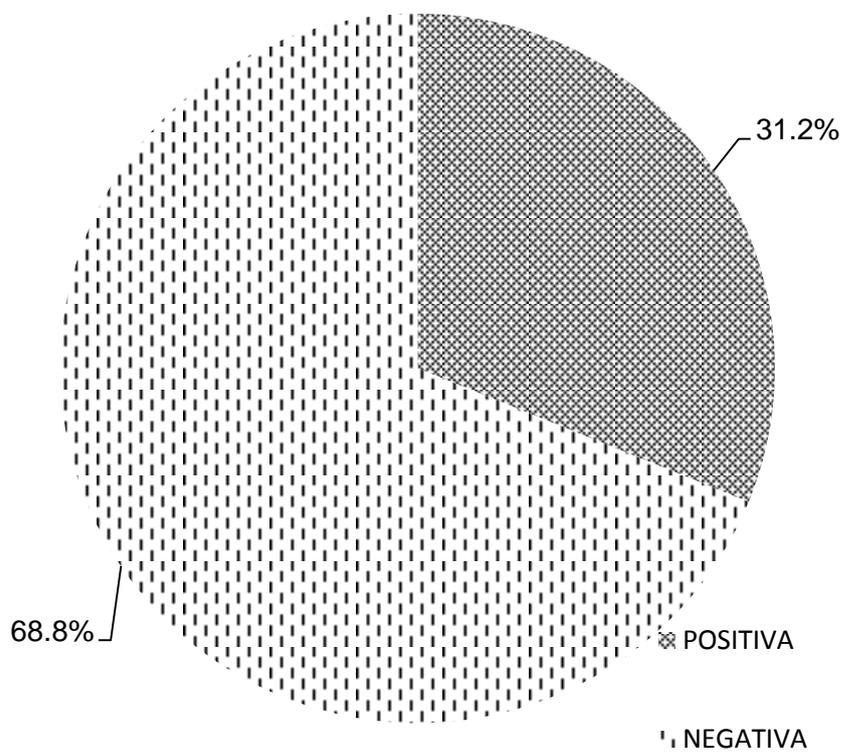


Gráfico 14. Proporção das pacientes HPV POSITIVAS GESTANDO**Gráfico 15. Relação das Gestantes analisadas para a presença do HPV**

6.4.8 Idade da primeira gestação

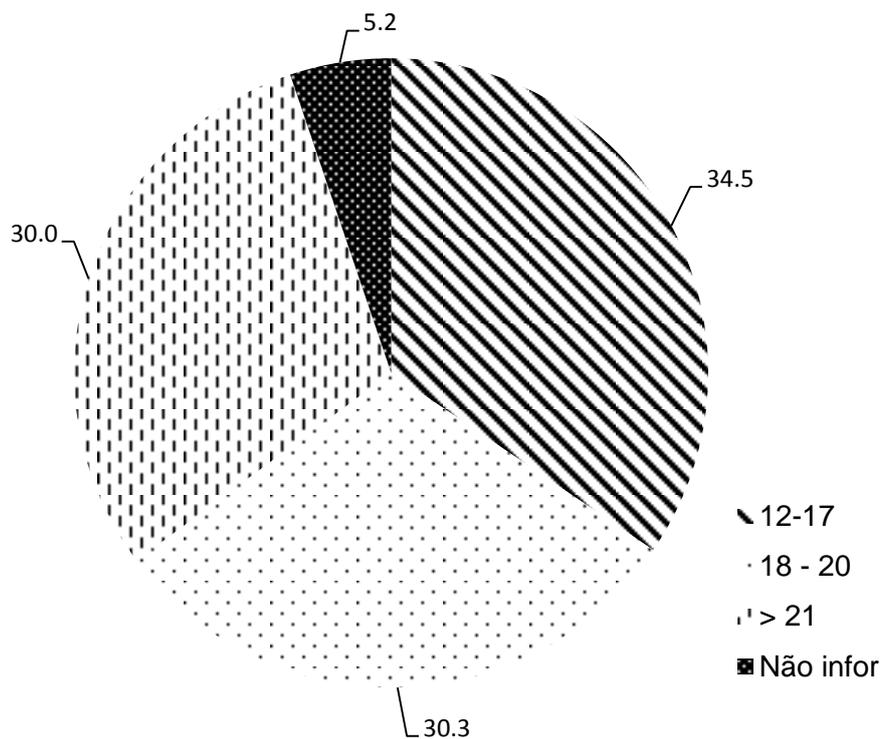
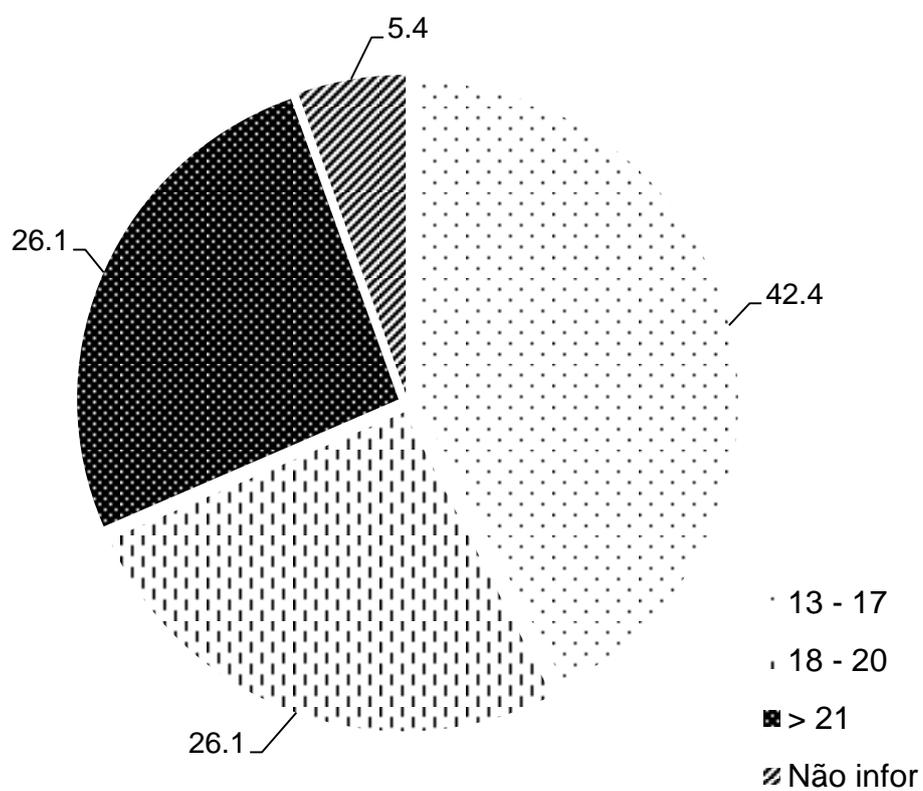
Apenas as mulheres que tiveram a gestação levada a termo foram consideradas neste fator, isto é, aquelas que não gestaram ou que eram gestantes no momento da coleta dos dados não foram consideradas. Desta forma, dentre as 620 mulheres (82% do total) que alegaram ter filhos 214 (34,5%) tiveram a primeira gestação entre 12 e 17 anos de idade. Foi observado, para a faixa etária entre 18 e 20 anos, 188 casos (30,3%) e para 186 mulheres (30%) o nascimento do primeiro filho ocorreu aos 21 anos, ou mais, de idade; este dado não foi informado por 32 pacientes (5,2%), gráfico 16.

Foi observada a relação entre as idades da primeira gestação entre as mulheres que participaram do estudo alegando ter filhos e a presença do HPV neste universo; a mesma foi considerada não significativa, ($p=0,3695$), desta forma, a idade de gestação não influenciou na produção de partículas virais.

Uma vez que apenas as pacientes positivas para HPV foram avaliadas para a idade da primeira gestação, pôde-se sugerir que o maior número de pacientes positivas para o vírus foi observado entre aquelas que gestaram pela primeira vez na faixa etária dos 13 aos 17 de idade, 39 (42,4%); seguidas daquelas que tiveram a primeira gestação dos 18 aos 20 anos, 24 (26,1%) e a partir dos 21 anos de idade, 24 (26,1%). Dentre as avaliadas para este fator cinco (5,4%) não responderam, gráfico 17. A relação foi considerada significativa, $p<0,0001$, e assim ter a primeira gestação entre os 13 e 17 anos de idade contribuiu para a expressão de partículas virais, segundo os dados observados.

Esta tendência também foi observada por Catarino et al (2016), que apontaram que ter o primeiro filho tardiamente está associado a um menor risco de desenvolvimento de infecção pelo HPV ($p = 0,008$).

É importante destacar que as mulheres jovens têm uma maior frequência de desenvolvimento de infecções por HPV, apesar de dificilmente evoluírem para lesões pré-cancerígenas ou cancerígenas. Neste caso pode ter havido a permanência do tipo viral, devido à gravidez precoce, com expressão de partículas virais mesmo após o término da gestação.

Gráfico 16. Proporção da IDADE da PRIMEIRA GESTAÇÃO das pacientes avaliadas**Gráfico 17. IDADE DA PRIMEIRA GESTAÇÃO das pacientes POSITIVAS PARA HPV**

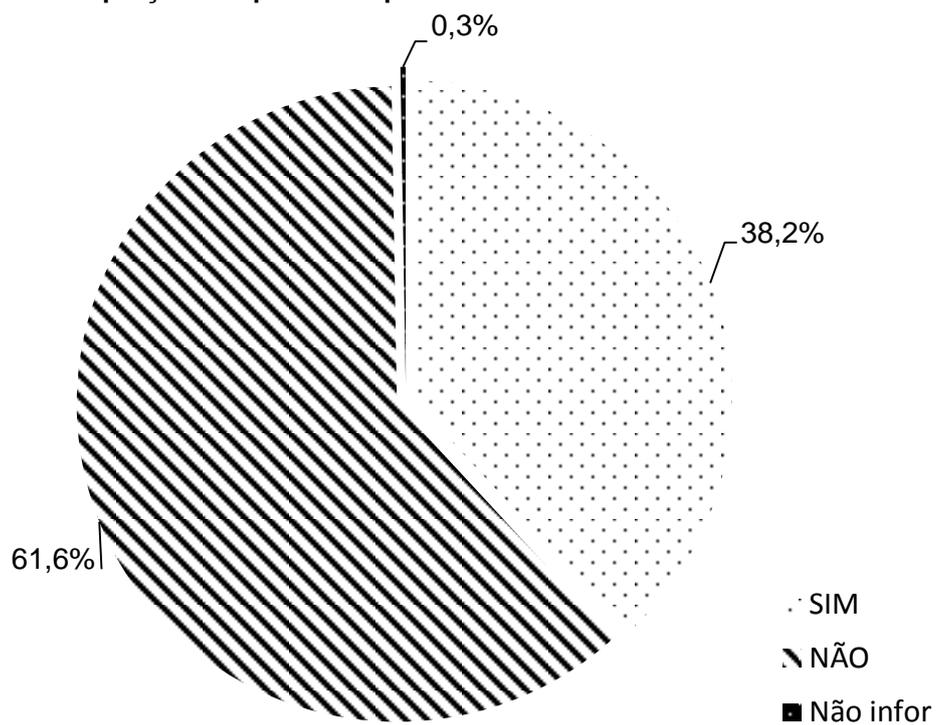
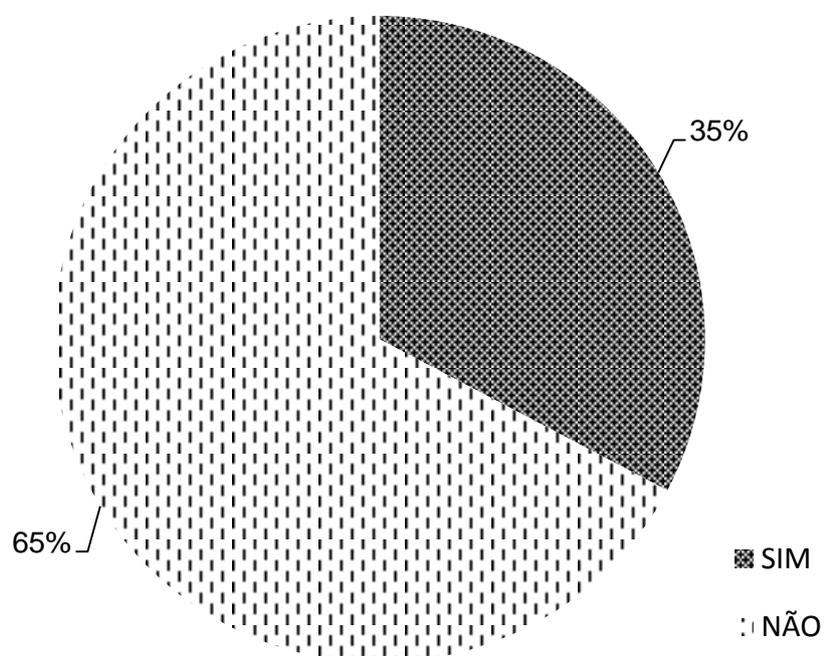
6.4.9 Prática do sexo oral

Houve predominância de mulheres que alegaram não praticar o sexo oral, 466 (61,6%), enquanto 289 (38,2%) praticavam. Dentre as participantes 2 (0,3%) não informaram, gráfico 18.

A relação entre as mulheres praticantes de sexo oral e a presença do HPV não foi significativa, ($p=0,584$). Apesar de uma grande maioria das mulheres do estudo alegar não aderir a esta prática, estes fatores não levaram a uma maior, ou menor, possibilidade de expressão de HPV.

O mesmo foi observado em relação às pacientes positivas para o vírus, a maioria, 80 (65%) delas, alegou não praticar sexo oral, enquanto, 43 (35%) afirmaram que praticam, gráfico 19. Porém, neste grupo de positivas houve o estabelecimento de relação significativa, com $p<0,0001$. O que indica que a prática de sexo oral não aumenta a probabilidade de desenvolvimento do HPV. É importante, contudo, perceber que, ainda que não descredencie os dados, alguns questionamentos podem ter sido respondidos com receio pelas pacientes analisadas.

Além disso, vale ressaltar que esta prática pode ser estabelecida como uma das principais formas de transmissão de tipos de HPV relacionados ao câncer orofaríngeo e, cada vez mais, o câncer nestas regiões tem sido associado ao vírus, ao contrário do que era relato no passado, quando o tabagismo e o etilismo eram apontados como os principais fatores (ARAÚJO et al., 2014).

Gráfico 18. Proporção das pacientes praticantes de SEXO ORAL**Gráfico 19. Proporção das pacientes POSITIVAS PARA HPV que praticam SEXO ORAL**

6.4.10 Prática do sexo anal

Resultados equivalentes foram definidos em relação ao sexo anal, neste caso, 528 (70%) pacientes alegaram não praticar sexo anal, enquanto 226 (29,9%) praticam e 2 (0,1%) não informaram, gráfico 20.

Este cofator não foi significativo quando as mulheres que praticam, ou não, o sexo anal foram avaliadas ($p=0,374$), apesar do maior número de pacientes que alegaram a não prática. Mais uma vez a inibição deve ser considerada, uma vez que esta é uma pergunta que pode causar constrangimento.

Dentre as mulheres diagnosticadas com HPV, 92 (74,8%) não praticam sexo anal, enquanto 31 (25,2%) praticam, gráfico 21. Neste grupo a relação foi considerada significativa, com $p<0,0001$, e a prática de sexo anal não foi considerada um fator para o desenvolvimento do HPV.

