



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

DANIEL VALIM DUARTE

**PERFIL DAS MULHERES RIBEIRINHAS COM INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO, COM ÊNFASE NOS TIPOS 16 E 18, EM
POPULAÇÕES DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

BELÉM

2015

DANIEL VALIM DUARTE

**PERFIL DAS MULHERES RIBEIRINHAS COM INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO, COM ÊNFASE NOS TIPOS 16 E 18, EM
POPULAÇÕES DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Prof^a. Máisa Silva de Sousa, Dr.

BELÉM

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

DANIEL VALIM DUARTE

**PERFIL DAS MULHERES RIBEIRINHAS COM INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO, COM ÊNFASE NOS TIPOS 16 E 18, EM
POPULAÇÕES DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovada em:
Conceito:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maisa Silva de Sousa
Orientador - NMT/UFPA

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii
Membro – NMT/UFPA

Prof. Dra. Fabiola Elizabeth Villanova
Membro – NMT/UFPA

Prof. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Membro – NMT/UFPA

BELÉM

2015

Agradecimentos

À minha futura esposa Talitha Buenaño França Guerreiro, pessoa que esteve sempre ao meu lado durante esse mestrado, que me incentivou a crescer no meio acadêmico, que me apoiou e aconselhou nas decisões mais difíceis, que puxou minha orelha quando eu mereci, que limpou minhas lágrimas de desespero quando me encontrava sem saída, e que dividiu de verdade todos os sentimentos que tive durante essa jornada, todo meu amor e agradecimentos a você que foi a melhor coisa que aconteceu na minha vida.

Meus pais, que fizeram de uma forma peculiar a pessoa que sou hoje, e que compreenderam os meus objetivos e sonhos, e mesmo sem estar totalmente certos se era o melhor caminho para mim, me apoiaram nessa cruzada psicologicamente e financeiramente.

À minha professora orientadora Maísa Silva de Sousa, que apostou em mim e abriu as portas, onde muitos fecharam, quando eu era um mero aluno de graduação de licenciatura em ciências biológicas, Travando sempre batalhas árduas ao meu lado para um crescimento profissional mútuo e defendendo vorazmente a nossa causa até mesmo quando eu próprio achava a mesma perdida.

À professora Hellen Fuzzi, a professora mais inteligente e piradinha que eu já conheci, sempre com uma dedicação para ensinar digna de um verdadeiro docente e sempre compromissada com a extensão, fez com que eu crescesse não só como mestrando com seus conhecimentos em biologia molecular, como em pessoa com sua sabedoria e experiência de vida.

Ao pesquisador do IEC Rodrigo Velasco pelas dicas valiosíssimas no projeto ainda em construção e pela disponibilidade quando requisitado.

À Jeniffer e Jaqueline, minhas parceiras de bancada, que dividiam as alegrias em cada reação bem sucedida ou a raiva quando o controle negativo dava positivo.

A Louise Canto, que me deixava sempre por dentro dos assuntos do mestrado e guardava com todo carinho meu material que chegava ao laboratório.

À Dra Elza Baia Brito e Maria da Conceição Nascimento Pinheiro que desenvolveram um trabalho de importância social magnífico com as comunidades ribeirinhas e fez com que este projeto se tornasse possível.

Aos amigos, sempre presentes, para conversar, distrair e aliviar o fardo do mestrado.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelas sábias discussões, por vezes acaloradas, que contribuíram para minha formação no meio acadêmico.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical - NMT, pelos conselhos nas mais diversas áreas da ciência.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) é responsável pela infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo e é reconhecido como principal agente causador do câncer do colo do útero, porém pouco se conhece sobre a prevalência deste vírus em comunidades isoladas da Amazônia. Objetivamos neste estudo identificar, entre mulheres de comunidades ribeirinhas de diversos municípios do Estado do Pará - Brasil, a prevalência geral e específica dos tipos 16 e 18 da infecção pelo HPV, construindo um perfil epidemiológico das mulheres positivas para o vírus e seus tipos em questão. No período compreendido entre fevereiro e dezembro de 2008, foram coletadas amostras de cérvix uterina de mulheres ribeirinhas através de busca ativa para a realização do exame citopatológico. Nestas amostras, foi realizada a pesquisa molecular de HPV através da reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) seguida de uma PCR em tempo real específica para os tipos 16 e 18. Das 353 amostras analisadas, 58 (16,4%) foram positivas para HPV, 8 (2,3%) foram identificadas positivas para o tipo 16 e 5 (1,4%) positivas para o tipo 18 havendo um caso de infecção múltipla pelos tipos investigados. Mulheres abaixo dos 16 anos apresentaram 34,6% taxa de prevalência e mulheres entre 52 e 66 anos taxa de 29,8% ($p = 0,003$), mulheres que relataram possuir único parceiro sexual fixo apresentaram menor prevalência da infecção viral (11,8%) ($p < 0,001$). Houve um aumento relativo na presença viral de acordo com a severidade citológica apresentada ($p = 0,026$). Não foi constatada associação estatística entre os tipos virais 16 e 18 com as variáveis epidemiológicas investigadas. A presença de HPV e seus tipos mais associados ao câncer de colo de útero destaca a importância de ações específicas, voltadas para a prevenção da transmissão e o rastreamento das lesões relacionadas a este vírus, em comunidades ribeirinhas a Amazônia brasileira.

Palavras-chave: HPV. prevalência. PCR. Comunidades Ribeirinhas.

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is the cause of the most common sexually transmitted infection in the world and is recognized as the main causative agent of cervical cancer, but little is known about the prevalence of this virus in isolated communities in the Amazon. We aimed in this study to identify among women in riverside communities of several municipalities in the state of Pará - Brazil, the general and specific prevalence of HPV infection and HPV types 16 and 18, building an epidemiological profile of women positive for the virus and these types. Between February and December 2008, cervical samples riverside women were collected on active search for the Pap smear testing. In these samples, molecular analysis of HPV were performed by conventional polymerase chain reaction (PCR) followed by real-time PCR to diagnose types 16 and 18. Of the 353 samples tested, 58 (16.4%) were positive for HPV, of these 8 (2.3%) were identified positive for type 16 and 5 (1.4%) were positive for type 18 with one case of infection by both types investigated. Women under 16 years had 34.6% prevalence rate and women between 52 and 66 years rate of 29.8% ($p=0.003$), women who reported having only one fixed sexual partner had lower prevalence of viral infection (11.8%) ($p<0,001$). There was a relative increase in viral presence in accordance with the severity cytological shown ($p = 0.026$). There was no statistical association between viral types 16 and 18 with the variables investigated. The presence of HPV and its most associated with cervical cancer types highlights the importance of specific actions aimed at the prevention, transmission and screening of lesions related to this virus in the river communities of the target municipalities.