Shvetsov et al (2009) corroboram este achado, pois não houve correlação entre a probabilidade de desenvolvimento de infecção por HPV e o sexo anal, uma vez que a maior parte das pacientes avaliadas declarou não praticá-lo.

Gráfico 20. Proporção das pacientes praticantes de SEXO ANAL

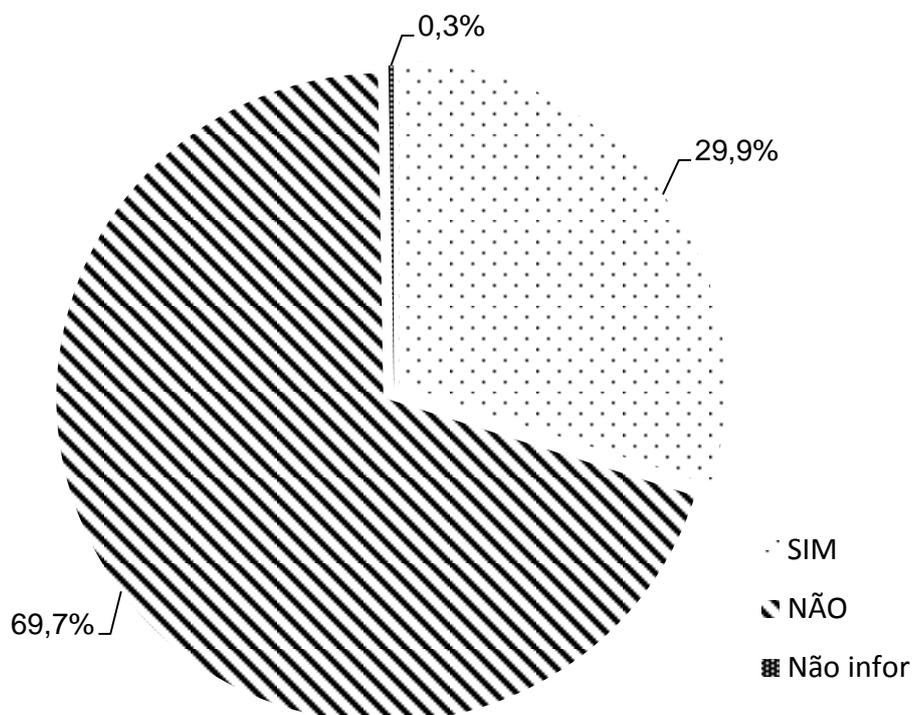
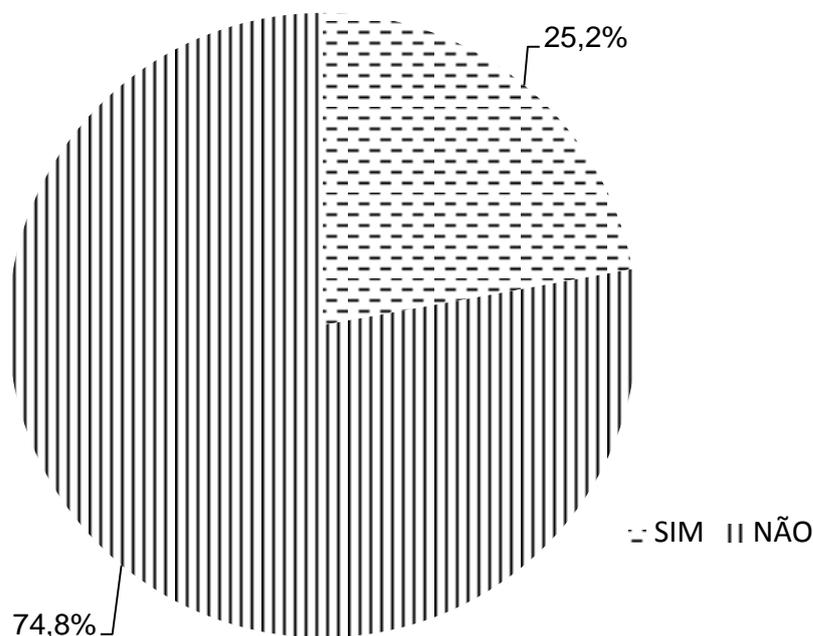


Gráfico 21. Proporção das pacientes POSITIVAS PARA HPV que praticam SEXO ANAL



6.4.11 Declara utilizar contraceptivo oral

A grande maioria das pacientes que participou do estudo não utiliza contraceptivo oral, 629 (83,1%), aquelas que fazem uso somam 127 (16,8%); apenas uma (0,1%) não informou este dado, gráfico 22.

Não houve relação significativa entre estes fatores, ($p=0,7504$), desta forma, apesar da maior parte das pacientes analisadas não utilizar esta forma de contracepção ela não interferiu na produção, ou não, de partículas virais.

Quando as mulheres positivas para o vírus foram observadas, constatou-se que 100 (81,3%) não utilizam contraceptivo oral, enquanto 23 (18,7%) usam regularmente, ainda que iniciado haja pouco tempo, gráfico 23. Neste caso a relação foi significativa, com $p<0,0001$, assim a positividade para o HPV não teria uma relação direta com o uso de contraceptivo, segundo o presente estudo.

Esta correlação entre mulheres positivas para o vírus e a utilização de contraceptivo oral, também não é estabelecida por Bahmanyar et al. (2012), que classificam este fator como contraditório, devido à pluralidade de resultados que se contradizem, e nem por Coser et al. (2016). Porém, Catarino et al. (2016)

conseguem apontar que a utilização de contracepção com base hormonal e a positividade para HPV têm uma estreita relação entre as mulheres camaronesas.

Um possível mecanismo biológico do impacto da contracepção hormonal seria o aumento da hidroxilação do estradiol para 16 α -hidroxiestrone nas células cervicais infectadas com HPV de alto risco. Este processo induziria o aumento da transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 e, conseqüentemente, levariam ao aumento da produção de carga viral.

Uma análise comportamental é proposta por Cotrim et al. (2009), ao sugerirem que o principal risco associado ao uso do contraceptivo oral por tempo indeterminado não se deve somente aos efeitos hormonais da pílula, mas ao comportamento sexual das mulheres que fazem uso desse tipo de método contraceptivo, pelo fato de se sentirem livres do risco de uma possível gravidez, não achando necessário o uso do preservativo. O que, de certa forma, pode ser contestado uma vez que a proteção possibilitada pelos preservativos é parcial, devido à maior frequência de transmissão do vírus ocorrer célula a célula e não através de secreções como, por exemplo, o HIV.

Gráfico 22. Proporção das pacientes que utilizavam CONTRACEPTIVO ORAL

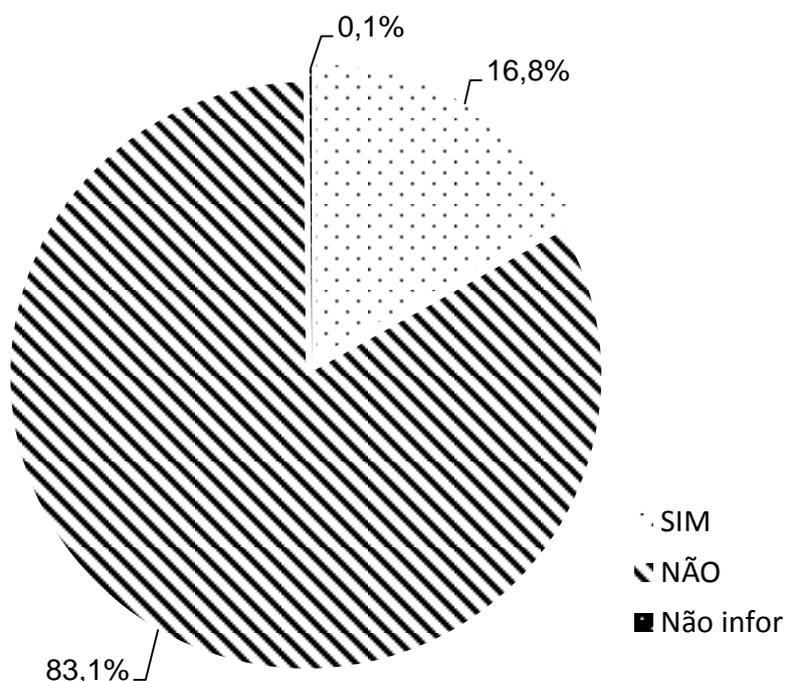
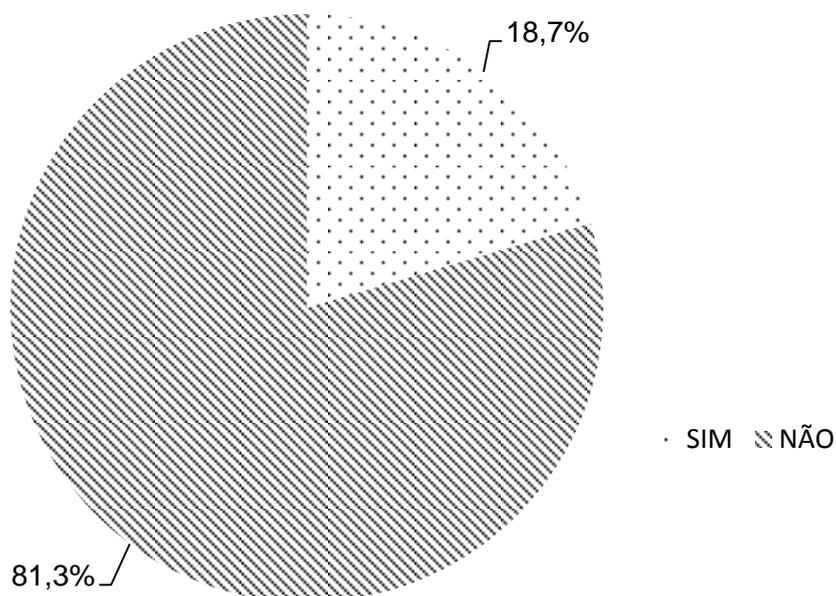


Gráfico 23. Proporção das pacientes POSITIVAS para HPV que utilizam CONTRACEPTIVO ORAL



6.4.12 Declara possuir DST

As pacientes foram questionadas em relação a terem conhecimento de possuírem algum tipo de DST. Houve predominância de negativas com 560 (74%) das pacientes, contra 192 (25,3%) positivas; este fator não foi informado por cinco mulheres (0,7%), gráfico 24.

Em relação às positivas para o HPV, foi observado o desconhecimento deste ou de outro tipo de DST em 90 casos (73,2%), enquanto apenas 31 mulheres (25,2%) sabiam da condição. Dentre as positivas para o vírus 2 (1,6%) não responderam a respeito deste fator, ($p=0,4456$), gráfico 25.

As co-infecções são apontadas como cofatores significativos para o desenvolvimento de infecções e de lesões pela presença do HPV em alguns estudos, sendo que, determinados patógenos merecem destaque. Catarino et al. (2016) apontaram que mulheres HIV positivas têm até três vezes mais chance de serem infectadas pelo HPV do que as HIV negativas. Com uma prevalência de 66,7% de casos positivos para o HPV – nas mulheres HIV positivas – comparados com 35,8% nas mulheres HIV negativas ($p < 0,001$). No trabalho de Martins et al. (2014) a abordagem também envolveu a análise da presença do HPV em um

grupo de mulheres HIV positivas, no qual a prevalência observada foi de 47,5% (sendo dentre estas amostras 59% associadas a HPV de alto risco).

Outros tipos de DSTs também são associadas às infecções por HPV; Bahmanyar et al. (2012), durante triagens para a determinação das variáveis que influenciariam a implantação de vacinas em mulheres jovens, determinaram que a presença da bactéria *Chlamydia trachomatis* também aumenta a probabilidade de infecção pelo HPV, ainda que de forma sútil.

Gráfico 24. Proporção de pacientes que apresentavam DST

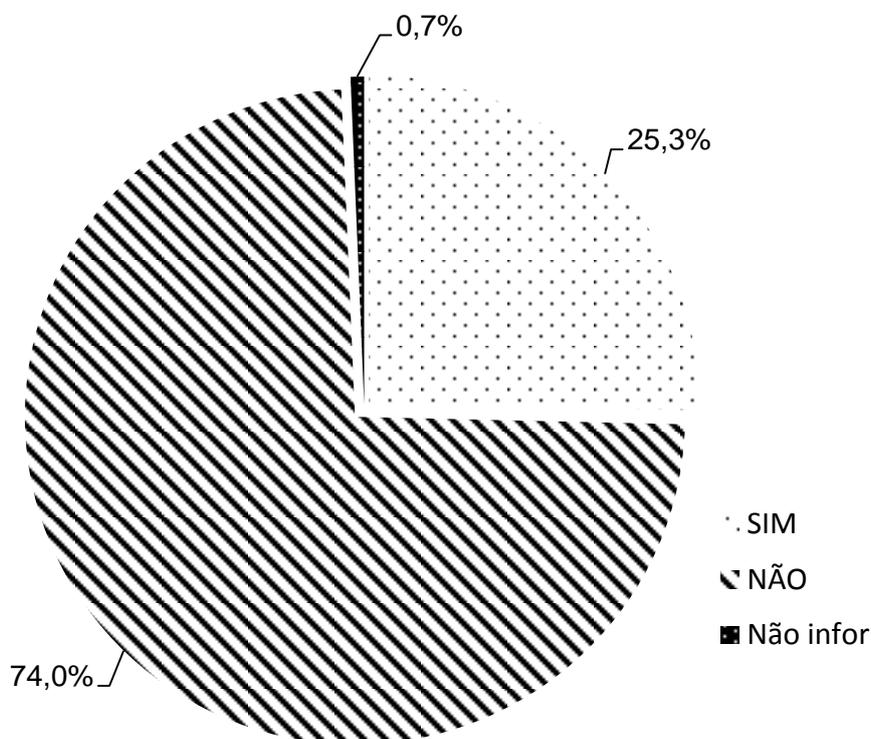
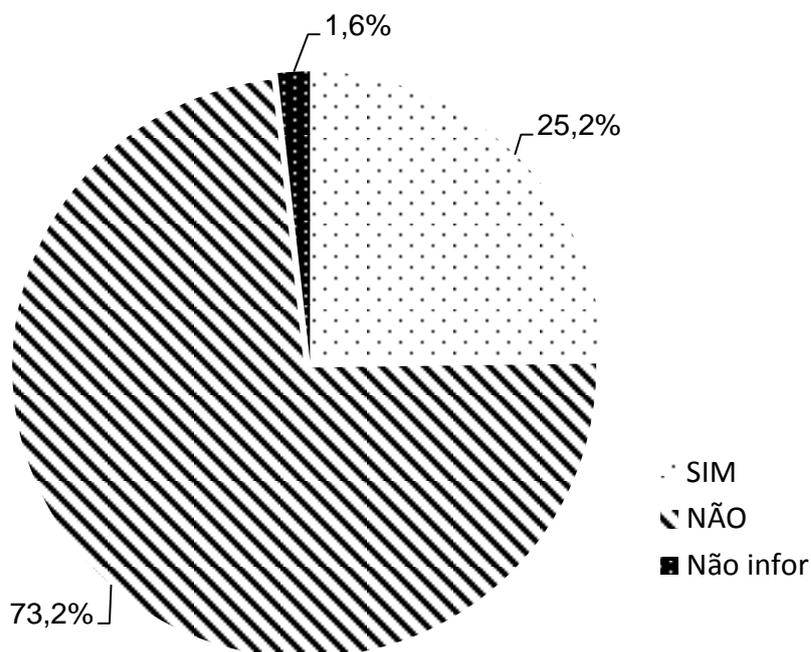


Gráfico 25. Proporção das pacientes POSITIVAS PARA HPV que alegaram apresentar DST



6.4.13 Tabagismo

A grande maioria das pacientes que participaram do estudo não é tabagista, 633 (83,6%), enquanto 105 (13,9%) fumavam durante a coleta dos dados e 19 (2,5%) consideraram-se ex-fumantes, gráfico 26.