Keywords: HPV. Prevalence. PCR. River communities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1	Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E) Tardios(L) e região regulatória (LCR).....	18
Figura	2	Árvore filogenética da família <i>Papillomaviridae</i> , evidenciando os gêneros, espécies e tipos.....	21
Figura	3	Ciclo viral associado à Progressão de lesões induzidas por HPV a câncer de colo de útero.....	24
Figura	4	Prevalência total de HPV e prevalência por tipo específico em mulheres com citologia normal no mundo e por continente.....	27
Figura	5	Picos da infecção por HPV e desenvolvimento do câncer de colo do útero em mulheres de acordo com a faixa etária.....	28
Figura	6	Incidência de câncer de colo do útero no mundo em 2012 (todas as idades).....	29
Figura	7	Equivalências de diagnósticos entre a classificação histológica e citológica para resultados de exame de Papanicolaou em lesões cervicais escamosas.....	34
Figura	8	Distribuição das participantes do projeto de acordo com o município investigado.....	41
Figura	9	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores genéricos para detecção da beta globina e HPV.....	44
Figura	10	Exemplo de PCR em tempo real analisado pelo software StepOne v2.0.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	Funções das proteínas dos papilomavirus.....	19
Tabela	2	Distribuição das 353 mulheres que participaram do estudo de acordo com as características sociodemográficas investigadas.....	47
Tabela	3	Distribuição das 353 mulheres que participaram do estudo conforme características sexuais e de história reprodutiva investigadas.....	48
Tabela	4	Distribuição das 353 participantes de acordo com o uso de métodos contraceptivos, realização do PCCU, ingestão de bebidas alcoólicas e hábito de fumar.....	49
Tabela	5	Diagnóstico citológico cervical das 353 mulheres de acordo com a <i>Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais 2012</i>	50
Tabela	6	Prevalência da infecção por HPV de acordo com a faixa etária das mulheres investigadas.....	51
Tabela	7	Prevalência da infecção por HPV de acordo com as características sociodemográficas, comportamentais, história reprodutiva e achados citológicos.....	52
Tabela	8	Características sociocomportamentais e achados citológicos com a infecção por HPV, tipo 16 e 18	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	American Congress of Obstetricians and Gynecologists
AGUS	<i>Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance</i>
ASCUS	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
CCU	Câncer de colo do útero
CDC	<i>Center control disease</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
E	Proteína precoce do HPV
E2F	Gene que codifica fatores de transcrição
E6-AP	Proteínas associadas a E6
FDA	<i>Food and drug administration</i>
G	Teste estatístico
G ₁	Fase da divisão celular
G ₂	Fase da divisão celular
GP5	Oligonucleotídeos iniciadores senso de HPV
GP6	Oligonucleotídeos iniciadores reverso de HPV
GSK	Laboratório produtor de Vacina do HPV
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	<i>Papilomavírus humano</i>
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
IARC	<i>INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IST	Infecção sexualmente transmissível
L	Gene tardio do HPV
LCR	Região regulatória do HPV
LSIL	low-grade Squamous Intraepithelial Lesion
MIX	Mistura de reagentes
MSD	Laboratório produtor de Vacina do HPV

MY09	Oligonucleotídeos iniciadores senso de HPV
MY11	Oligonucleotídeos iniciadores reverso de HPV
NCR	Região não codificadora do HPV
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC I	Neoplasia intraepitelial cervical grau I
NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical grau II
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical grau III
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
ORF	Região codificadora de DNA
P53	Proteína supressora de tumor
PB	Pares de base
PCCU	Preventivo do câncer de colo do útero
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
PDP	<i>Parceria para o Desenvolvimento Produtivo</i>
PNI	Plano nacional de imunização
pRb	Proteína do retinoblastoma
PV	papilomavírus
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
S	Fase da Divisão celular
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento Livre esclarecido
TTAGGG	Sequência nucleotídica
UCM	<i>Universal Collection Medium</i>
UFPA	Universidade Federal do Pará
VLP	Virus like particles
WHO	World Health Organization
X ²	Teste estatístico do qui quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
μM	micromolar
mM	Milimolar
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
g	Gramas
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
pH	potencial hidrogeniônico
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
ng/mL	Nanograma por mililitro
TAE	Tris-Acetato-EDTA
dye	Fluróforo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISAO DA LITERATURA.....	17
2.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	17
2.1.1	TAXONOMIA DO HPV.....	19
2.1.2	CICLO DO HPV.....	22
2.1.3	DIAGNÓSTICO DO HPV.....	24
2.1.4	EPIDEMIOLOGIA DO HPV.....	25
2.2	CÂNCER DE COLO DO ÚTERO.....	28
2.2.1	MECANISMOS DE CARCINOGENESE DO HPV.....	30
2.2.2	PROFILAXIA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	32
2.2.2.1	RASTREAMENTO DA CÉRVIX UTERINA.....	32
2.2.2.2	EDUCAÇÃO SEXUAL.....	34
2.2.2.3	VACINAÇÃO.....	35
3	JUSTIFICATIVA.....	37
4	OBJETIVOS.....	40
4.1	OBJETIVO GERAL.....	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1	TIPO DE ESTUDO.....	41
5.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	41
5.3	QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....	42

5.4	ANÁLISE CITOLÓGICA DO COLO ÚTERINO.....	42
5.5	PREPARAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DO COLO DO ÚTERO.....	42
5.6	PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE HPV.....	43
5.7	PCR EM TEMPO REAL PARA DETECTAR HPV TIPOS 16 E 18	44
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6	RESULTADO.....	46
6.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO.....	46
6.2	CITOLOGIA ONCOLÓGICA DO COLO DO ÚTERO.....	49
6.3	PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO GENITAL POR HPV.....	50
6.4	FATORES ASSOCIADOS A INFECÇÃO POR HPV.....	51
7	DISCUSSÃO.....	54
8	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICES.....	76
	1. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....	76
	ANEXOS.....	78
	1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	78
	2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	79

1. INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus capaz de induzir lesões de pele ou mucosa, em diversas regiões do corpo, tanto malignas quanto benignas. A infecção por HPV é sexualmente transmissível (Ferenczy et al., 2002) e considerada a mais frequente na população sexualmente ativa do mundo, visto que a grande parte das pessoas são expostas ao vírus em algum momento de suas vidas (San Jose et al., 2007).

A infecção causada pelo HPV é, geralmente, assintomática e efêmera (Moscicki et al., 2004), possuindo uma evolução limitada e frequentemente regredindo espontaneamente em no máximo 18 meses em mulheres imunocompetentes (Roden et al., 2004). Entretanto, diversos fatores podem fazer com que ocorra a integração do DNA viral ao genoma da célula infectada, sendo este o primeiro passo da carcinogese para o desenvolvimento do câncer do Colo do Útero (CCU), sendo a infecção viral necessária, porém não determinante para a formação deste tipo de câncer (Moore et al., 2004; Bosch et al., 2002).

Características comportamentais, como o início precoce da vida sexual, a multiplicidade de parceiros, o não uso de preservativos, o hábito de fumar, o uso de contraceptivo oral, além de características genéticas intrínsecas do hospedeiro, associadas à ausência ou ineficiente cobertura pelo exame preventivo de colo do útero, apontam para um aumento no risco de desenvolvimento do CCU. No entanto, o fator carcinogênico mais importante para este câncer é a infecção pelo HPV e o tipo do vírus que está infectando o epitélio do colo do útero (Kanodia et al., 2007; Levi et al., 2002; Nobbenhuis et al., 1999; Pinto et al., 2002).

Dentre os 189 tipos de papilomavírus descritos por Bernard et al, (2010), 120 tem capacidade de infectar o ser humano. Muñoz et al, (2003) descreveu que apenas 40 tipos de HPV capazes de infectar o trato ano-genital, dentre estes, somente alguns tem grande potencial de induzir a formação de tumores malignos no epitélio do colo do útero, conhecidos como HPV de alto risco oncogênico ou apenas HPV de alto risco. Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico, raramente são encontrados em mulheres que

desenvolveram o câncer do colo do útero, porém são considerados a principal causa do aparecimento de verrugas no trato ano-genital, conhecidas como condilomas acuminados (Middleton et al., 2003). O conceito de risco baixo ou alto de desenvolver câncer de colo uterino, é apoiado por muitos estudos epidemiológicos e de caso-controle, que têm destacado a forte associação entre os tipos virais de alto risco e lesões precursoras do câncer e o próprio câncer (Bosch et al., 1995; Munoz, et al., 2000).

Os tipos de HPV envolvidos em infecções da região do trato ano-genital podem ser classificados, de acordo com a sua capacidade de gerar neoplasias malignas e recentemente a agência internacional para a pesquisa do Câncer (IARC) definiu 12 genótipos de HPV alto risco oncogênico como carcinógeno de humanos (grupo 1), esta categoria é atribuída a agentes e substâncias quando há evidências suficientes da carcinogenicidade dos mesmos, em humanos, pertencem a esta classificação os HPV dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59 (Bouvard et al., 2009) e, dentre estes, destacam-se os tipos 16 e 18, encontrados em mais de 70% das mulheres que desenvolveram o câncer do colo do útero (Clifford et al., 2006; Zur Hausen 2002; Bosch et al., 2002; Govan et al., 2008; Simonella et al., 2013; Li et al., 2011).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)

Os *Papilomavírus* (PV) constituem um grupo de pequenos vírus de DNA, pertencentes à família *Papillomaviridae* (De Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010), tais vírus podem infectar diversos animais, como, mamíferos, aves, tartarugas, cobras, entre outros, recebendo nomes específicos utilizando-se das iniciais do hospedeiro (ICTV 2004; Salvia 2004; De Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2005), sendo conhecido como (papilomavirus humano – HPV) apenas o grupo viral que tem a capacidade de infectar humanos (Doorbar et al., 2006 De Villiers et al., 2004). Em humanos são capazes de induzir grande diversidade de lesões proliferativas (Munger et al., 2004; Bernard et al., 2005).