Este cofator foi analisado frente à positividade para o HPV, pôde-se observar a ausência de significância nesta relação ($p=0,5772$). Assim, o tabagismo não interferiu na probabilidade das mulheres avaliadas serem positivas ou negativas para o HPV.

Dentre aquelas diagnosticadas com o vírus, 99 (80,5%) não eram tabagistas, 20 (16,2%) eram tabagistas à época e 4 (3,3%) consideraram-se ex-fumantes, gráfico 27. Esta relação foi considerada significativa com $p<0,0001$.

Um interessante estudo longitudinal conduzido por Collins et al. (2010), que envolveu 1.485 mulheres no Reino Unido, demonstrou que o tabagismo foi um fator significativo no desenvolvimento ou agravamento de lesões entre mulheres diagnosticadas com o vírus logo no início das avaliações, porém, o mesmo fator não influenciou na probabilidade do desenvolvimento da infecção do HPV na população investigada. Uma nota comportamental conflituosa destacada pelo

grupo é de que a sociedade ao deliberadamente associar o tabagismo com uma maior promiscuidade sexual, relacionaria, por consequência, o hábito de fumar ao desenvolvimento de infecções por HPV.

Bahmanyar et al. (2012) reportaram que o tabagismo entre as mulheres aumenta a gravidade das lesões cervicais, porém, não puderam definir associações entre o hábito de fumar e a infecção pelo HPV, desta forma, aquelas mulheres que já apresentavam alterações cervicais pela presença do vírus tiveram seus quadros agravados, porém, aquelas que não apresentavam HPV não apresentaram maior tendência no desenvolvimento de infecções.

Estudos apontam possíveis alterações no processo de ligação dos anticorpos contra os vírus HPV16 e HPV18 em indivíduos fumantes, apesar de não interferir em sua produção (NAMUJU, et al., 2014).

Alguns estudos, como do próprio grupo de Collins (2010), indicam ainda que o número de cigarros fumados rotineiramente pode influenciar na maior probabilidade de desenvolvimento de infecção pelo HPV.

Gráfico 26. Proporção de TABAGISTAS dentre as pacientes avaliadas

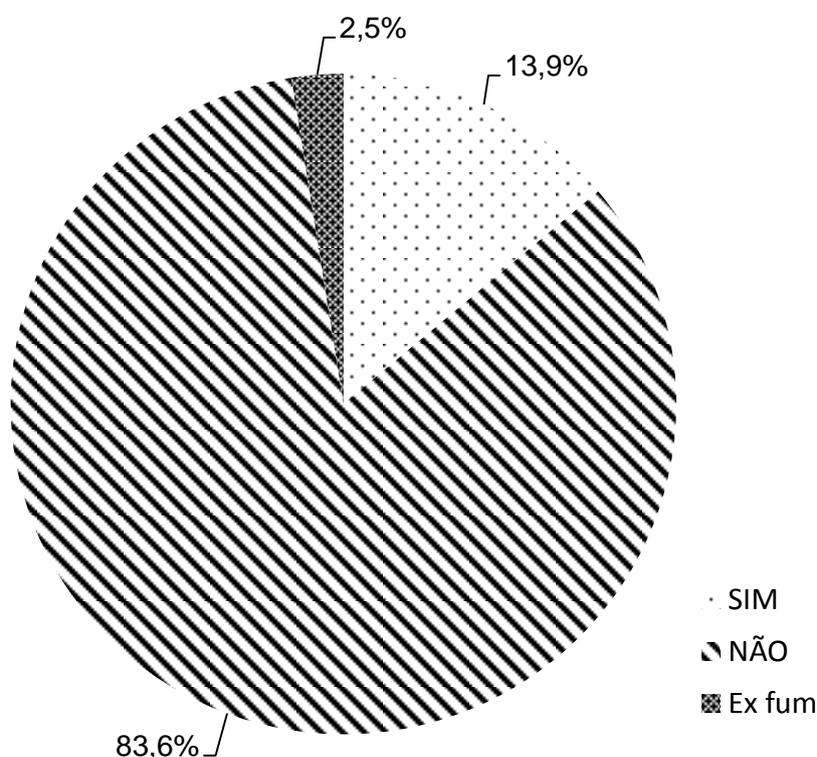
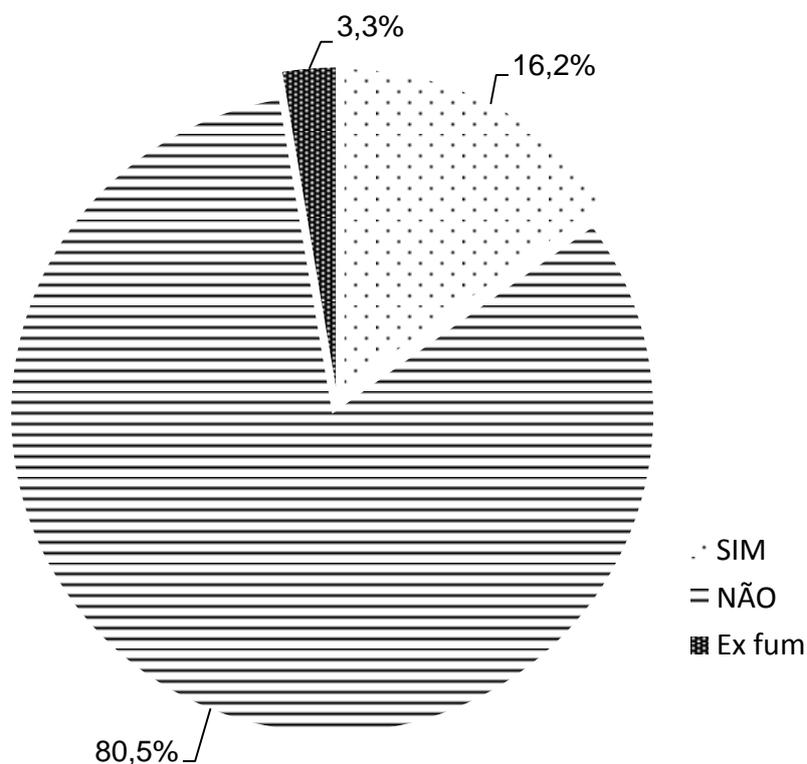


Gráfico 27. Proporção das pacientes TABAGISTAS POSITIVAS PARA HPV



6.4.14 Etilismo

A prática do etilismo foi verificada em 163 (21,5%), sendo que, a maior parte das pacientes não ingere álcool com regularidade, 594 (78,5%), gráfico 28.

A relação entre o etilismo e a positividade para o HPV não foi significativa, ($p=0,1184$), apesar da maior parte das mulheres avaliadas ter declarado não consumir álcool regularmente.

Avaliando-se apenas o grupo das mulheres consideradas positivas para o HPV, 99 (73,2%) não se definiram como etilistas, enquanto 33 (26,8%) consomem álcool regularmente, gráfico 29. Esta relação foi significativa, com $p<0,0001$.

No estudo desenvolvido por Nascimento et al. (2012), que analisou 34 amostras cervicais de mulheres HPV positivas residentes na cidade de Maceió, Estado de Alagoas, também não houve correlação entre o consumo de álcool pelas mulheres avaliadas e a positividade para HPV. O mesmo foi estabelecido por Tamegão-Lopes et al. (2014). Por outro lado, a influência deste cofator foi estabelecida por Martins et al (2014) apenas quando as mulheres avaliadas

também eram HIV positivas, nestes casos, houve correlação significativa entre o etilismo e a probabilidade de desenvolvimento de HPV.

Gráfico 28. Proporção de ETILISTAS dentre as pacientes avaliadas

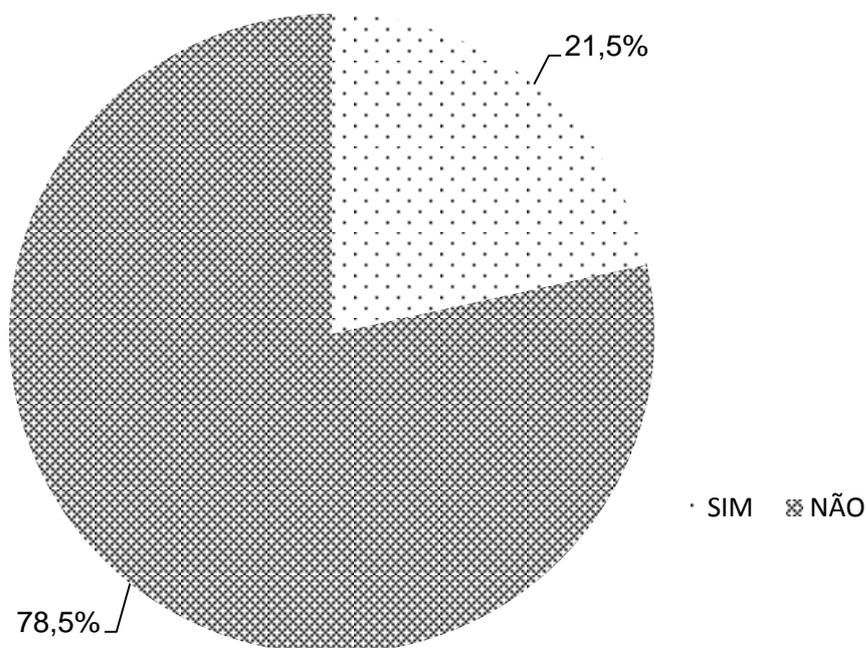
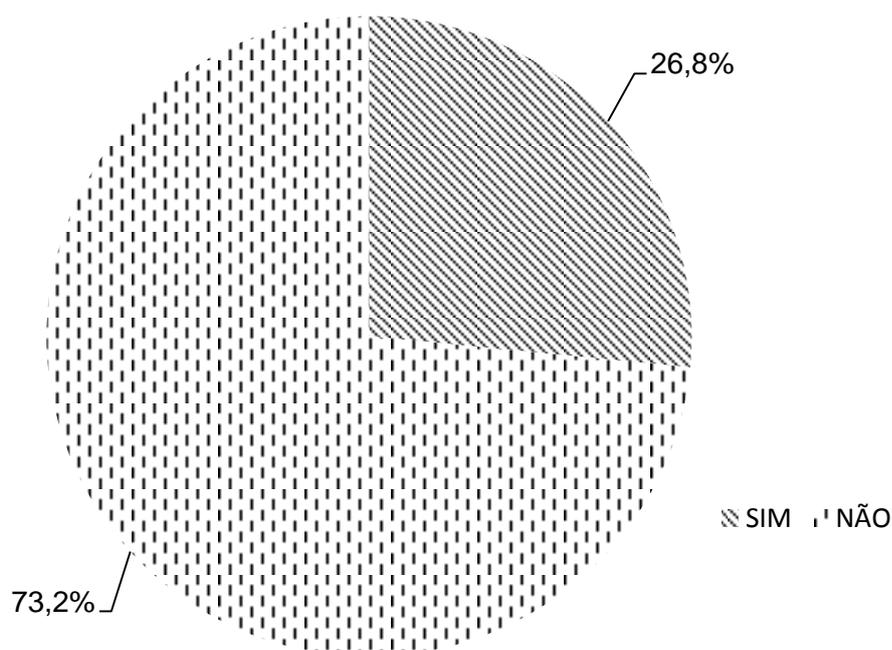


Gráfico 29. Proporcão das pacientes ETILISTAS POSITIVAS PARA HPV



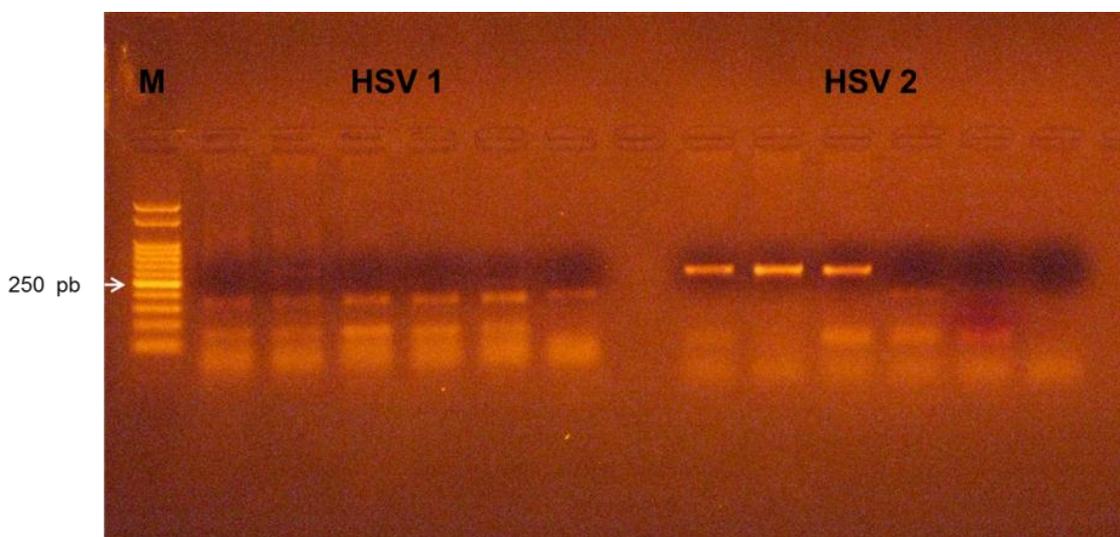
A definição dos cofatores auxilia na análise do perfil da população tanto sob aspectos comportamentais, quanto sociodemográficos. Estes dados possibilitam a definição dos grupos de maior comportamento de risco que, correlacionados aos tipos virais identificados na população, permitem o direcionamento de estratégias epidemiológicas de prevenção, como a adoção de sistemas de imunização e diagnóstico, como o próprio “kit” desenvolvido no presente trabalho.

6.5 Amplificação do DNA Viral – Herpes vírus Humano (HSV)

Os herpesvírus humano 1 e 2 são conhecidos por sua ampla incidência na população tanto mundial quanto brasileira (LOOKER et al. 2015), porém, a detecção no presente estudo não decorreu como o esperado. A amplificação do material genético do HSV 2 só foi visualizada em quatro das 123 amostras positivas para HPV, utilizadas a princípio como ponto de partida para a análise. Em relação ao HSV 1, a formação de bandas inespecíficas prosseguiu por todo o processo, impossibilitando a confirmação da presença viral. Na figura 13 é possível verificar a formação destas bandas – relacionadas ao HSV 1 – assim como três controles positivos para o HSV 2 (material sabidamente positivo para o vírus), que ao serem amplificados possibilitaram a visualização de bandas de 270 pb, conforme o marcador molecular também presente no gel de agarose (2,5%). Desta forma, no caso do HSV 2, a detecção dos controles positivos comprovam que os parâmetros necessários para a amplificação por PCR estariam corretos, apesar dos resultados negativos. Uma vez que o número de amostras foi suficiente para, segundo o que é conhecido em relação à prevalência do vírus, o mesmo ser detectado e que a qualidade das amostras foi analisada previamente, pela verificação do DNA total, espectrometria e pela presença da β -globina humana, novos estudos deverão ser conduzidos para se determinar o porquê da não detecção do vírus. Estudos apontam que, apesar da conhecida separação da prevalência dos tipos de HSV em regiões anatômicas, os diferentes tipos são observáveis tanto na região oral quanto genital. Desta forma, uma possível explicação para as escassas amostras positivas para HSV 2, seria uma prevalência de HSV1 na população abordada. Assim, uma vez que o processo de detecção seja estabelecido, o diagnóstico será possível.

Um padrão semelhante a este citado foi sugerido no estudo desenvolvido por Pereira et al. (2012), o qual incluiu amostras cervicais de 261 mulheres sexualmente ativas, residentes da cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Os espécimes foram analisados para a presença de DNA de HSV-1 e HSV-2 e os resultados obtidos demonstraram que o HSV-1 foi quatro vezes mais prevalente na população analisada do que o HSV -2.

Figura 13. Detecção do DNA do HSV de amostras clínicas selecionadas e amplificadas com os primers 1A e 1B (HSV1) / 2A e 2B (HSV2) banda de 270 pb em gel de agarose (2,5 %). M: marcador molecular.



6.6 Determinação dos tipos de HPV por sequenciamento automático

Após a determinação da presença do vírus HPV por PCR convencional e visualização dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel, os tipos virais foram determinados por sequenciamento automático. Em um primeiro momento das 123 amostras positivas para o vírus, 65 foram sequenciadas automaticamente. Os HPV foram separados por tipo e por grupo de risco oncogênico (alto ou baixo), a fim de se estabelecer sua relação com as características sócio demográficas e comportamentais explicitadas pelas pacientes. Além de possibilitar a determinação das prevalências dos tipos encontrados, para fins epidemiológicos, que podem ser observadas na tabela 8.

Tabela 8. Prevalência dos HPV de alto e baixo risco oncogênico detectados em Maceió, Alagoas.

HPV ALTO RISCO ONCOGÊNICO		
Tipo	Nº amostra	% amostra
16	8	12,3
31	3	4,6
33	4	6,2
52	2	3
53	5	7,7
58	7	11
59	1	1,5
66	3	4,6
70	3	4,6
73	1	1,5
82	1	1,5
TOTAL	38	58,5
HPV BAIXO RISCO ONCOGÊNICO		
Tipo	Nº amostra	% amostra
6	14	21,5
11	2	3
61	3	4,6
71	2	3
81	1	1,5
83	4	6,2
89	1	1,5
TOTAL	27	41,5

Os vírus considerados de alto risco oncogênico foram mais prevalentes em relação aos de baixo risco, 38 (58,5%) e 27 (41,5%) respectivamente, apesar de não haver diferença significativa ($p=0,17$). Houve a detecção de 11 diferentes tipos oncogênicos de alto risco, destes, o HPV 16 foi mais prevalente, tendo sido encontrado em oito amostras (12,3%); seguido do HPV 58 – sete amostras (11%), HPV 53 – cinco amostras (7,7%) - e do HPV 33 - quatro amostras (6,2%). Os tipos 31, 66 e 70 estiveram presentes em 3 amostras cada, o que correspondeu a 4,6% de prevalência. Os demais tipos (52, 59, 73 e 82) foram encontrados com baixa frequência na população avaliada.

A análise dos HPV de baixo risco apontou a ocorrência de sete diferentes tipos, destes houve maior prevalência do HPV 6 - 14 amostras (21,5%) – inclusive em relação a todos os tipos virais. Destacaram-se ainda o HPV 83 - quatro amostras (6,2%) - e o HPV 61 – três amostras (4,6%). Outros tipos virais que são definidos como pertencentes a este grupo foram observados em menor frequência. O HPV 11, por exemplo, apesar de ser constantemente destacado na literatura, devido à sua associação aos casos de formação de condilomas nas pacientes, foi observado em apenas duas amostras (3%).

Os tipos de HPV detectados neste estudo são frequentes, como demonstrado por Castellsagué et al (2007), ao desenvolverem um extenso trabalho em várias regiões do mundo comparando o desenvolvimento do câncer do colo do útero com a presença do HPV tanto de baixo quanto de alto risco. A associação de 70% dos casos de câncer do colo do útero com o HPV 16 e 18 fica evidente, assim como a baixa correlação dos HPV considerados de baixo risco com lesões de alto grau. A participação dos HPV 16, 31, 53, 58 e 66 é destacada também em relação às lesões de baixo grau.

Após analisarem 14.249 amostras histológicas de 38 países da Europa, América do Norte, Central e do Sul, África, Ásia e Oceania, Sanjose et al. (2010) determinaram que os genótipos de *Alphapapillomavirus* mais prevalentes foram HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV45, HPV52, and HPV58, que, combinados contribuíram para 91% dos casos de câncer cervical no mundo. O grupo também sugeriu que a significativa participação dos tipos 16 e 18 nos casos de câncer cervical invasivo, detectados em 6357 dos 8977 casos (71%).

Assim, apesar de o vírus HPV 18 não ter sido observado durante este estudo, o que sugere que sua prevalência no Estado é baixa, sua importância epidemiológica é inegável. Trabalhos como o de Castellsagué et al. (2007) demonstram esta importância, pois é possível observar a associação de 14,1% dos casos de lesões de alto grau no país e de 15,9% dos casos de câncer cervicais no mundo ao HPV 18. Ainda assim outros trabalhos, especialmente os desenvolvidos no Norte e no Nordeste brasileiro, apontam sua baixa frequência nestas regiões. Segundo Bruno et al. (2014), apesar de presente, o HPV 18 foi pouco prevalente no Estado da Bahia 5,4% entre os anos de 2010 e 2013. No estudo de Rocha et al. (2013) nenhuma participante foi positiva para HPV 18, bem como no estudo de Castro et al (2011), ambos desenvolvidos na Amazônia brasileira. O HPV 18 não tem sido comumente detectado em estudos brasileiros, ou, geralmente se apresentam com uma prevalência inferior a 1% em mulheres assintomáticas.

Ainda com relação aos levantamentos realizados por Bruno et al. (2014), em Salvador (Bahia), com amostras de 351 mulheres, o HPV 16 foi o mais prevalente entre os vírus de alto risco oncogênico, com 18,5%. Avaliando-se os tipos de baixo risco, apesar da prevalência encontrada para o HPV 42 (15,6%), o HPV 6 também se destacou com 11,4%. O HPV 11 foi o menos frequente com 2,8%.

Outra abordagem que deve ser considerada em relação à prevalência dos tipos de HPV é a possibilidade de infecção mista em uma mesma paciente, isto é, mais de um tipo de HPV em uma mesma amostra. Dados demonstrados por Gurgel et al. (2015) indicam que do total de 206 amostras cervicais 121 (59%) foram positivas para HPV. Destas, 94 (77,7%) foram positivas para apenas um tipo de HPV e em 27 (22,3%) foi identificado mais de um tipo de HPV.

Desta forma, a interferência da coexistência de diferentes tipos de HPV em uma mesma região merece mais avaliações. Porém é possível sugerir que diferentes genótipos sendo produzidos por uma mesma célula leve à geração de diferentes sequências virais e por consequência à fenótipos diferenciados, que podem variar em relação à taxas de produção viral, tipos de infecções e quadros clínicos.

6.6.1 A relação dos cofatores com os tipos virais detectados

As características sócio-demográficas e comportamentais também puderam ser analisadas em relação aos diferentes tipos virais detectados. Dentre as características avaliadas apenas menarca, número de parceiros e de gestantes foram estatisticamente significativos ($p=0,0418$; $0,0060$ e $0,0192$, respectivamente), para os demais as análises geraram $p>0,05$.

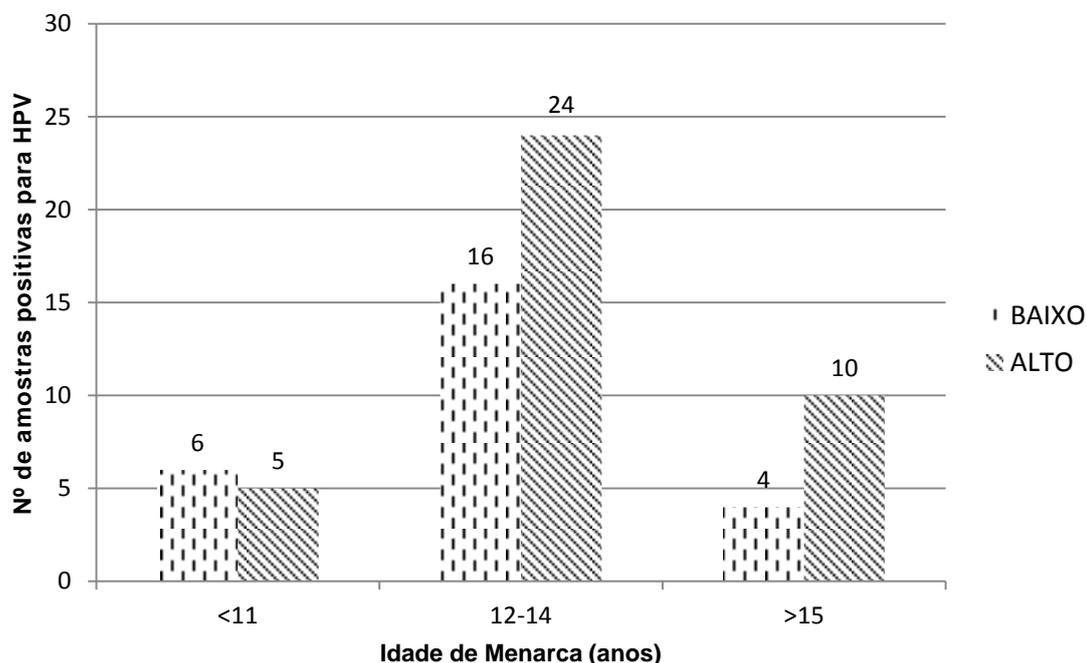
a) Risco de oncogenicidade do HPV em relação à menarca

O cofator menarca foi caracterizado no gráfico 30, no qual é possível observar que das 40 amostras positivas para HPV, detectadas em pacientes que tiveram suas menarcas na faixa etária dos 12 aos 14 anos de idade, 24 foram de alto risco e 16 foram de baixo risco oncogênico. Desta forma, houve 37% de prevalência de HPV de alto risco oncogênico nesta faixa etária, a mais acometida pelas infecções pesquisadas.

Enquanto trabalhos como o de Coelho et al. (2015) demonstraram que a presença do HPV de alto risco foi frequente em mulheres adultas do que em adolescentes, apesar de mais frequentes neste segundo grupo, outros grupos convergem para resultados opostos. Hibbitts et al. (2008), associou os 66% de todos os casos de HPV de alto risco a mulheres adultas jovens.

As mudanças cervicais e imunológicas, associadas a esta fase da adolescência, podem ser variáveis que influenciam em uma maior probabilidade de desenvolvimento de infecções pelo HPV. Porém, é importante destacar o alto índice de remissão espontânea das lesões associadas à presença do vírus, quando o contágio se dá durante a adolescência, devido à ação do sistema imunológico, especialmente dos linfócitos T (VAN DOORSLAER, 2013).

Gráfico 30. Determinação do risco de oncogenicidade do HPV em relação à MENARCA das pacientes

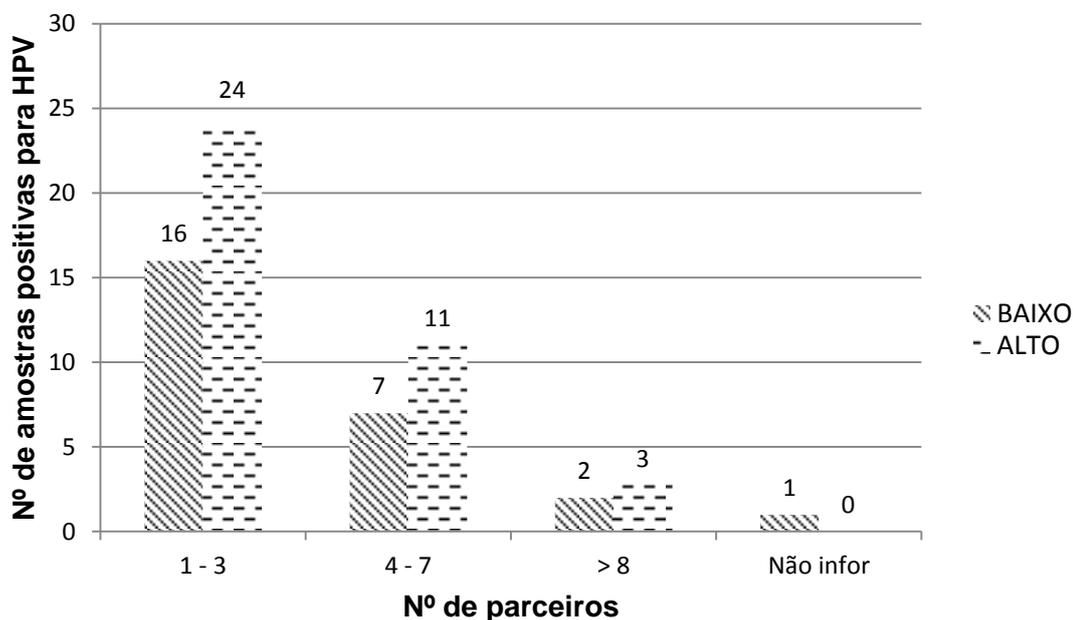


b) Risco de oncogenicidade do HPV em relação ao número de parceiros

Com relação ao número de parceiros, houve maior frequência de detecção tanto de HPV de alto risco, quanto de baixo risco, entre as mulheres que relataram ter mantido relações sexuais com um a três indivíduos, como demonstrado no gráfico 31.

Apesar de estudos como de Jia et al. (2015), demonstrarem a associação de prevalência de HPV de alto risco com mulheres que têm mais de quatro parceiros, pode-se observar no presente estudo o inverso. Fatores como ter um único parceiro, especialmente entre mulheres com relacionamentos estáveis, podem levar à falsa sensação de confiança e a uma maior taxa de contaminação, entre este grupo.

Gráfico 31. Determinação do risco de oncogenicidade do HPV em relação ao N° de PARCEIROS

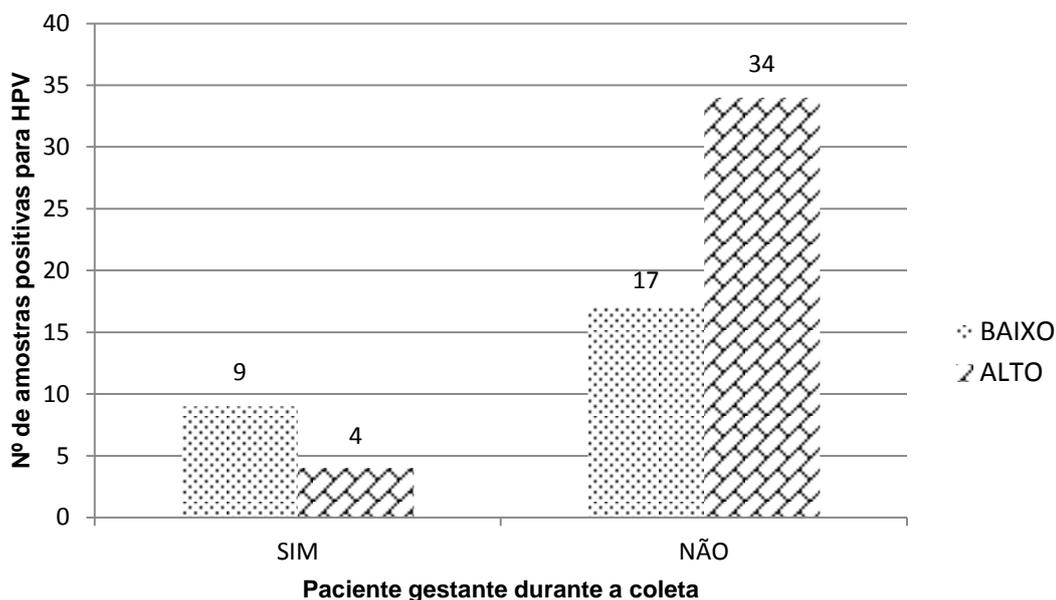


c) Risco de oncogenicidade do HPV em função da gestação

A análise das mulheres em relação a estarem gestantes, no momento da coleta de dados, e apresentarem diferentes tipos de HPV demonstrou que aquelas mulheres que não estavam grávidas foram mais suscetíveis tanto aos vírus HPV de alto risco (34), quanto aos de baixo risco. Nas amostras das pacientes gestantes houve prevalência de HPV de baixo risco.