Os papilomavírus possuem um genoma de DNA dupla fita, de formato circular, não envelopado, com simetria icosaédrica e é constituído de aproximadamente 8000 pb além de possuírem um peso molecular aproximado de $5,2 \times 10^6$ Da (Doorbar et al., 1986 e Komly et al., 1986). Os genes da família deste vírus estão circundados por um capsídeo, que possui um diâmetro variando entre 40 a 55 nanômetros. O capsídeo dos papilomavírus possuem 72 subunidades, denominadas capsômeros, formadas por duas proteínas estruturais L1 e L2 (Modis et al., 2002).

No genoma viral, representado na Figura 1, existem três regiões, que são identificadas e caracterizadas como: região que codificará as proteínas produzidas precocemente (*Early - E*) onde se concentram os genes E1 à E8, a região que codificará as proteínas que serão produzidas tardiamente (*late - L*) onde se localizamos genes L1 e L2, que constituem os capsômeros, e a região NCR (*non-coding region*) ou LCR (*long control region*) onde estão contidos os elementos que fazem a regulação da replicação e da expressão gênica do vírus (Munger et al., 2004; Sousa et al., 1990).

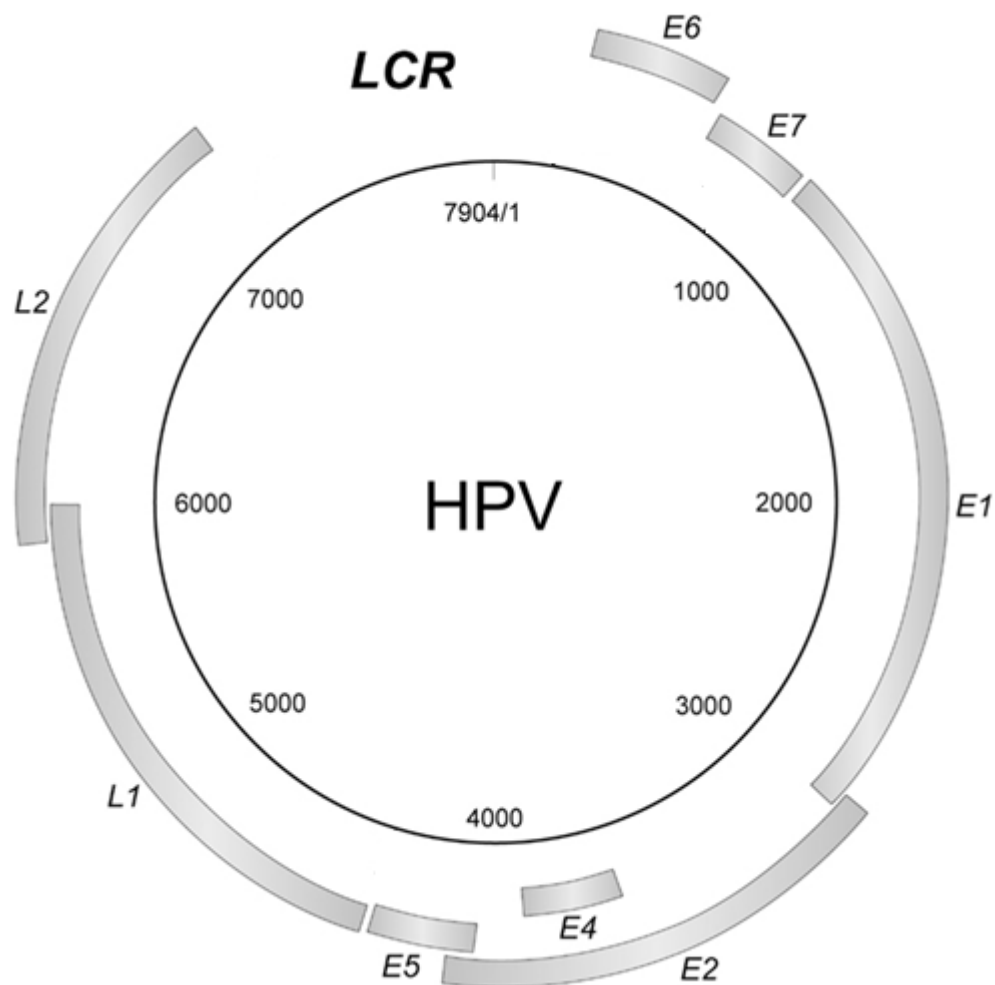


Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E) Tardios (L) e região regulatória (LCR). Adaptado de Kajitani et al.,2012.

Na região precoce – E e tardia – L , que representam cerca 85% do material genético, estão contidas as ORF (*Open Reading Frames*) do vírus, conhecidas como regiões codificadoras do genoma. Os genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2, já foram descritos como responsáveis por realizar funções importantes para o papilomavírus, tais funções estão descritas resumidamente na tabela 1. Os genes E3 e E8 não estão presentes em todos os tipos de HPV e seus produtos e funções ainda não estão elucidados (Gomez et al., 2007; Howley., 2006).

Tabela 1: Funções das proteínas dos Papilomavírus.

Proteína	Funções ¹
E1	Necessária para replicação viral por reconhecer e ligar-se a sítios de origem e possuir DNA helicases.
E2	Principal regulador da transcrição viral; envolve-se na replicação viral interagindo com E1.
E4	Age tardiamente no ciclo viral, induzindo parada de G2; Acredita-se que facilite a montagem e liberação de vírus.
E5	Induz a proliferação celular não programada; pode ativar os receptores de fator de crescimento e outras proteínas quinases; inibe a apoptose.
E6	Induz a síntese de DNA; interage com quatro classes de proteínas celulares: co-ativadores transcricionais, proteínas envolvidas na polaridade e motilidade celular, supressores de tumor e indutores da apoptose, principalmente p53, e fatores de reparação de replicação do DNA.
E7	Induz a proliferação celular não programada; interage com os reguladores negativos do ciclo celular e supressores de tumor, principalmente pRb.
L1	Principal proteína estrutural do vírus; interage com L2; interage com os receptores celulares; codifica epítomos neutralizantes.
L2	Proteína estrutural viral secundária; acredita-se facilitar a montagem da partícula viral; pode interagir com os receptores celulares; codifica os epítomos neutralizantes.

¹Algumas funções de proteínas virais foram relatadas em culturas celulares ou sistemas experimentais, enquanto outras foram observadas *in vivo*. Adaptado de IARC (2007)

2.1.1 TAXONOMIA DO HPV

Taxonomia moderna tem como objetivo compreender as relações de partículas biológicas, tais como os vírus, com base na sua história evolutiva e similaridade genética, e não somente através de suas características fenotípicas (Bernard et al., 2005). Originalmente os *Papilomavírus* pertenciam a um taxon que, juntamente com os *Polyomavirus*, constituíam a família *Papovaviridae* devido a semelhança de seus capsídeos não envelopados de formato icosaédrico e de seu genoma, composto de uma cadeia de DNA dupla fita (Bernard et al., 2005), esta classificação persistiu até o sétimo relatório do

Comitê Internacional de Taxonomia Viral – ICTV (Van Regenmortel et al., 2002) que ocorreu em 1999, quando esses grupos foram separados em famílias distintas por apresentarem diferença significantes no tamanho e na organização de seus respectivos genomas (De Villiers et al., 2004).

Atualmente a nova taxonomia dos papilomavírus, foi ratificada pela ICTV no 8º Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de vírus, e considera o grupo viral em questão pertencente à família *Papillomaviridae* (Fauquet et al., 2005). Tradicionalmente o HPV é descrito em tipos e espécies, que pertencem a diversos gêneros representados por letras do alfabeto grego (alfa, beta, gama...), com a progressiva descoberta de novos gêneros, superando o número de letras gregas existentes, convencionou-se colocar o prefixo “dys” seguido de letras gregas para manter o sistema de nomenclatura do taxon (Bernard et al., 2010). Em um nível taxonômico mais baixo os papilomavirus são classificados em, sub-tipos e variantes (De Villiers et al., 2004).

Segundo estudo conduzido por Bernard et al, (2010) já foram encontrados e descritos 189 tipos de papilomavírus e 120 foram isolados em humanos, sendo considerados portanto HPV. O gênero mais importante de papilomavírus, do ponto de vista clínico em humanos, é o alfa-papilomavirus, pois nele se encontram todos os tipos virais considerados de alto risco oncogênico e a maioria que estão associados a lesões de mucosa e cutâneas encontradas no trato ano-genital (Bernard et al., 2010; De Villiers et al., 2004; Fauquet et al., 2005), porém tipos notadamente importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico, 16 e 18, aparecem em braços relativamente distantes dentro da árvore filogenética (Figura 2). A figura 2 apresenta a árvore filogenética dos papilomavirus descritos até o momento do estudo conduzido por Bernard et al (2010).

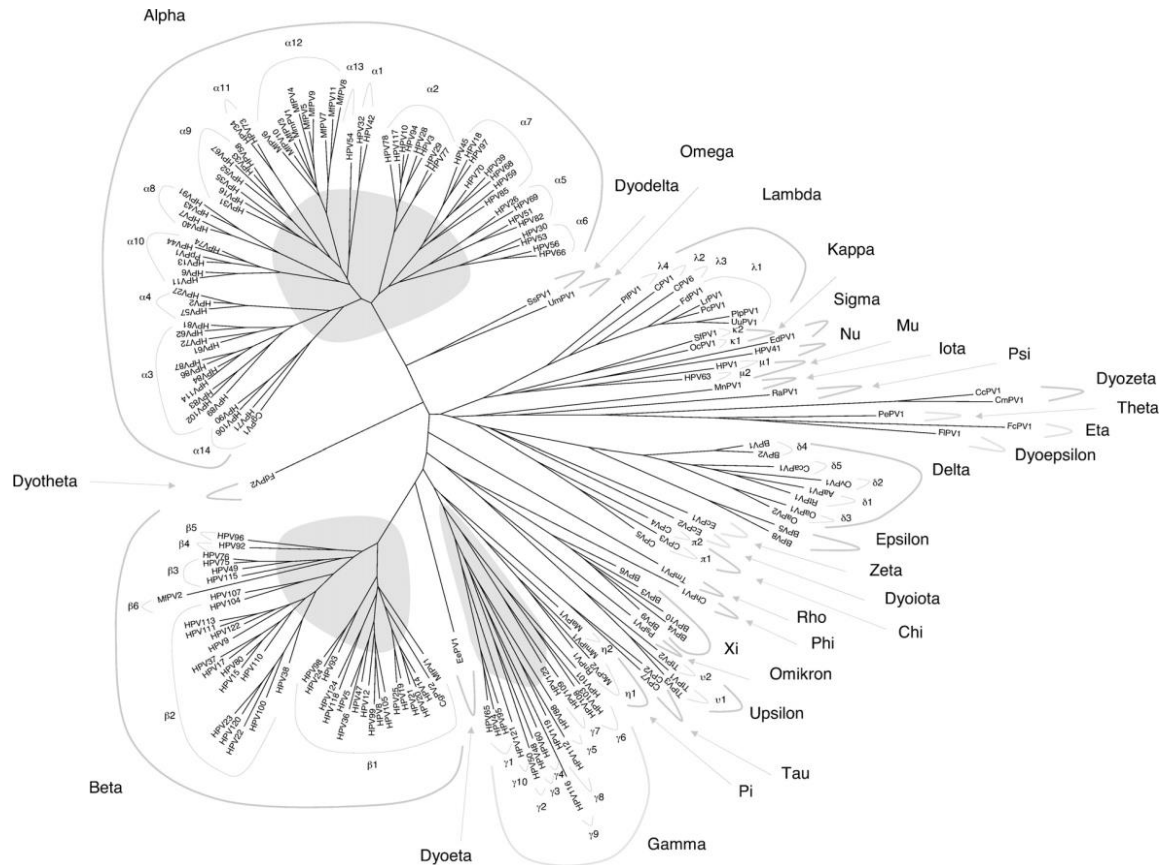


Figura 2: Árvore filogenética da família *Papillomaviridae*, evidenciando os gêneros, espécies e tipos. Fonte: Bernard et al., 2010.

A classificação taxonômica que define hierarquicamente: gêneros, espécies, tipos, sub-tipos e variantes dos papilomavírus é feita na semelhança de seu material genético contido no gene L1 com algumas propriedades médicas e biológicas (Bernard 2010 et al., Chan 1995 De Villiers et al., 2004). Atualmente foi definido pelos cientistas que trabalham com a taxonomia do HPV que variações menores de 2% entre os genes L1, significam variantes de um mesmo tipo de HPV, já diferenças de 2% a 10% definem sub-tipos do vírus (ex. HPV6a, HPV6b, HPV6c....) e acima de 10% como novos tipos de HPV (Bernard et al., 2005;De Villiers et al., 2004).

Os tipos de HPV são numerados de acordo com a ordem que são identificados e descritos, por conseguinte o HPV tipo 1 foi o primeiro HPV identificado e descrito em 1982 por Danos et al, enquanto o HPV tipo 16, o mais importante do ponto de vista clínico e epidemiológico, foi descrito 3 anos mais tarde, em 1985 por Seedorf et al, após os 15 tipos que o antecedem, e assim sucessivamente (Bernard et al., 1994;Bernard et al., 2005; De Villiers et

al., 2004), até o tipo 124 que foi descrito por Chen et al, porém ainda está em processo de publicação (Bernard et al., 2010).

2.1.2 CICLO DO HPV

A infecção pelo HPV, na região da cérvix uterina, é iniciada quando a partícula viral penetra nas células basais do epitélio através de microlesões, ocasionadas principalmente pelo ato sexual, a partir deste momento a infecção pode se tornar latente, onde ocorre o ciclo produtivo do vírus, em que o HPV permanece na célula em sua forma episomal, sem causar nenhuma anormalidade ou sintoma clínico e replicando-se de acordo com a replicação celular do hospedeiro, permanecendo com seu DNA circular íntegro e em baixo número de cópias (50 – 100) para estabelecer uma infecção persistente (McMurray et al., 2001).

O HPV infecta exclusivamente células que são capazes de realizar mitose e por isso tem um tropismo pelo tecido epitelial, tal característica esclarece o fato dos carcinomas escamosos e dos carcinomas glandulares se originarem na junção escamocolunar e dentro da zona de transformação, pois nesses locais existem uma via imediata às células basais e parabasais do epitélio metaplásico (Munger et al., 2004). As células basais infectadas, ao se multiplicarem, espalham-se lateralmente, algumas dessas células migram para camadas supra basais onde o DNA viral será replicado e as proteínas do capsômero serão formadas para a formação e posterior liberação das partículas virais de acordo com a descamação natural dos queratinócitos mais superficiais, podendo estas partículas infectar células próximas e assim reiniciando o ciclo (Ramos, 2009).

Os mecanismos que levam a infecção latente a uma infecção ativa e que é capaz de provocar lesões ainda não foram totalmente elucidados, porém já se sabe, que a carga viral e o tipo de HPV presente são pontos cruciais no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (Kjaer et al., 2006), e que a imunodepressão também pode levar a infecção se tornar ativa, como também uma regressão ao estado latente ou remissão quando o restabelecimento da imunocompetência (Carvalho et al., 2000). Dados revelam que mulheres imunocomprometidas, por possuírem o Vírus da imunodeficiência humana -

HIV, têm cerca de dez vezes mais chances de desenvolverem lesões uterinas associadas ao HPV, que são precursoras do câncer do colo do útero, do que aquelas que não apresentam o HIV (Zimmermann *et al.*, 2006).