Apesar do caráter imunossupressor da gestação, estudos, como de Salcedo, et al. (2015) apontam para uma contribuição positiva da gravidez nos quadros de infecção pelo HPV de alto risco. Este processo estaria relacionado às transformações hormonais inerentes do período que levariam à uma inibição do promotor transcricional das proteínas E6 e E7, pela ligação de hormônios esteroides. Assim, a gravidez teria um papel de resolução da infecção. Todavia, os estudos acerca deste cofator continuam conflituosos e carecem de maiores abordagens científicas.

Gráfico 32. Determinação do risco de oncogenicidade do HPV em função da GESTAÇÃO



6.7 Desenvolvimento e padronização do “kit” de detecção

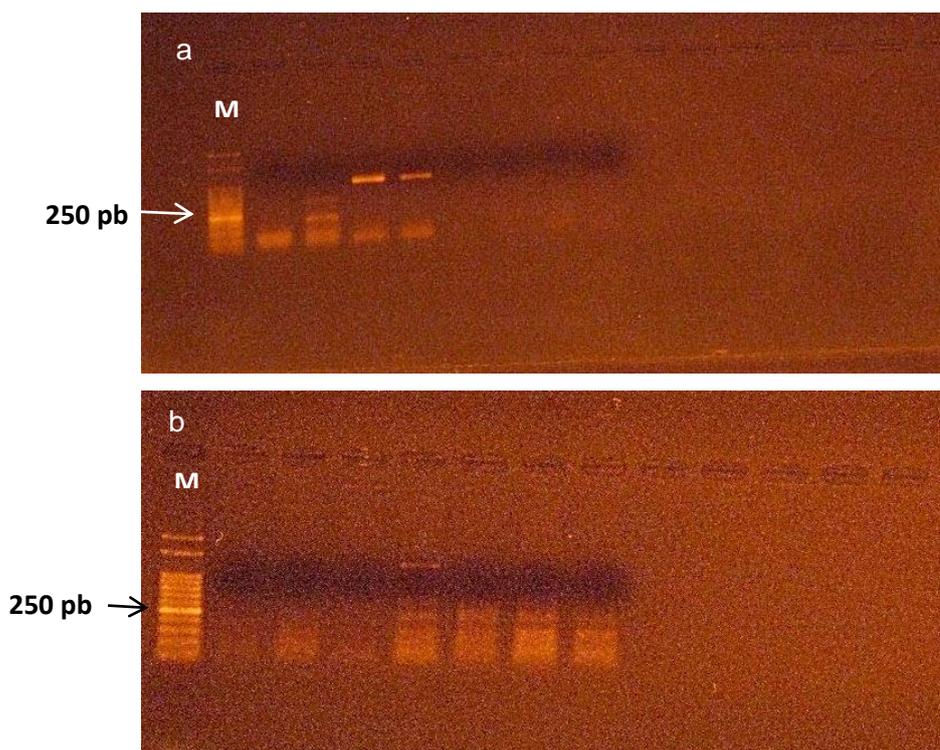
6.7.1 Análise dos diferentes tipos virais por PCR convencional

O desenvolvimento do “kit” molecular proposto teve como base novas análises, por PCR convencional. Neste novo processo foram empregadas as amostras previamente determinadas como positivas para o HPV, através do sequenciamento automático, determinado como técnica controle. Foi utilizado o “mix” de reagentes previamente elaborado e descrito. As amostras foram amplificadas normalmente e as bandas de 450 pb e de 268 pb, correspondentes à região L1 do DNA viral e à β -globina humana, respectivamente, foram visualizadas. Houve exceção em seis casos, nos quais não houve amplificação e, ao serem avaliados novamente em relação ao DNA total também não amplificaram. Este fato pode estar relacionado à degradação do material genético viral seja por variações na temperatura durante o armazenamento ou pela ação de enzimas que podem ser classificadas como contaminantes do material.

6.7.2 Análise dos diferentes tipos virais por PCR específica

Objetivando-se avaliar a eficiência dos iniciadores propostos para a composição do “kit” de detecção, foram realizadas, em um primeiro momento, análises individuais através de testes com as amostras previamente sequenciadas e de classificação, quanto ao tipo de HPV, já estabelecida. Todos os iniciadores funcionaram como o esperado, isto é, houve amplificação e as bandas formadas puderam ser visualizadas por eletroforese em gel (2%), como demonstrado na figura 14, na qual se observa os fragmentos amplificados de 476 pb e 968 pb, do HPV 16 e HPV 58, respectivamente. O par de iniciadores para HPV 18 não pôde ser avaliado devido à ausência de amostras positivas para este tipo viral. Mas sua associação a outros iniciadores é proposta na literatura por outros estudos.

Figura 14. Visualização de fragmentos amplificados do papilomavírus humano, utilizando-se eletroforese em gel de agarose (2%). a) HPV 16, formação de bandas de 476 pb na quinta e sexta canaleta. b) HPV 58, formação de bandas de 968 pb na quinta canaleta. M –marcador molecular (50 pb).



6.7.3 Análise das amostras por PCR multiplex

Uma vez que houve êxito na utilização individual dos iniciadores propostos, os mesmos foram empregados na composição do “mix” de reagentes, para a detecção do HPV de alto risco por PCR multiplex. As condições do programa de PCR foram padronizadas com o objetivo de englobar todas as necessidades de tempo e temperatura para os diferentes processos de amplificação. Com o objetivo de refinamento da técnica para aplicações comerciais e aumento da especificidade algumas condições, como a concentração da enzima empregada e de alguns iniciadores, estão sendo revistas. Estas interferências já foram descritas por diferentes autores, como Carvalho et al. (2010), que ao comparar as análises por PCR específica com outras técnicas, como o próprio sequenciamento, aponta uma detecção menos eficiente e mais laboriosa, o que poderia ser suprido pelo PCR multiplex. E por Romero-Pastrana (2012), que adota o PCR multiplex na análise de diversos tipos de HPV e tem bons resultados, porém, a grande diversidade de iniciadores, ao contrário do que é proposto no presente trabalho, encarece a técnica e, desta forma, dificulta o acesso em especial dos países em desenvolvimento. Assim, observa-se que o investimento na resolução destes problemas é viável e se faz interessante, pois, o “kit” tem potencial para ser um produto de destacada importância social, epidemiológica e econômica. Especialmente no tocante à determinação do número de indivíduos infectados com o HPV e da detecção específica dos tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 53, 58 e 66, relacionados ao desenvolvimento do câncer do colo do útero.

6.8 Análises cito-colposcópicas-histopatológicas

As amostras foram avaliadas em relação aos exames cito-histopatológicos de rotina, utilizados nos Centros de Saúde, assim como em relação aos colposcópicos, empregados em alguns casos.

Desta forma, dentre as 757 amostras avaliadas por biologia molecular para a presença do HPV, 374 foram analisadas com relação à citologia, 389 para a colposcopia e 158 amostras comparadas com os exames histopatológicos,

conforme descrito na tabela 9. A variação apresentada refere-se à eleição da equipe médica por realizar um ou mais exames.

Tabela 9. Avaliação dos exames cito-histopatológicos e colposcópicos de pacientes atendidas no Hospital Universitário e no Pam Salgadinho de julho de 2012 a dezembro de 2014.

Variáveis	Citologia n (%)	Histopatologia n (%)	Colposcopia n (%)
#NIC1+	75 (20%)	64 (40,5%)	91 (23,4%)*
NIC2+	12 (3,2%)	20 (12,6%)	_____
NIC3+	47 (12,5%)	24 (15,2%)	_____
Câncer cervical	8 (2,2%)	10 (6,3%)	9 (2,3%)
Condiloma	5 (1,4%)	_____	50 (12,8%)
Negativo	25 (6,7%)	8 (5,1%)	78 (20%)
Outros	202 (54%)	32 (20,3%)	162 (41,5%)
TOTAL	374 (100%)	158 (100%)	389 (100%)

* O exame colposcópico sugere a presença de HPV através do teste de Schiller, mas o grau da lesão não é determinado, apenas se a região cervical cora, ou não, em função da substância utilizada (solução de iodo ou acética). # Neoplasia intraepitelial de grau 1, 2 ou 3.

Os resultados dos exames citológicos demonstraram que em 75 amostras (20%) foi detectada neoplasia intraepitelial de grau 1 (NIC), também conhecidas como lesões de baixo grau; em 59 amostras (15,7%) NIC 2 ou 3 – ou lesões de alto grau e em 8 amostras (2,2%) câncer cervical, todos estariam relacionados à HPV de alto risco oncogênico. Já em cinco amostras (1,4%) foram observados condilomas, relacionados à HPV de baixo risco oncogênico.

As histopatologias sugerem 64 espécimes (40,5%) de NIC 1, 44 (27,8%) de NIC 2 ou 3 e 10 amostras (6,3%) compatíveis pra câncer cervical.

Os exames colposcópicos sugerem 91 amostras (23,4%) positivas para o teste de Schiller, o que indicaria lesões por HPV; nove amostras (2,3%) sugestivas de câncer cervical e 50 (12,8%) relacionadas a condilomas.

Assim, uma vez que apenas os testes moleculares podem determinar com segurança a presença do vírus, variações são observadas ao compará-los com os exames citados. De maneira geral, a proporção de casos positivos para HPV seria muito maior do que a averiguada pelos testes moleculares, caso apenas os exames visuais fossem levados em conta. Além do valor epidemiológico, este tipo de resultado deixa claro que a determinação da presença viral, bem como a

determinação dos cofatores, tem um papel fundamental na definição das melhores formas de tratamento e de orientação das pacientes, pois, dependendo do tipo viral sabe-se que pode haver maior probabilidade de progressão das lesões ou, até mesmo, sua resolução. Nestes casos não haveria a necessidade de intervenções, o que levaria tanto à diminuição dos custos de tratamento, quanto a menores prejuízos físicos e psicológicos às pacientes.

Variações entre estes tipos de testes são comumente observadas na literatura, FRANZ et al. (2014), por exemplo, demonstram que a partir da PCR, que 12,7% das amostras analisadas foram positivas para a presença do DNA viral, enquanto que os exames citológicos detectaram alterações celulares em 2,4% das amostras. Os resultados, apontados pelo grupo citado, demonstram que o uso de técnicas moleculares para a comprovação da presença do HPV é significativamente mais sensível do que os exames citológicos ($p < 0,0001$).

Tamegão-Lopes et al. (2014) também observam que de 143 amostras analisadas em coleta de rotina, para pesquisa do câncer cervical, 42 foram consideradas positivas para HPV (29,4%), nenhuma, contudo, apresentava resultados citológicos anormais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os cofatores analisados, quando se avaliou a positividade das amostras para HPV, pôde-se observar diferença significativa em relação à idade das pacientes; número de parceiros; número de filhos; e ser gestante no momento da coleta de dados. Contudo, deve-se destacar que as respostas dadas durante o preenchimento do questionário aplicado foram de total responsabilidade das pacientes, assim, possíveis variações, em decorrência das mesmas, podem estar presentes.

A definição dos cofatores promove a definição do perfil da população e auxilia na identificação dos grupos de maior comportamento de risco. Sua associação com a pesquisa dos tipos virais na população, possibilita a otimização da prevenção e da detecção, através de técnicas como o próprio “kit” proposto.

Não houve a detecção esperada do HSV 2, dentre as amostras positivas para o HPV apenas quatro também foram positivas para HSV 2; e o HSV 1 não foi detectado. Novas análises permitirão determinar o perfil da população e se o mesmo é corroborado, conforme os dados da literatura.

Com relação à prevalência dos tipos de HPV detectados, os tipos de alto risco oncogênico foram mais prevalentes (58,5%), dentre estes o HPV16 foi mais frequente, observado em 12,3% das amostras positivas. A análise dos vírus HPV de baixo risco indicou maior prevalência do HPV6, tanto entre os tipos virais deste grupo, quanto de uma forma geral, com 21,5% dentre as amostras positivas.

Houve diferenças significativas na associação entre os tipos virais, de alto ou baixo risco, e os seguintes cofatores: menarca, número de parceiros e gestante no momento da coleta de dados.

Não houve concordância entre os exames cito-colposcópico-histopatológicos e os testes moleculares.

A detecção dos diferentes tipos virais por PCR específica foi estabelecida para seis dos sete tipos virais selecionados; apesar do HPV 18 não ter sido determinado no estudo, sua importância epidemiológica determina que ele esteja presente em métodos de detecção, como o “kit” desenvolvido.

O aumento da especificidade do “kit”, bem como o refinamento da técnica permitirá sua aplicação em ambientes laboratoriais com equipamentos e mão-de-obra básica, devido a seu baixo custo e facilidade de aplicação. O emprego do “kit” permitirá o estabelecimento da prevalência de determinados tipos de HPV, o

que é de extrema importância, pois alguns, como o HPV16 e o 18, estão relacionados ao desenvolvimento de lesões cervicais que apresentam probabilidades significativas de evoluir para o câncer cervical invasivo. Outro fator a ser analisado é o epidemiológico, a determinação dos tipos virais na população, bem como a análise de possíveis variáveis comportamentais e ambientais, permite compreender mecanismos fisiopatológicos e orientar os indivíduos que constituem grupos de risco.

Por fim, as estimativas da contribuição dos diferentes tipos virais, no cenário nacional ou mundial, são importantes contribuições que possibilitam uma melhor abordagem em relação à prevenção e tratamento viral. Estes devem ser considerados na elaboração, por exemplo, de novas vacinas polivalentes, que possam abranger um maior tipo de genótipos e, conseqüentemente, promover imunizações mais eficazes.

Devido a seu importante caráter socioeconômico e suas características de inovação, o “kit” em questão foi depositado no Instituto nacional da propriedade intelectual (INPI), para obtenção de patente, através do Núcleo de Inovação Tecnológica, da Universidade Federal de Alagoas, sob número BR 10 2016 003502 3 (Anexo D).

Outro produto em desenvolvimento a partir do presente trabalho é o “kit” de auto coleta que viabilizará um melhor controle da paciente em relação ao monitoramento do teste para HPV. Além disso, a disponibilização de um kit acessível e de fácil utilização incentivará mulheres que, seja por motivos culturais ou geográficos, não participam de consultas ginecológicas com a frequência necessária. O mesmo será composto por uma escova ginecológica e um tampão, adaptados para a coleta de células com o objetivo de análise molecular, que, tanto facilitam a própria coleta, quanto, tornam desnecessário o armazenamento a baixas temperaturas.