Grande parte das infecções por HPV é transitória e assintomática (Moscicki *et al.*, 2004). Em mulheres jovens e imunocompetentes, a infecção pelo vírus pode persistir por até 18 meses, até serem eliminadas de forma espontânea pelo sistema imunológico (Roden *et al.*, 2004). No entanto, fatores como, a persistência da infecção, uma alta carga viral, a presença de tipos de alto risco oncogênico do vírus, associadas ou não a um estado de imunodepressão, podem fazer com que ocorra a transformação da forma episossomal para a forma em que parte do DNA viral estará integrado ao genoma de células do hospedeiro (Schlecht *et al.*, 2003; Ramanakumar *et al.*, 2010).

O processo de integração do DNA viral no genoma do hospedeiro é essencial para a progressão de lesões pré-cancerosas ao câncer invasivo e ocorre a partir da ruptura do DNA circular do vírus na porção E2, conseqüente linearização do material genético e posterior inserção no genoma do hospedeiro. Esta ruptura acarreta na interrupção do processo de regulação negativa da transcrição viral, função atribuída a E2 (Howley *et al.*, 1996), ocorre então, a síntese contínua e superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7, propiciando a imortalização e à malignização das células atingidas (NAGAO *et al.*, 2002; Ramanakumar *et al.*, 2010; Ramos 2009). Na figura 3 é descrito resumidamente o ciclo viral e as diversas etapas até o desenvolvimento do câncer invasivo.

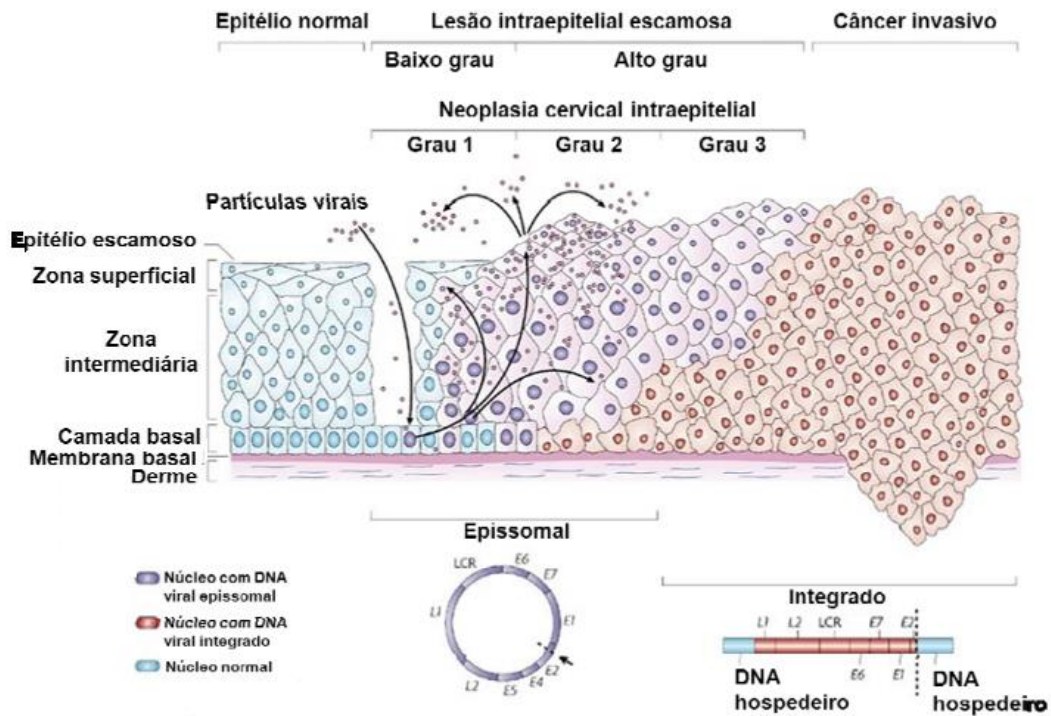


Figura 3: ciclo viral associado a progressão de lesões induzidas por HPV a câncer de colo de útero. Adaptado Diniz (2010)

2.1.3 DIAGNÓSTICO DO HPV

O diagnóstico da infecção por HPV considera principalmente a pesquisa direta do vírus. O histórico, exames físicos e complementares, além das alterações celulares ou teciduais provocadas pela infecção viral (células paraceratóticas, escamas anucleadas, colicitose), são etapas clínicas importantes no combate do HPV e do CCU, porém o diagnóstico viral só pode ser dado através de exames moleculares onde há detecção do DNA viral. Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico do papilomavirus, destacam-se:

- Reação em cadeia mediada pela Polimerase (PCR): É uma técnica de biologia molecular que consiste na amplificação exponencial de um fragmento de DNA viral alvo, utilizando sequências nucleotídicas consenso (MY09/11, GP5/6...) a partir de material biológico. Este exame, altamente sensível, é capaz de detectar a infecção por HPV, mesmo em mulheres assintomáticas, e tem sido utilizado

mundialmente como padrão ouro como exame diagnóstico para o vírus (Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia 2002. Kaneshima et al., 2001; Clifford et al., 2006).

- A Captura Híbrida II (CH2): é um ensaio diagnóstico qualitativo e quantitativo simples, rápido, seguro que utiliza células esfoliadas obtidas do trato genital feminino que se baseia na hibridização de sondas de RNA de 18 tipos de HPV que mais comumente infectam o trato anogenital com os tipos do vírus presentes na amostra. Os híbridos formados são detectados pela reação enzima-substrato e posterior leitura através da quimioluminescência (Cremonesi et al., 2004).

Até meados da década passada o rastreamento do câncer de colo de útero foi realizado, em diversos países, utilizando o exame de Papanicolaou (Kitchener et al., 2006), não obstante, após o surgimento das técnicas moleculares para detecção direta do DNA do HPV, tornou-se inquestionável que os achados citológicos não são indicadores sensíveis da presença viral (IARC, 2007), além de possuírem baixa reprodutibilidade e demandarem muito trabalho (Kitchener et al., 2006).

Atualmente, muitos outros exames diagnósticos alternativos estão disponíveis (Dot blot, Southern blot, Hibridização *in situ*...). Existem também metodologias adicionais e variações da PCR capazes de detectar também os tipos específicos do HPV, como a PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada tipo viral, o Polimorfismo de Fragmento de Restrição (RFLP), o sequenciamento direto a partir de produtos de PCR, entre outras (Nobre et al, 2008; Clifford et al., 2006; Vila e Denny 2006, BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011).

2.1.4 EPIDEMIOLOGIA DO HPV

Já é consenso na literatura mundial, pela vasta quantidade de estudos epidemiológicos, clínicos e moleculares existentes, que o desenvolvimento do câncer de colo do útero está ligado às infecções persistentes por tipos de alto risco oncogênico de HPV e à carga viral dos mesmos, antecedido por um longo

período de latência (Sellors & Sankaranarayanan, 2003 ; Bosch et al 2002; Wallin et al., 1999; Dalstein et al., 2003; Carcopino et al., 2006). O HPV 16 é o tipo de alto risco com mais que o dobro de chances de provocar o desenvolvimento do câncer de colo do útero ou lesões que podem desencadear este câncer em mulheres que apresentam citologia normal, em comparação a todos outros tipos de alto risco juntos (Kjær et al., 2010).

A Organização Mundial de Saúde (WHO/ICO 2007) também já ratificou a infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico como o principal fator de risco para o de câncer do colo do útero. Segundo análises conduzidas por Munoz et al 2004, que avaliou a prevalência dos tipos de HPV em mulheres com câncer de colo do útero de 12 estudos em 25 países e Smith et al 2007, que analisou 14500 casos de câncer em 89 estudos e Li et al 2011, que pesquisou 30848 casos de câncer através de 243 estudos, averiguou-se de forma unânime que pelo menos 89% dos casos de câncer estavam infectados por apenas oito tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58), e apenas os tipos 16 e 18 eram responsáveis por mais de 70% dos casos verificados, esses dois tipos também são respectivamente os mais prevalentes no mundo em mulheres sem alterações no colo do útero (Munoz et al., 2004 Smith et al., 2007 e Li et al., 2011).