Também foi gerado o artigo presente no Anexo E:

Velber X. Nascimento, Adriana R. Todaro, Luiza D. F. de Barros, Paulo P. da Silva, João Messias dos Santos, Nathália Corrêa C. de Souza, Lúcyo Wagner Torres de Carvalho, Eduardo R. Neto. Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) in women with cervical intraepithelial neoplasia in Alagoas, Brazil. **Applied Cancer Research**. v.32, n.1, p.16-20, 2012.

8 CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer que houve prevalência dos tipos de HPV de alto risco no Estado de Alagoas (58,5%), com destaque para o HPV 16; além disso o HPV 6 (de baixo risco) foi detectado com maior frequência dentre todos os tipos virais encontrados. Com relação aos cofatores, pôde-se observar diferença significativa em relação à idade das pacientes; número de parceiros; número de filhos; e ser gestante no momento da coleta de dados. O kit de detecção proposto possibilitará a determinação dos principais tipos oncogênicos presentes no Estado, os iniciadores utilizados responderam bem aos testes estabelecidos, o que possibilita a continuidade dos testes para a implementação do kit.

REFERÊNCIAS

AJILA, V. et al. Human Papilloma Virus Associated Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **J. Sex. Transm. Dis.**, 1-5, 2015.

American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta: **American Cancer Society**, 57 pág., 2015.

ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. **J Virol.** v. 76, n. 24, p 12537–12542, 2002.

ARAÚJO, M. V. A. et al. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) em Belém, Pará, Brasil, na cavidade oral de indivíduos sem lesões clinicamente diagnosticáveis. **Cad. Saúde Públ.**, v. 30, n. 5, p.1115-1119, 2014.

ARAÚJO NETO, C. A.; CAMPOS, R. M.; BASTOS, M. L. (2002). Papilomatose respiratória recorrente com disseminação pulmonar – relato de dois casos. **Radiol. Bras.**, v.35, n. 2, p. 117–120, 2002.

AYRES, A.R.G.; SILVA, A.G. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Pública** v.44, n. 5, p.963-974, 2010.

BAHMANYAR, E.R. Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrollment in the multinational PATRICIA trial. **Gynecol. Oncol.** v. 127, p. 440–450, 2012.

BALBI, F. S. M. **Estudo da prevalência da coinfeção pelo Papilomavírus humano (HPV) em mulheres no climatério em um hospital de referência de Belém.** 2015, 72 f., Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais), Universidade Federal do Belém, Belém, 2015.

BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T. et al. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. **GMR**, v. 11, n. 1, p. 462-466, 2012.

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.

BERNARD, H.; CALLEJA-MACIAS, D. I.; TERENCE, S. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical. **Int. J. Cancer**, 1071–1076, 2006.

BOSCH, F. X.; Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. **J. Clin. Pathol**, v. 55, n. 4, p. 244-265, 2002.

BRAVO, I. G., FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evol. Med. Public Health**, v. 1 32-51, 2015.

BRAVO, I. G.; DE SANJOSE, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends Microbiol.** v.18, 432-438, 2010.

BRUNI L.; DIAZ M.; CASTELLSAGUE. X et. al.; Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J. Infect. Dis.** v. 202, p. 1789–1799, 2010.

BRUNO, A. et al. Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 36(9):416-22. 2014.

BUCK, C.B. et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. **J. Virol**, v.11, n. 82, p. 5190–5197, 2008.

BURCHELL, A.N. et al. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24, p. 52–61, 2006.

CAPRA, G. et al. HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. **Virus Res.** v. 133, n. 2, p. 195-200, 2008.

CARESTIATO, F. N. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Genital Tract Determined by Hybrid Capture Assay. **Braz. J. Infect. Dis.** v.10, n. 5, p. 331-336, 2006.

CARIFI, M. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. **Ther Clin Risk Manag.** v.11, p. 731–738, 2015.

CARTIER, René. **Colposcopia prática** - 5ª ed., São Paulo, Editora ROCA LTDA. 354p. 2008.

CARVALHO, N. O. et al. Comparison of HPV genotyping by type-specific pcr and sequencing. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105(1): 73-78, 2010.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. HPV and cervical cancer in the 2007 report. **WHO/ICO Information Centre on HPV**, 2007.

CASTELLSAGUE, X. et al. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. 9:74. **BMC Infect. Dis.** v. 27, n. 9, p. 74, 2009.

CASTLE, P.E. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. **BMJ**, p. 339, 2009.

CASTRO, M. M. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **G.M.R.** v. 10, n. 1, p. 186-96, 2011.

CATARINO, R. et. al. Risk factors associated with human papillomavirus prevalence and cervical neoplasia among Cameroonian women. **Cancer Epidemiol.**, v. 40, p 60–66, 2016.

CHUN-FU T. Molecular detection and incidence of human papillomavirus in neonates: ethodology and a pilot study in a medical center. **J. Microb. Immun. and Infect.** v. 45, 185-192, 2012.

CHUNG, S. H. Requirement for estrogen receptor α in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. **Cancer Res.**, p. 9928–9934, 2008.

COELHO, K.M.P.A. et al. Prevalence variation of colpocytological abnormalities in adolescents and adults in the years 2000 and 2010. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 51, n. 1, p. 28-32, 2015.

COLLINS, S. et al. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. **Eur. J. Cancer**, v. 46 P. 405-411, 2010.

CONWAY, M. J.; MEYERS, C. Replication and assembly of human papillomaviruses. **J. Dent. Res.** v. 88, n. 4, p.307-317, 2009.

COSER, J. et al. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 20, n. 1, p61–68, 2016.

COTRIM, J. et. al. Associação de Lesões Anorretais em Portadoras de Infecção Genital por HPV e Neoplasia Cérvico-Uterina. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 29; n.2: p. 203-208, 2009.

CRUM, C.P.; MCKEON, F.D. p63 in Epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia. **Annu. Rev. Pathol.** v. 5, p. 349–371, 2010.

DE BOER, M. A. et. al. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. **Int. J. Cancer**, v. 114, p. 422–425, 2004.

DE PALO, Giuseppe ;VECCHIONE, Aldo. Neoplasia intra-epitelial do colo uterino. In: _____ **Colposcopia e Patologia do trato genital inferior**. Rio de Janeiro. 3ª ed. Editora MEDSI, p 223-39, 2009.

DE VILLIERS, E. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, 17–27, 2004.

DEVARAKONDA, S.S. et. al. Risk factors and prevalence of genital HPV infection among adult females in US between 2003-2010: Data from NHANES study. In: In: Proceedings of the 105th AACR Annual Meeting, 2014, San Diego, CA. **Cancer Res.** 74 (19 Suppl):Abstract nr 278. doi:10.1158/1538-7445.AM2014-278, 2014; Philadelphia (PA), 2014.

DILLNER, J. et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. **BMJ**, p.1-8, 2008.

DOORBAR, J.et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, suppl. 5, F55–F70, 2012.

EGAWA, N. et al. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v.7, n. 7, p. 3863-3890, 2015.

ELFATH, M. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. **Clin. Microbiol. Ver.** V. 13, 2000.

EREN, F. et al. Prevalence of HPV infection by cytologic diagnosis and HPV DNA extraction and prevalence of the HPV genotypes detected in urban Turkish women. **Int. J. Gynecology Obstetrics**, v. 109, n. 3, p. 235-238, 2010.

FERNANDES, J. V. et al. Biology and natural history of human papillomavirus infection. **IJCT**, v. 5, p. 1-12, 2013.

FERRARO, C.T.L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 451-459, 2011.

FONSECA, A. J. **Caracterização da infecção por papilomavírus humano em indígenas do extremo norte da Amazônia brasileira**: comparação entre etnias indígenas isoladas e integradas à sociedade ocidental. 2015, 53f., il. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais e Infecciosas), Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical. Manaus, 2015.

FORMAN, D. et al. **Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases**. *Vaccine*, v.30, p. 12–23, 2012.

FRANZ, L. et al. Prevalence of HPV in asymptomatic patients in the extreme west of Santa Catarina. **Scient. Electr. Arch.** v. 7, p. 89-95, 2014.

GALLOWAY, D. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. **Curr. Opin. Virology**, v.14, p. 87–92, 2015.

GASPAR, J. et al. Fatores sociodemográficos e clínicos de mulheres com papilomavírus humano e sua associação com o vírus da imunodeficiência humana. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**. v.23 n.1, p. 74-81, 2015.

GIAKOUMELOU, S. The role of infection in miscarriage. **Hum. Reprod. Upd.**, v.0, n.0 p. 1–18, 2015.

GIAKOUMELOU, S.et. al. The role of infection in miscarriage. **Hum. Reprod. Update**, v.22, n.1, p.116-133, 2016.

GIORDANO, A.; BOVICELLI, A.; KURMAN, R. J. **Molecular pathology of gynecologic cancer**. ISBN: 978-1-58829-453-1 (Print) 978-1-59745-346-2 (on line) 226p. Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ; 2007.

GIULIANO, A.R.et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 4, p. 462–469, 2002.

GRCE, M.; MRAVAK-STIPETIC, M. Human papillomavirus associated diseases. **Clin. Dermatol**, v. 32, n. 3, p. 253–258, 2014.

GUIMARÃES, A. G. D. P. et al. Coinfection of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus, human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia in HIV patients in Amazon, Brazil. **J. Coloproct.** v.32, n. 1, p. 18-25, 2012.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. **Biomed. Res. Int.** v.1, p. 1- 12, 2015.

HERRERO, R. et al. Epidemiologic profile of typespecific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 11, 1796–1807, 2005.

HIBBITTS, S. et al. Human papillomavirus prevalence in women attending routine cervical screening in South Wales, UK: a cross-sectional study. **BJC**, v. 99, n. 11, p. 1929 – 1933, 2008.

HOULIHAN, C. F.et al. Prevalence of human papillomavirus in adolescent girls before reported sexual debut. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 6, p. 837–845. 2014.

HPV: Guia do HPV: Entenda de vez os papilomavírus, as doenças que causam e o que já é possível fazer para evitá-los. São Paulo. **Instituto do HPV**, 42 p., 2012.

HUSSAIN, S. K.et al. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 17, p.1790-1799. 2008.

IARC. **Human Papillomaviruses**. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 90 Lyon: WHO Press, 2007.

IARC. **Human Papillomaviruses**. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 90, p. 255-314, Lyon: WHO Press, 2012.

IBGE. (2012). Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/ibge-taxa-de-fecundidade-diminuiu-20-1-na-ultima-decada-2>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2016.

ICO (Institut Català d'Oncologia) **Information Centre on HPV and Cancer**. Human Papillomavirus and Related Diseases Report, Fact Sheet 2016.

INCA. (2010). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil., disponível em <www.inca.gov.br/estimativas>, Acesso em 2 de novembro de 2015.

INCA. (2012). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil., disponível em <www.inca.gov.br/estimativas>, Acesso em 2 de novembro de 2015.

INCA. (2013). Tipos de Câncer - Colo do útero, disponível em Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterodefinicao>, Acesso em 2 de novembro de 2015.

INCA. (2015). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil., disponível em <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-incidencia.asp>>, Acesso em 28 de novembro de 2015.

JIA, H. et al. Human papillomavirus infection and cervical dysplasia in female sex workers in Northeast China: an observational study. **BMC Public Health** v. 15, p. 695, 2015.

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**, v. 24, suppl. 3, p. S3/63–S3/70, 2006.

KRAMBECK, W. M. et al. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 35, n. 3, p. 175-178, 2008.

KUKHANOVA, M. K. et al. Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. **Biochem**. v. 79, n. 13, 2014.

LARSEN, P.; STORGAARD, L.; FEY, S. J. Proteins present in bovine papillomavirus particles. **J. Virol**, v. 61, p. 3596-3601, 1987.

LIU, B.; TAIOLI, E. Associations between human papillomavirus and history of cancer among U.S. adults in the National Health and Nutrition Examination Survey (2003–2010). **Br. J. of Cancer**, v. 111, n. 7, p. 1448–1453, 2014.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 2, p. 362–372, 2004.

LOOKER, K. J. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, e0140765, 2015.

MARTINS, A.E.S.; Prevalence of human papillomavirus infection, distribution of viral types and risk factors in cervical samples from human immunodeficiency virus-positive women attending three human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome reference centres in northeastern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.109, n. 6, p. 738–747, 2014.

MINKOFF, H. et al. Relationship between smoking and human papillomavirus infections in HIV-infected and -uninfected women. **J Infect Dis**. v. 189, n. 10, p.1821-1828, 2004.

MIRKOVIC, J. et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. **J. Pathol.**, v. 236, n. 3, p. 265–271, 2015.

MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J. Clin. Virol.**, v. 32, p. 43-51, 2005.

MOORE, P. S.; CHANG, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. **Nature Reviews**, v.10, p. 878-889, 2010.

MOSCICKI, A.B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, Suppl. 3, p. 42–51, 2006.

NASCIMENTO, V. X. Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) in women with cervical intraepithelial neoplasia in Alagoas, Brazil. **Appl. Cancer Res.** v. 32, n. 1, p. 16-20, 2012.

NAMUJJU, P. B. et al. Impact of smoking on the quantity and quality of antibodies induced by human papillomavirus type 16 and 18 AS04-adjuvanted virus-like-particle vaccine – a pilot study. **BMC Res. Notes**, v. 7, n. 445, p. 1-6, 2014.

NATURE, Outlook HPV. Adaptado de: PARKIN, D. M. et al VACCINE. 2006;24 (SUPPL 3):S11–S25. DILLNER, J. et al., BMJ 2008; 377: A1754, WHO/ICO INFORMATION CENTRE ON HPV AND CERVICAL CANCER. SANJOSE, S. LANCET INFECT. DIS. 7 453–459 (2007). HPV: the global burden. **Nature**, v. 288, 2012.

NEJDL, L.; SKALICKOVA, S.; KUDR, J. Interaction of E6 Gene from Human Papilloma Virus 16 (HPV-16) with CdS Quantum Dots. **Chromatographia** , v. 77, n 21, 1433-1439, 2014.

NTOVA, C.K. et. al. Genetic Variability and Phylogeny of High Risk HPV Type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 Gene in Greek Women. **Int. J.Mol. Sci**, v. 13, n. 1-17, 2012.

NUNES, J. D. C. Molecular detection of human papillomavirus in brazilian women with cervical intraepithelial neoplasia in a northeast Brazilian city. **Genet. Mol. Res.** v. 13, n. 4, p. 9077-9085, 2014.

OLIVEIRA, G. R. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.**; v. 35, n. 5, p. 226-232, 2013.

PEREIRA, V. S. S. et al. Herpes simplex virus type 1 is the main cause of genital herpes in women of Natal, Brazil. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** v.161, p. 190–193, 2012.

PERINO, A. et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. **Fertil Steril** v. 95, p.1845–1848, 2011.

PETO, J. et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. **Br. J. Cancer**, v. 91, n. 5, p. 942–953, 2004.

RAMA, C. et al. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 3, p. 411-419, 2008.

REBOLJ, M. et. al. A daunting challenge: Human Papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women below age 30 years. **Eur. J. Cancer**, v. 51 n.11, p. 1456–1466, 2015.

ROCHA, D. A. P. et al. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.** 2013.

RODRIGUES, D. A.; PEREIRA, E.R.; OLIVEIRA, L.S.S.; Prevalência de atipias citológicas e infecção pelo papilomavírus humano de alto risco em mulheres indígenas Panará, povo indígena do Brasil Central. **Cad. Saúde Pública**, v. 30, n. 12, p. 2587-2593, Rio de Janeiro, 2014.