A agência internacional para a pesquisa do Câncer publicou um compilado de estudos (IARC, 2012) indicando em mulheres com a citologia do cérvix uterino normal a prevalência geral mundial e por continente (com exceção da oiania) dos HPV e os 5 tipos-específicos mais presentes, nele foi encontrado a taxa 10% mulheres infectadas por algum tipo de HPV e evidenciou-se também o tipo 16 como mais presente em todos os continentes (figura 4).

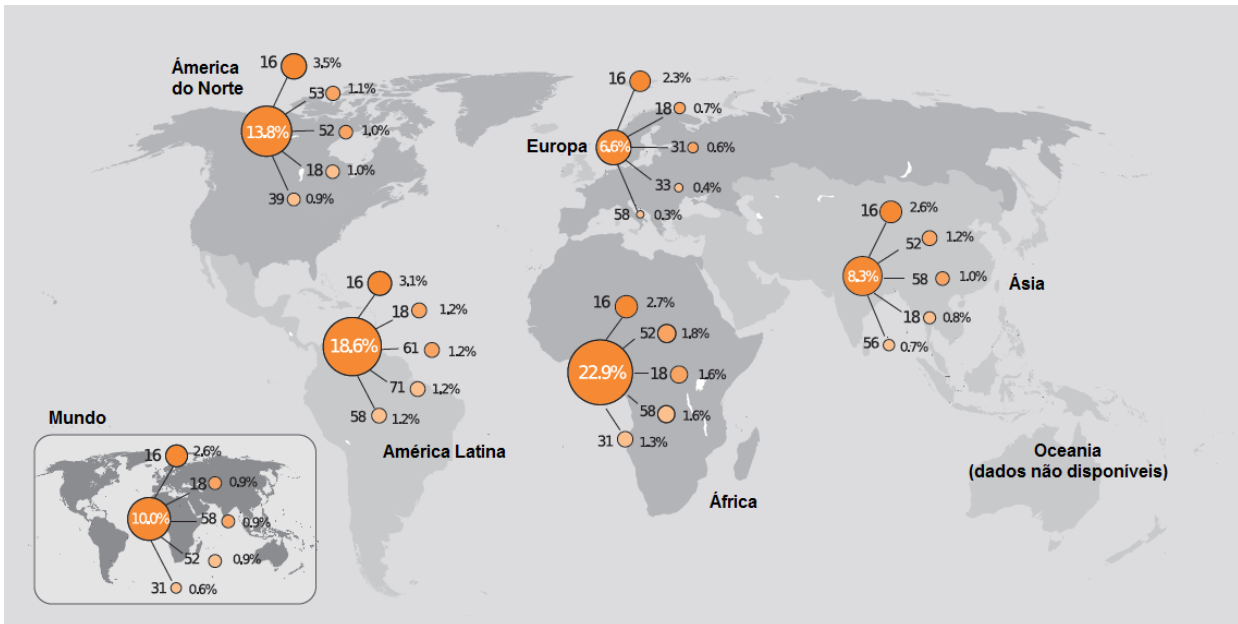


Figura 4: prevalência total de HPV e prevalência por tipo específico em mulheres com citologia normal no mundo e por continente. Modificado de IARC, 2012.

A infecção por HPV tem o seu pico de prevalência entre adolescentes e mulheres jovens, este fato deve-se por este ser o grupo etário onde se inicia a vida sexual, sendo intrínseca a eles, a maior frequência de atividade sexual, variabilidade de parceiros, a busca por novos parceiros, uso irregular de métodos profiláticos e fragilidade da cérvix uterina no início da vida sexual, além de traços comportamentais desse grupo etário, que geralmente não procura os serviços de saúde com a mesma regularidade que as mulheres de grupos etários superiores para fins preventivos (Pinto et al., 2011).

O pico do desenvolvimento de lesões precursoras do câncer do colo uterino ocorre entre mulheres de meia idade em razão de uma provável ativação da infecção latente do HPV, a lenta diminuição da imunidade tipo específica depois da menopausa, além da possível aquisição de novas infecções virais provenientes de novos parceiros sexuais (Trotier et al., 2006). A figura 5 mostra de os picos de infecção por HPV e desenvolvimento do câncer de colo do útero de acordo com a faixa etária das mulheres em geral.

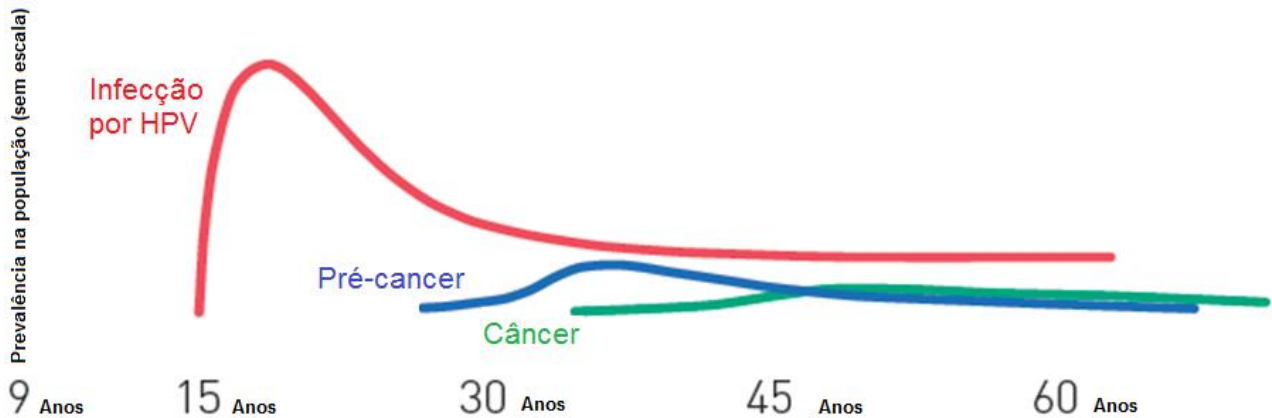


Figura 5: Picos da infecção por HPV e desenvolvimento do câncer de colo do útero em mulheres de acordo com a faixa etária. Adaptado de WHO, 2013.

2.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Segundo a organização mundial da saúde (WHO 2012) estimativas mundiais apontam aproximadamente 528 mil novos casos desse câncer, 1,5 milhões de casos prevalentes em 5 anos e 266 mil mortes de mulheres em consequência deste câncer em 2012 sendo responsável por 7,5% das mortes causadas por câncer em mulheres no mundo. O CCU configura-se como o quarto tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo, e já é considerado como a principal causa de mortes, relacionadas ao câncer, em muitos países em desenvolvimento (WHO 2012; Parkin et al., 2005), como exemplo temos que no continente africano o câncer do colo uterino corresponde a 21,3% das neoplasias malignas em mulheres em contraste com a Europa, onde esse valor é de 3,6% (Ferlay et al., 2013). A figura 6 apresenta o mapa com incidência do câncer de colo do útero nos diversos países do globo no ano de 2012.

A incidência do CCU é cerca de quatro vezes maior em países em desenvolvimento quando comparada aos países desenvolvidos e 87% das mortes atribuídas a esta doença ocorrem também em países emergentes (Ferlay et al., 2013). Em geral, há uma grande variação na sobrevivência de pacientes com CCU de acordo com o nível de desenvolvimento dos serviços de saúde primário dos países e o estágio clínico em que a neoplasia se encontra, a taxa de sobrevivência de 5 anos chegou a menos de 25% em mulheres

negras em Uganda (Gondos et al., 2005), enquanto em países desenvolvidos a mesma taxa variou entre 60% e 75% (Sant et al., 2003; Ries et al., 2008).