ROMERO-PASTRANA, F. Detection and Typing of Human Papilloma Virus by Multiplex PCR with Type-Specific Primers. **ISRN Microbiol.** v. 2012.

RONCO, G. et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia; a randomized controlled trial. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 3, p. 249-257, 2010.

ROSENBLATT, C. et al. **HPV na prática clínica**. 2005. São Paulo: Atheneu, p. 286.

SALCEDO, M. M. B. P. et al. Prevalence of human papillomavirus infection in pregnant versus non-pregnant women in Brazil. **Arch Gynecol Obstet**, v. 292, p. 1273–1278, 2015.

SANDERSON, M. et. al. Results of a health education message intervention on HPV knowledge and receipt of follow -up care among latinas infected with high - risk Human Papillomavirus. **J. Health Care Poor Underserved**, v. 26, n. 4, p. 1440-1455, 2015.

SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol.**, v. 11, p. 1048–56, 2010.

SAPP, M. et al. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. **J. Gen. Virol.** V. 76, n.9, p. 2407-2412, 2012.

SCHLECHT, N.F. et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, v. 286, n. 24, p. 3106-3114, 2001.

SCHILLER, J. T. et al. An Update of Prophylactic Human Papillomavirus L1 Virus-Like Particle Vaccine Clinical Trial Results. **Vaccine**. v. 19; n. 26, Suppl 10, p. K53–K61, 2008.

SERRAVALLE RAMOS, K. **Estudo do HPV e variáveis sócio-comportamentais em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau**, 2009, 171f, il. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2009.

SHAFTI-KERAMAT, S. et al. Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 77, n.24, p. 13125–13135, 2003.

SHVETSOV, Y.B. Duration and Clearance of Anal Human Papillomavirus (HPV) Infection among Women: The Hawaii HPV Cohort Study. **Clin. Infect. Dis.** v. 48, p. 536–46, 2009.

SICHERO, L. et al. High-grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18 **Int. J. Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 2007.

SILVEIRA, L.M.S. et. al.; Critérios citomorfológicos para o diagnóstico de HPV e sua relação com a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical. **Rev. Bras. Análises Clínicas**, v. 37, n.2, p. 127-132, 2005.

SILVERBERG, M.J. et al. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Obstet. Gynecol.**, v. 101, n. 4, p. 645–652., 2003.

SMITH, J. S. et al. Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. **J. Nat Cancer Inst.** v. 94, n. 21, 2002.

SMITH, E.M.; PARKER, M.A.; RUBENSTEIN, L.M. et al. Evidence for Vertical Transmission of HPV from Mothers to Infants. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.** v. 2010, ID 326369, 7 p., 2010.

SOARES, V.L.; Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. **Trop. Med. Internat. Health** v. 8 n. 7 p. 595-603, 2003.

SOPER, D. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 14, n. 11, p. 830-884, 2006.

STANNARD, L. (1995). Electron micrograph images. Disponível em Virus Ultra Structure: <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>. Acesso em 15 de novembro de 2015

STRAUSS, S.et. al. Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses (HPV): a follow up study. **Sex Transm. Infect.**, v. 79, s. 5, p. 426–427, 2003.

SUN, C. Z. et. al. Characteristics of HPV prevalence among women in Liaoning province, China. **Int. J. Gynecol. Obstetrics**, v. 109, n. 2, p.05–109., 2010.

SZOSTEK, S, et al. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochim Pol.** v. 53, n. 3, p. 603-7, 2006.

TAMEGÃO-LOPES, B.P. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. **Infect. Agents and Cancer** v. 9, p. 25, 2014.

TIMMONS, B.; AKINS, M.; MAHENDROO, M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 6, p. 353–361, 2010;

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics. **CA CANCER J. CLIN.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2012.

TROTTIER, H. et al. Risk of Human Papillomavirus (HPV) Infection and Cervical Neoplasia after Pregnancy. **BMC Pregnancy Childbirth** v. 15, p.244, 2015.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 11–20, 2013.

VIDAL, F. C. B. et al. Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavírus humano: revisão da literatura. **FEMINA**. v.40, n. 5, 2012.

VILLA, L. L. Introduction of HPV prophylactic vaccines: a new challenge for Public Health in the 21st century. *Rev. bras. epidemiol.*v.11, n.3, 2008.

VPD Surveillance Manual, **Human Papillomavirus**: Chapter 5-3, Ed.5, 2011.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 189, n. 1, p. 12-19, 1999.

WEYNAND B, et al. Validation of ThermoFisher's Papspin for human papillomavirus detection in cervicovaginal specimens using PCR with GP5+/GP6+ primers and the Hybrid Capture II assay. **Clin Microbiol Infect**. v. 16, n. 6, p. 671-5, 2010.

WHO. (2008). WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer/Latin America/Brazil. disponível em World Health Organization: <<http://www.who.int/immunization/topics/hpv/en/>>. Acesso em 20 de novembro de 2015.

WHO (2012). Globocan: estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em 2 de fevereiro de 2015.

WONG, A. K. Human papillomavirus genotypes in anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma as detected in tissue biopsies. **Modern Pathology**, p. 144–150, 2010.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S.I.; YOUNG, L.S.; The natural history of cervical HPV: unresolved issues. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 1, 11-22, 2007.

YANG, R. et al. Does human papillomavirus infection do harm to in-vitro fertilization outcomes and subsequent pregnancy outcomes? **Chin. Med. J.** v.126, p.683–687, 2013.

ZHAO, J. Y. et al. Relationship between cervical disease and infection with Human Papillomavirus Types 16 and 18, and Herpes Simplex Virus 1 and 2. **J. Med. Virol.** v. 84, p. 1920–1927, 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.

ANEXOS

Anexo A. Questionário disponibilizado às pacientes

QUESTIONÁRIO DO PACIENTE	
<i>Pesquisa "Associação entre infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e fatores de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas e do câncer cervical".</i>	
N° _____/2014	Data: __/__/__
Unidade de Saúde: Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes - UFAL	Município: Maceió UF: AL
INFORMAÇÕES PESSOAIS	
Prontuário: _____	Cartão SUS: _____
Nome: _____	Idade: _____
Nome da Mãe: _____	
Endereço: _____	
Fone: _____	Profissão: _____ Naturalidade: _____
DADOS DA PESQUISA	
Menarca: _____	Início da atividade sexual: _____
Número de parceiros total, até o presente momento do estudo: _____	
Gestante: () Sim () Não	Quantos meses: _____
Aborto: () Sim () Não	Quantos: _____ Natural () Induzido ()
Número de filhos: _____	Com quantos anos teve o primeiro filho? _____
Parto: Normal () Cessaria ()	Prática sexo anal: () Sim () Não
Prática sexo oral: () Sim () Não	
Uso de anticoncepcionais: () Sim () Não	Tempo: _____ Dosagem: _____
DST prévia: () ignorado () Sim () Não	Qual(is)? _____
Fez algum tratamento? _____	
Tabagismo: () Sim () Não	Tempo: _____ Quantidade: _____
Etilista: () Sim () Não Tempo: _____	
EXAME GINECOLÓGICO	
- Citologia oncótica: () Sim () Não	Resultado: _____
- Colposcopia: () Sim () Não	Resultado: _____
- Histopatologia: () Sim () Não	Resultado: _____

Anexo B. Comitê de ética**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 14/05/2012

Senhor (a) Pesquisador (a), Velber Xavier Nascimento

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 11/05/2012 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 022997/2011-61 sob o título, **Prospecção de variantes de Papilomavírus humano de alto risco associados a neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs) e câncer cervical, através de RFLP e sequenciamento de DNA nos genes L1, E6, E7 e região LCR**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o (a) pesquisador (a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

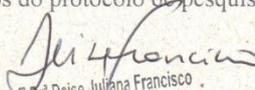
Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até: maio de 2013


Prof.ª Deise Juliana Francisco
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa -UFAL

Anexo C. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntári(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

Eu,, tendo sido convidada a participar como voluntária do estudo **Associação entre infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e fatores de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas e do câncer cervical**, recebi do Sr. Doutor Velber Xavier Nascimento, Mayara Moraes de Brito Mendes e Adenildo Raimundo dos Santos, do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, responsáveis por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo consistirá de exame da região genital e será feito a pesquisa do DNA do vírus HPV, utilizando técnicas de biologia molecular, além de citologia e histopatologia da região genital, em pacientes infectados ou não pelo HPV, sem danos a minha saúde.
- Que a importância deste estudo é a de que terei um resultado da presença ou ausência de infecção por este vírus, e caso venha apresentar infecção pelo HPV serei acompanhada durante um período para realização de novas coletas visando minha cura.
- Que o resultado que se desejam alcançar é evitar o desenvolvimento de câncer cervical e suas lesões precursoras.
- Que esse estudo começará em agosto de 2014 e terminará em maio de 2015.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: As pacientes atendidas em hospitais e clínicas públicas de Alagoas, após terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), terão uma amostra cervical coletada pela médica, com o uso de uma escova ginecológica e em seguida a paciente responderá um protocolo com perguntas importantes para o acompanhamento dela. Caso a paciente apresente infecção por HPV novas coletas serão realizadas e a paciente será acompanhada por um período de dois anos.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Coleta da amostra cervical; Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); Preenchimento de um protocolo; Recebimento do resultado da pesquisa da presença viral do HPV.
- Que não existe nenhum outro meio mais eficaz para se obter um resultado da presença de HPV.
- Que durante a coleta do esfregaço cervical poderei sentir um leve desconforto, porém, sem nenhuma seqüela ou agrave, uma vez que a coleta será realizada por profissionais de saúde nas rotinas ambulatoriais dos consultórios ginecológicos.
- Que como risco, poderei sentir constrangimento ao responder o questionário, por se tratar de perguntas pessoais sobre meu comportamento sexual, porém, todos os dados serão protegidos e confidenciais.
- Que não existe nenhum risco à minha saúde física.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: Acompanhamento por diagnóstico molecular em caso de infecção sendo responsáveis por: Doutor Velber Xavier Nascimento
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: Resultado da presença do vírus HPV.
- Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que eu deverei ser ressarcido por todas as despesas que venha a ter com a minha participação nesse estudo, sendo-me garantida a existência de recursos.
- Que eu serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa, podendo ser encaminhado para Laboratório de Genômica e Proteômica, localizado no Centro de

Velber Xavier Nascimento
Mayara Moraes de Brito Mendes
Adenildo Raimundo dos Santos

Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. A indenização será em dinheiro ou em forma de tratamento dependendo da situação.

- Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a). Velber Xavier Nascimento

Domicílio: Rua Francisco Aguirre Camargo
 Bloco: Ed Antonio Augusto, No. 95, Apartamento 101
 Bairro: Bairro Barro Duro /CEP 57045-450/Cidade: Maceió - Alagoas /Telefone: 82-88010345.
 Ponto de referência: Rua em frente ao primeiro retorno do murilópolis.

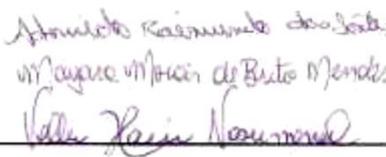
Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Instituição: Universidade Federal de Alagoas
 Endereço: Laboratório de Genômica e Proteômica - Campus Delza Gitaí BR 101 Norte Km 85
 CEP 57100-000 Rio Largo AL, Brasil.
 Telefones p/contato: 3261 2221 Ramal 238

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas
 Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
 Telefone: 3214-1041

Maceió,

	
<p>(Assinatura ou impressão dactiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)</p>	<p>Nome e Assinatura do(s) responsável(ais) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)</p>

**Anexo D. Depósito no Instituto nacional da propriedade intelectual
(INPI)**



19/02/2016 870160005331

13:07



00.000.2.2.15.0858934.2

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 003502 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit.ufal@gmail.com

Dados do Pedido

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): KIT PARA A DETECÇÃO E/OU A TIPIFICAÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Resumo: A presente invenção refere-se a um kit de diagnóstico molecular in vitro que permite a determinação e tipificação do Papilomavírus humano (HPV) em amostras biológicas. A detecção ocorrerá a partir da amplificação do DNA viral presente nas amostras, pela técnica de PCR, utilizando-se iniciadores consenso; enquanto a tipificação será possível pelo emprego do PCR multiplex, caracterizado por apresentar iniciadores específicos para os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 53, 58 e 66, todos de alto risco oncogênico, além de um controle positivo para o gene da imunoglobina humana. A leitura dos resultados caracteriza-se pela adoção do gel de agarose, e consequente visualização das bandas formadas pela amplificação do DNA viral. A implantação do kit permitirá, com sua rapidez e sensibilidade, o estabelecimento de um protocolo de ação que minimizará as intervenções e custos de tratamento, possibilitará um estabelecimento mais preciso dos genótipos de HPV, além de contribuir positivamente para a qualidade de vida das pacientes.

Anexo E. Artigo científico publicado

Applied Cancer Research, 2012;32(1):16-20.

ORIGINAL

Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) in women with cervical intraepithelial neoplasia in Alagoas, Brazil

Velber X. Nascimento¹, Adriana R. Todaro¹, Luíza D. F. de Barros², Paulo P. da Silva¹, João Messias dos Santos¹, Nathália Corrêa C. de Souza², Lúcyo Wagner Torres de Carvalho¹, Eduardo R. Neto³

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the major causative agent of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cancer. The aim of this study was to characterize HPV in women with premalignant lesions and cervical cancer using a PCR/RFLP method. We investigated 34 HPV positive women and with CIN of varying degrees in the period from January 2008 to December 2009. HPV 6b was the most common genotype detected in grade I lesions (CIN I), although other high-risk types such as HPV 53, 31 and 16 were also identified in CIN I. Statistically significant positive relationship was found between the histopathological grade of lesions and HPV risk type. The results reinforce the clinical relevance of HPV genotyping, allowing more accurate monitoring and treatment of patients with risk of developing cervical cancer or injury.

Keywords: papillomavirus infections, polymerase chain reaction, uterine cervical neoplasms.

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted DNA virus, highly prevalent in both genders¹, and can induce the development of benign or malignant epithelial and mucosal tumors. HPV infection is more common among young and sexually active individuals, and 75% to 80% of the population will be infected during their lifetime. Half of all new cases are detected during the first three years of sexual activity^{2,3}.

It is known that HPV infection is strongly related to the development of cervical cancer, as viral DNA is detected in 99.7% of cervical cancer cases worldwide⁴. Cervical carcinoma is the second most common cancer among women worldwide⁵, occurring in more than 500,000 annual new cases worldwide. In Brazil, more than 20,000 new cases of cervical cancer are detected annually, which makes this the third most common malignant neoplasm⁶.

More than 110 genotypes have been cataloged, and HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 are considered high risk due to their association with cervical cancer development. Other types, such as 6, 11, 42, 43, 44 and other rarer are categorized as low risk, as these are usually associated with the development of condylomas⁷.

Since 1995, the International Agency for Research on Cancer considers HPVs 16 and 18 as the causal agent of cervical cancer. Approximately 37,000 deaths have occurred due to this injury worldwide⁸.

The study of the association between HPV infection and the natural history of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions could lead to a more efficient management of women at risk for cervical cancer⁹⁻¹⁰. For example, women with HPV/CIN I present low risk of progression to invasive cancer, not requiring prophylactic and aggressive treatment¹¹⁻¹⁴. On the other hand, women with CIN II or III should be adequately treated, with excision of the lesion at high risk of invasive neoplastic transformation¹⁵.