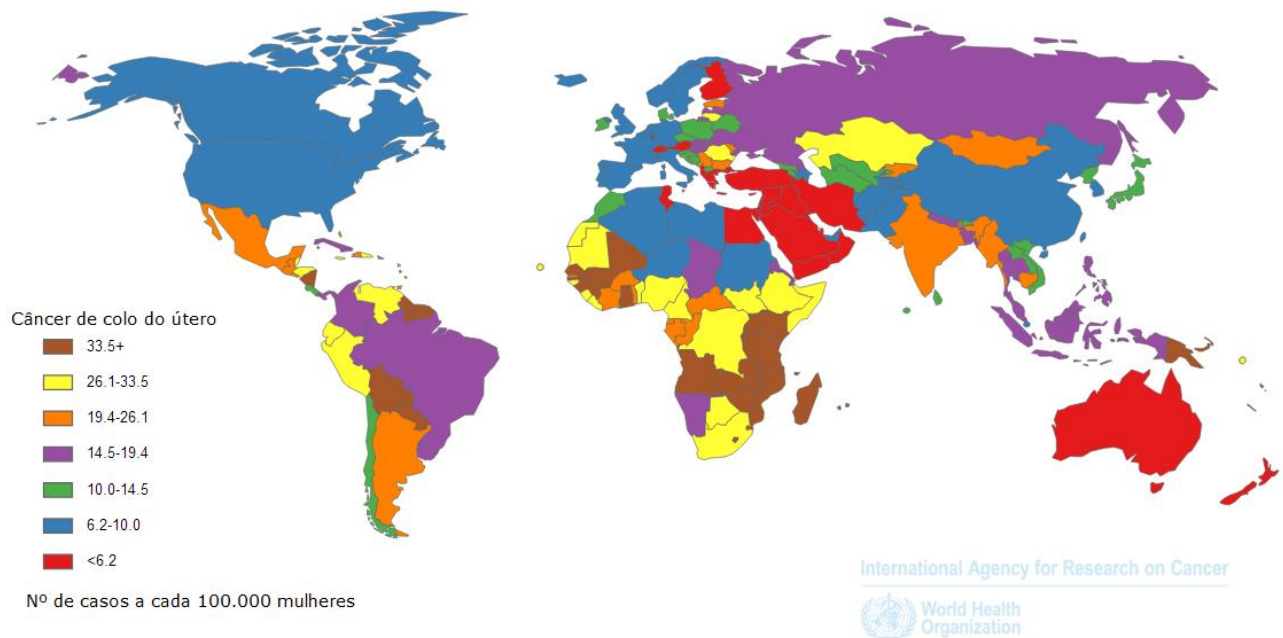


Figura 6: incidência de câncer de colo do útero no mundo em 2012 (todas as idades). Adaptado de IARC GLOBOCAN 2012

De acordo com a estimativa de Instituto Nacional do Câncer no Brasil – INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2014), para o ano de 2014, espera-se 15.590 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres, tornando o câncer de colo do útero a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres no país, sendo superado pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama.

A região Norte possui o maior índice de incidência CCU em comparação as outras regiões do Brasil 23,57 casos a cada 100 mil mulheres. No Pará estima-se que a taxa bruta de incidência do CCU seja de 21,13 a cada 100 mil mulheres, sendo o câncer de maior frequência entre as mulheres do Estado, excluindo o câncer de pele não melanoma e superando a média nacional entre os estados que é de 15,33 a cada 100 mil mulheres. Em Belém, também segundo o INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2014, estima-se que a taxa de incidência bruta do CCU de 34,57 para cada 100 mil mulheres, muito acima da média entre as capitais brasileiras, que é de 19,20 a cada 100 mil

mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2014), equiparando-se com as piores taxas de incidência deste câncer no mundo. Tais números associados a outros estudos epidemiológicos de HPV (Pinto et al., 2011; Duarte et al., 2010; Noronha et al., 2011) revelam uma situação que inspira cuidados especiais quanto ao diagnóstico e rastreamento de mulheres sexualmente ativas com HPV na região.

2.2.1 MECANISMOS DE CARCINOGENESE DO HPV

Nos tipos de HPV de baixo risco oncogênico a replicação de seus genomas é realizada em separado da replicação do genoma humano (epissomal), porém nos tipos de alto risco pode ocorrer a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro a partir da quebra do DNA circular do vírus em E2 e conseqüente perda do controle da repressão transcricional do vírus, que é essencial no processo de carcinogênese (Aide et al., 2009). Os principais mecanismos oncogênicos do vírus já foram elucidados e estão ligados diretamente às funções das oncoproteínas E6 e E7 do HPV quando super-expressas (IARC 2007).

A propriedade mais conhecida das oncoproteínas E6 de HPV de alto risco é a capacidade de se ligar e degradar a proteína supressora de tumor p53 através do recrutamento de proteínas E6-associadas (E6-AP) por uma ligação ubiquitina-dependente (Wallin et al., 1999; Scheffner et al., 1990; Huibregtse et al., 1993). Tal fato resulta na inibição da atividade de transcrição de p53, sendo este um fator de transcrição que estimula genes relacionados a interrupção do ciclo celular e atividade apoptótica (Diniz 2010). Tal característica é relatada apenas em HPV de alto risco oncogênico, pois testes já foram realizados em tipos de baixo risco que codificam E6, e neles não há interação eficiente com p53 nem sua inativação pelo mesmo mecanismo (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990).

O gene E6 também pode induzir, por mecanismos ainda desconhecidos, a expressão e atividade da telomerase, responsável pela conservação dos telômeros, (Kawai et al., 1998). Em células humanas, os telômeros são trechos de DNA que consistem em inúmeras sequências nucleotídicas TTAGGG que durante a divisão celular são encurtados

promovendo a senescência celular, sendo a enzima telomerase responsável pela manutenção íntegra dos telômeros e consequentemente imortalidade da célula (Diniz 2010; Sterbergen et al., 2001).

A E7 é uma oncoproteína de baixo peso molecular e não possui atividade enzimática própria, e assim como proteínas de outros pequenos vírus precisam se associar com complexos protéicos celulares modificando suas funções originais (Munger et ., 2004). As proteínas E7 se associam a várias outras proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular, entre elas destacam-se a proteína supressora de tumor do retinoblastoma – pRb causando sua degradação, e consequente perda do controle sobre os fatores de transcrição da família E2F, que controlam a progressão do ciclo celular entre as fases G1 e S, resultando em imortalização e proliferação celular não programada e eventualmente no desenvolvimento de câncer (Boyer et al., 1996; Munger 2001; Dyson et al., 1989). Estudos realizados demonstram que as proteínas E7 de tipos virais de alto risco oncogênico possuem maior eficiência na interação e desestabilização da pRb quando comparado com tipo de baixo risco (Gage et al., 1990; Munger et al., 1989).

Assim as oncoproteínas E6 e E7 dos tipos de HPV de alto risco oncogênico, quando em conjunto e super-expressas, podem facilitar a imortalização e proliferação não programada de células epiteliais escamosas primárias pela degradação de proteínas que regulam a supressão de tumores, (Silva et al., 2003). Estudos também relatam o papel sinérgico da oncoproteína E5 com E6 e E7, provocando um aumento no potencial de proliferação e imortalização celular (Stoppler et al., 1996 Valle & Banks, 1995), assim como inibição da apoptose em determinados tipos de HPV (Kabsch & Alonso, 2002 e Zhang et al., 2002). Também já está estabelecido que a contínua expressão destas oncoproteínas, causada pela infecção persistente do vírus, podem possibilitar o aparecimento de um conjunto de aberrações genômicas em nível celular, o que resultará na formação de neoplasias do colo uterino (Munger et al., 2004; Ramos 2009).

Outras evidências epidemiológicas e moleculares também sugerem que o HPV é considerado fator de risco para o desenvolvimento de câncer nas regiões da vagina, vulva, ânus, pênis, além de carcinomas da mucosa oral, orofaríngea, laríngea e regiões da cabeça e pescoço, porém em uma parcela

menos significativa, se comparado com o câncer de colo de útero (WHO, 2007; D'Souza et al., 2007).