In order to contribute to a better understanding of the role of HPV infection in the etiopathogenesis of cervical lesions, our aim was to study the prevalence and distribution of HPV types in cervical lesions of varying degrees (CIN I, II and III), including invasive carcinomas, using PCR/RFLP in samples collected in Alagoas, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study

We analyzed 34 cervical smears, all with CIN I, II or III, collected at the *Hospital Universitário de Maceió*, Alagoas, Brazil from July 2009 to January 2010. As criteria

¹ PhD. Laboratory of Genomics and Proteomics Center for Agricultural Sciences Campus Delza Gitaí BR 101 Norte Km 85 CEP: 57100-000 Rio Largo AL, Brazil.

² Msc. Laboratory of Genomics and Proteomics Center for Agricultural Sciences Campus Delza Gitaí BR 101 Norte Km 85 CEP: 57100-000 Rio Largo AL, Brazil.

³ PhD student. Laboratory of Genomics and Proteomics Center for Agricultural Sciences Campus Delza Gitaí BR 101 Norte Km 85 CEP: 57100-000 Rio Largo AL, Brazil.

Send correspondence to:

Velber X. Nascimento.
Rua Francisco Aguirre Camargo, nº 95, Ed Antonio Augusto, Apartment 101, Barro Duro.
Maceio - AL, Brazil. CEP: 57045-450.
Tel: (82) 8152 5850.
E-mail: velberufal@hotmail.com; velberxavier@gmail.com

Submitted: 24/02/2012.
Approved: 16/08/2012.

for study inclusion, women admitted were sexually active and presented genital lesions suggestive of HPV as indicated by cytomorphological diagnosis and/or histopathology. Richart criterion¹⁴ was used for the classification of CIN.

Samples

Samples were collected using endocervical cytobrush and preserved in 0.5 mL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8). Genomic DNA was extracted using the Illustra GFX™ PCR DNA Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) according to the manufacturer's instructions. The DNA was stored at -20°C and its quality and concentration was verified using a mass spectrometer (Genova, Staffordshire, UK).

Detection of HPV

HPV amplification was performed by PCR of a fragment of 450 bp of the late L1 gene, using MY09 and MY11 primers¹⁶. We also used GH20 and PC04 primers which amplify a region of 268 bp of the human β -globin gene, as a control of DNA integrity¹⁷. The analysis of the amplified material was performed by 1.2% agarose gel electrophoresis.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

For viral genotyping, PCR products were subjected to enzymatic digestion with enzymes *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*FI, *Pst*I, *Rsa*I and *Sau*3AI. Fragments generated by enzymatic digestion were subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate, according to Sanguinetti¹⁸. The profiles generated were compared to restriction profiles of different HPV types¹⁹.

Data analysis

Results were initially subjected to a descriptive analysis. The following variables were correlated by nonparametric Spearman test ($p < 0.05$): early sexual activity and the presence of high-risk lesions, early sexual activity and the presence of high-risk HPV type, histopathological grade of lesions and HPV risk type. Bio Stat 5.0 software was used for statistic analysis.

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Alagoas, under n° 017021/2006-17, and all patients signed an informed consent form.

RESULTS

The association between age, menarche, number of sexual partners, sexual activity initiation, alcohol consumption, smoking and other sexually transmitted diseases (STD) are depicted in Table 1. HPV prevalence was higher in women who began sexual activity between 12 and 15 years (50%), 16 to 19 years, 12 cases (35.3%), as compared

to those between 20 to 22 years (14.7%). Among women analyzed, 31 (91.2%) were nondrinkers, 26 (76.5%) did not smoke and only 6 (17.6%) have had prior knowledge of STDs (in this case, HPV).

Table 1. Epidemiological correlates of HPV-positive patients.

Variables	Category	Number of cases	Frequency
Age	15-20	5	14.7%
	21-30	13	38.2%
	31-40	9	26.5%
	41-50	7	20.6%
Menarche	10-12	15	44.1%
	13-16	19	55.9%
Nº of lifetime sexual partners	1-5	30	88.2%
	11-15	3	8.8%
	16-20	1	2.9%
Initiation of sexual activity	12-15	17	50%
	16-19	12	35.3%
Alcoholism	20-22	5	14.7%
	Yes	3	8.8%
Smoking	No	31	91.2%
	Yes	8	23.5%
prior STD	No	26	76.5%
	Yes/HPV	6	17.6%
	Unknown	14	41.2%
	No	14	41.2%

STD: sexually transmitted disease.

Among the 34 HPV-positive cases, HPV 6b was the most prevalent with 13 cases (38.3%) while the other genotypes were detected less frequently (Table 2). Likewise, this was the most common genotype related to low grade lesions (CIN I), only one case of CIN II was positive for 6b (Table 3).

Considering the classification of viral genotypes based on oncogenic risk, 20 (58.8%) cases had HPV of high oncogenic risk and 14 (41.2%) low-risk HPV. All women who participated in the survey had cervical intraepithelial neoplasia (grade I, II or III) or cervical cancer (CC). CIN I was diagnosed in 24 (70.6%) cases, CIN II in 5 (14.7%), CIN III in 4 (11.8%) and a single CCU (2.9%) case.

Among CIN I samples, 45.8% had high risk HPV (Table 3). Concerning the localization of the lesion, the majority was detected on the cervix (29.4%), followed by vagina (23.5%) and vulvar region (23.5%) (Table 4).

No correlation has been found between the onset of sexual activity and the degree of histological lesions ($p = 0.3177$) (Table 5), however, a higher frequency of CIN II was observed in the group of women beginning sexual activity between 12 and 15 years. Additionally, no correlation between the onset of sexual activity and the

Table 2. Distribution of viral genotypes.

HPV type	Number of cases	Frequency
HPV 6b	13	38.3%
HPV 16 variant ¹	3	8.9%
HPV 53	3	8.9%
HPV 16	2	5.9%
HPV58	2	5.9%
HPV 31	2	5.9%
HPV 33	2	5.9%
HPV LVX 100	1	2.9%
HPV 62	1	2.9%
HPV 66	1	2.9%
HPV 53 + 6	1	2.9%
HPV 68	1	2.9%
HPV 52	1	2.9%
HPV 18	1	2.9%

¹ These variants were typed by sequencing.

presence of high-risk HPV was found ($p = 0.2872$), because in all age groups except 12 and 19 years, different types of high-risk HPV were observed.

Positive relationship ($r = 0.3817$) was found statistically significant ($p = 0.0258$) between the histopathological grade of lesions and HPV risk type (Table 5), which revealed that all women with CIN III and the woman who experienced CCU, had high-risk HPV.

DISCUSSION

In this study, the prevalence of HPV genotypes in cervical lesions of different degrees (CIN I, II, III and cervical carcinoma) was evaluated in 34 women from

Alagoas. Other factors were also evaluated as sexual activity initiation, menarche and number of sexual partners.

The onset of sexual activity has been associated with risk of cervical neoplasia and invasive carcinoma²⁰, risk increases twice as much in women with early onset of sexual activity. In fact, in this study we observed that HPV prevalence was also higher in women who reported to start sexual activity earlier. Women who initiated sexual activity between 12 to 15 years of age accounted for 50% of the cases.

All HPV-positive samples were genotyped by RFLP, and HPV 6b was the most prevalent type, being detected in 13 cases (38.3%). This observation emphasizes the high incidence of this viral type in northeastern Brazil and mainly in the state of Alagoas, as evidenced by Castro²¹ who detected HPV 6b in 41% of the samples in Alagoas. From a total of 14 genotypes identified, 12 are classified as being high risk and 2 as low risk. Several studies show that HPV 16 is the most prevalent regardless of the lesion degree^{15,22,23}, while genotype 6b is more often found in low grade lesions, results that were supported by this study, since most of the CIN I were related to this genotype.

Infection with high risk HPV was more commonly observed regardless of the lesion degree, and was detected in all cases of CIN III, and in the single case of invasive carcinoma, as well as in the 4 cases (80%) of CIN II and 11 cases (55%) of CIN I. In a study conducted by Sandri²⁴, all CIN III and invasive cancers were associated with high risk HPV infection. Persistence of infection with high risk HPV is the major etiological factor for cervical cancer and its precursor lesions^{4,25,26}. It has also been described that among adult women (age > 30) 60-80% of low-grade lesions regress spontaneously, however, 20-30% of these lesions progress to cervical cancer. In contrast, in adolescents and young women, high rates of regression (92%) were observed¹⁰.

Table 3. Distribution of viral types in relation to histological diagnosis.

HPV/Category	Type HPV	CIN ¹ I (n = 24)	CIN ² II (n = 5)	CIN ³ III (n = 4)	CC ⁴ (n = 1)	Total (n = 34)
HPV High risk	16 variant	-	1 (20%)	2 (50%)	-	3 (8.8%)
	53	3 (12.5%)	-	-	-	3 (8.8%)
	16	1 (4.2%)	1 (20%)	-	-	2 (5.9%)
	58	1 (4.2%)	-	1 (25%)	-	2 (5.9%)
	31	2 (8.3%)	-	-	-	2 (5.9%)
	33	1 (4.2%)	-	-	1 (100%)	2 (5.9%)
	62	1 (4.2%)	-	-	-	1 (2.9%)
	66	-	1 (20%)	-	-	1 (2.9%)
	53 + 6	1 (4.2%)	-	-	-	1 (2.9%)
	68	-	1 (20%)	-	-	1 (2.9%)
	52	1 (4.2%)	-	-	-	1 (2.9%)
	18	-	-	-	1 (25%)	1 (2.9%)
	HPV Low risk	6b	12 (50%)	1 (20%)	-	-
LVX 100		1 (4.2%)	-	-	-	1 (2.9%)

¹ Cervical intraepithelial neoplasia grade I; ² Cervical intraepithelial neoplasia grade II; ³ Cervical intraepithelial neoplasia grade III; ⁴ Cervical cancer.

Table 4. Relationship between the site of injury with lesion grade.

Site of injury	CIN ¹ I (n = 24)	CIN ² II (n = 5)	CIN ³ III (n = 4)	CC ⁴ (n = 1)	Total (n = 34)
Colo	3 (12.5%)	3 (60%)	3 (75%)	1 (2.9%)	10 (29.4%)
Vulva	8 (33.3%)	-	-	-	8 (23.5%)
Vagina	8 (33.3%)	-	-	-	8 (23.5%)
Vulva e Vagina	4 (16.7%)	1 (20%)	-	-	5 (14.7%)
Colo. Vulva e Vagina	1 (4.2%)	1 (20%)	1 (25%)	-	3 (8.8%)

¹ Cervical intraepithelial neoplasia grade I; ² Cervical intraepithelial neoplasia grade II; ³ Cervical intraepithelial neoplasia grade III; ⁴ Cervical cancer.

Table 5. Correlation between early sexual activity (ESA) and high risk lesions presence (HLRP), early sexual activity and HPV risk type (HRT), and lesion histopathological grade (LHG) and HPV risk type.

Variables	Spearman correlation coefficient (p-value)	
	ESA	HRT
HRLP	-0.1766 (0.3177)	-
LHG	-	0.3817(0.0258)
HRT	0.1879 (0.2872)	-

There was a significant relationship between the degree of histological injury and HPV risk type, because all cases of CIN III and the case of CCU, as well as the majority of CIN II, were related to high-risk HPV. The same was observed by Oliveira-Silva²⁷, whose results indicated a large proportion of women presenting lesions and high risk HPV of different genotypes, concurrently.

However, the presence of high-risk HPV in women with CIN I was also observed, which confirms literature studies involving low-grade squamous intraepithelial lesions and even absence of lesions with high risk HPV^{28,29}. Thus, in this study we observed high risk HPV infection in 45.8% of CIN I cases. Similar results were described by Sandri²⁴, who described high-risk HPV detection in 55.3% of CIN I cases. This reinforces the clinical relevance of the identification of HPV genotypes, allowing a more accurate management and treatment of patients at risk of developing cervical high grade lesion. Sandri²⁴ suggests management of the patients be based on risk stratification, based on the genotype detected. In our study, molecular diagnosis using PCR/RFLP proved to be a sensitive and specific method for the detection of HPV DNA.

The presence of high risk HPV in low-degree lesions highlights the clinical importance of histological diagnosis along with the identification of HPV genotypes. Thus, the molecular test can be used as an additional tool for determining a more efficient therapeutic regimen to be used in the treatment and prevention of cervical cancer especially in developing countries where access to health services is precarious.

REFERENCES

- Soper D. Reducing the health burden of HPV infection through vaccination. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006;14:83084.
- Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.* 2006;106(3 Suppl 1):S2-S9.
- Wiley D; Masongsong E. Human papillomavirus the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv.* 2006;61(6 Suppl 1):S3-S14.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancerworld-wide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- Depuydt CE, Boulet GA, Horvath CAJ, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med.* 2007;11:881-91.
- Ministério da Saúde. Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
- Silva AM, Amaral M, Cruz A. HPV e câncer: o papel do papiloma vírus humano na carcinogênese [periódico on line] *Rev Biotecnol Ciência & Desenvolvimento* 5(29). Disponível em: <URL: <http://www.bioteconologia.com.br/revista/bio29/hpv.pdf>> [2012 maio 12]
- Guanilo MCTU, Moura RF, Conceição CA, Nichiata LYI. Human papillomavirus and cervical neoplasia: scientific production of the countries of Latin America and Caribbean in last 11 years. *DST-J Bras Doenças Sex Transm* 2006;18:58-61.
- Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine* 2005;23:2388-94.
- Higgins GD, Davy M, Roder D. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human Papillomavirus RNA. *Lancet.* 1991;338:910-3.
- Dudding N, Sutton J, Lane S. Koilocytosis: an indication for conservative management. *Cytopathology* 1996;7:32-7.
- Ferenczy A. Management of the atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) smear: what are the options? *Genital Infect Neoplasia (Eurogyn)* 1998;1:12-3.
- Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993;12:186-92.
- Richart RM, Wright TC. Controversies in the management of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 1993;71(4 Suppl):1413-21.
- Schiffman MH, Liaw KL, Herrero R, Sherman ME, Hildesheim A. Epidemiologic suport for a simplified view of cervical carcinogenesis. *Genital Infect Neoplasia (Eurogyn).* 1998;1:2-6.
- Manos MM, Ting T, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital Human Papillomaviruses. *Cancer Cells.* 1989;7:209-14.
- 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;76:1057-62.
- Sanguinette CJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994;17:915-9.

19. Bernard HU, Chan SY, Manos MM. Identifications and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification. restriction fragment length polymorphisms nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994;170:1077-85.
20. Moscicki AB. Natural history of HPV infection in adolescents and relationship to cervical cancer. In: Giordano A, Bovicelli A, Kurman R, editors. *Molecular pathology of gynecologic cancer.* New Jersey; Humana Press; 2007. p.103-11.
21. Castro TM, Bussoloti Filho I, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75:167-71.
22. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1066-1071.
23. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of typespecific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1072-9.
24. Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, Passerini R, Zorzino I, Boveri S, Radice D, Spolti N, Sideri M. Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: prevalence and distribution of different Genotypes. *J Med Virol.* 2009;81:271-7.
25. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Morono V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide prospective. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:796-802.
26. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:342-50.
27. Oliveira-Silva M, Lordello CX, Zardo IM, Bonvicino CR, Moreira MA. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. *Virol J.* 2011;8:4.
28. Martín P, Kilany I, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, Abraira V, Bellas C. Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infectious Dis.* 2011;11:316.
29. Eren F, Erenus M, Bas E, Ahiskali R, Yoldemir T. Prevalence of HPV infection by cytologic diagnosis and HPV DNA extraction and prevalence of the HPV genotypes detected in urban Turkish women. *Int J Gynecol Obstetr* 2010;109:235-8.