2.2.2 PROFILAXIA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

2.2.2.1 Rastreamento da cérvix uterina

A prevenção do câncer de colo de úteros é dada mundialmente pelo rastreamento e monitoramento citológico da cérvix uterina através do exame de Papanicolaou, também chamado de preventivo do câncer do colo do útero (PCCU), ou até mesmo colpocitologia oncótica cervical, devido este câncer ser precedido por uma longa fase pré-invasiva associada ao HPV, chamada de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011).

A NIC é uma manifestação subclínica da infecção por HPV no colo do útero (Aidé et al., 2009) e se caracterizam por lesões proliferativas com grau anormal de maturação, podendo ser precursoras do carcinoma escamoso invasor. As NIC são classificadas em graus I, II e III, de acordo com a proporção da espessura do epitélio que apresenta células maduras atípicas e indiferenciadas (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011).

A NIC I é caracterizada por células atípicas que ocupam ao menos um terço do epitélio escamoso inferior. A NIC II apresenta até dois terços do epitélio inferior ocupado por células atípicas, enquanto o NIC III apresenta mais de dois terços ou até a totalidade da espessura do epitélio formado de células não indiferenciadas com núcleos atípicos e figuras de mitoses anormais (Richart 1967; Sellors & Sankaranarayanan, 2003; Aidé et al., 2009).

Estudos relatam que os graus NIC II e III pela maior chance de progredirem para o câncer, se não tratadas são neoplasias reconhecidas como as reais precursoras do câncer de colo do útero (Mccredie et al., 2008; Östor 1993), enquanto grande parte das NIC I regridem entre 12 a 24 meses ou não progridem à NIC II ou III, por isso, não são consideradas lesões precursoras desta doença (Östor 1993; Melnikow et al., 1998). Segundo estudos a infecção por HPV está presente entre 90% e 100% das amostras que possuem lesões

tipo NIC III e carcinoma invasor (Chen et al., 1999; Walboomers et al., 1999; Depuydt et al., 2001; Munoz, et al., 2003; Chang et al., 2005).

Políticas de quem e quando deve-se realizar o rastreamento para detecção das lesões precursoras do câncer do colo do útero e suas fases iniciais, assintomáticas, são complexas e necessitam de uma análise sóbria e cautelosa das vantagens e desvantagens, como também dos custos decorrentes dessas ações. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que todas as mulheres sexualmente ativas, realizem a o exame citopatológico anualmente a partir dos 25 anos e que repitam o exame a cada 3 anos, após 2 resultados negativos consecutivos. Essa recomendação se justifica pelo alto número de falsos-negativos. Devendo haver 2 exames negativos no espaço de um ano para o aumento da periodicidade do mesmo (Aidé et al., 2009).

Nos Estados Unidos é recomendado pela American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) o início do rastreamento aos 21 anos de idade e a FDA (Food and Drug Administration) já aprovou, juntamente ao teste citopatológico, a incorporação de testes que detectem o HPV de alto risco oncogênico em mulheres com mais de 30 anos no rastreamento, mesmo em resultados citológicos dentro dos limites de normalidade, pois mesmo com citologia normal, a presença de HPV de alto risco em mulheres acima dos 30 anos pode significar uma infecção persistente, sendo esta mais suscetível desenvolver uma lesão precursora do câncer de colo do útero (Cibas et al 2007 e ACOG 2003, 2009).

A Figura 7 destaca as equivalências entre as nomenclaturas citológicas, utilizadas na realização dos exames citopatológicos e histológicas, utilizados em biópsias, para o diagnóstico confirmatório da severidade das lesões escamosas da cérvix uterina. No Brasil, Para classificação do exame citopatológico é utilizada a *Nomenclatura Brasileira para Laudos citopatológicos cervicais 2012* (Brasil, Ministério da Saúde, 2012) que se baseia no Sistema Bethesda, criado na cidade canadense de mesmo nome em 1989 e revisado em 2001. Para os diagnósticos histopatológicos, é utilizada a nomenclatura descrita por Richart et al., 1967.

Classificação histológica (Richart 1967)	Classificação citológica brasileira (INCA 2012)
-----	Alterações benignas
-----	Células atípicas de significado indeterminado
Neoplasia Intraepitelial Cervical I – NIC I	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau - LSIL
Neoplasia Intraepitelial Cervical II e III – NIC II e III	Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau - HSIL
Neoplasia Intraepitelial Cervical III – NIC III	Adenocarcinoma in situ
Carcinoma epidermóide invasor	Carcinoma epidermóide invasor

Figura 7: Equivalências de diagnósticos entre a classificação histológica e citológica para resultados de exame de papanicolaou em lesões cervicais escamosas. Elaboração própria a partir de dados de (Richart 1967) e (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2012)

De Maneira geral as lesões associadas à infecção por HPV, que podem vir a ser precursoras do câncer de colo do útero, só são detectadas através de exames específicos, por não apresentarem sintomas incômodos ou que provoque algum tipo de alarde como corrimento, ardor ou prurido, fazendo com que muitas mulheres negligenciem a recomendação de se consultar periodicamente com o ginecologista, por este motivo destacam-se as políticas mundiais de rastreamento que fazem o diagnóstico precoce, o acompanhamento e o tratamento dessas lesões, que são as principais formas de prevenção da infecção pelo papilomavírus e o câncer em foco (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011).

2.2.2.2 Educação sexual

Visto a infecção genital por HPV ser sexualmente transmissível (IST) e também o principal fator de risco para lesões no epitélio do colo do útero e consequentemente do CCU (Novaes et al., 2002), uma das formas mais tradicionais de prevenção é a educação sexual, através de campanhas que devem ter entre outros focos a importância do uso de preservativos devido a diminuição da possibilidade de transmissão do vírus pelo ato sexual, mesmo não sendo um método totalmente efetivo (Ramanakumar et al., 2010 MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006).

2.2.2.3 Vacinação

A vacinação que previne a infecção de determinados tipos de HPV é outra forma de medida profilática do câncer de colo de útero (Koutsky., 2002). Atualmente existem duas vacinas aprovadas tanto pela FDA (Food and Drug Administration 2006 e 2009) quanto pela ANVISA (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006 e 2013), órgãos que regulam a produção de fármacos nos Estados Unidos e no Brasil respectivamente.

O laboratório GlaxoSmithKline (GSK) é responsável pela produção da vacina bivalente Cervarix, que imuniza contra os tipos 16 e 18, que são os tipos HPV de alto risco oncogênicos mais prevalentes em mulheres com câncer de colo de útero. O laboratório Merck Sharp & Dohme (MSD) é responsável pela produção da vacina quadrivalente Gardasil, que além de imunizar contra os tipos 16 e 18 também age contra os tipos 6 e 11, que são os principais causadores de verrugas genitais. Contudo, estudos indicam que pode haver proteção cruzada pela similaridade genética entre alguns tipos virais vacinais com outros HPV não vacinais (Linhares et al., 2006; Lepique et al., 2009), como evidenciado em Stanley et al., 2008 onde revelou-se que a vacina Gardasil protegeu parcialmente (aproximadamente 59%) contra os tipos 31 e 45 de HPV.

Ambas as vacinas funcionam em um regime de três doses, com aplicação intramuscular (Food and Drug Administration 2006, 2009) e são completamente seguras por serem produzidas a partir de partículas virais não infectantes e sem a presença do DNA viral (Diniz & Ferreira 2010; Schiller et al., 2008), tais estruturas, denominadas como partículas semelhantes ao Vírus ou VLP (Viral-like Particle) tem origem a partir da proteína do capsídeo viral (L1) e são capazes de gerar uma resposta imunológica superior a infecção natural por um período de 2 a 5 anos (Bricks et al., 2007).

Estudos nos Estados Unidos (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS 2007; Mao et al., 2006), Espanha (Ortiz et al., 2006) e em vários outros países (Kjaer et al 2009) têm evidenciado alta eficácia de ambas as vacinas na prevenção de lesões do colo do útero associadas aos tipos de HPV focados pelas vacinas, porém, como a vacinas em questão foram desenvolvidas há poucos anos, estudos devem ser conduzidos para averiguar a velocidade do

nível de queda e a menor quantidade necessária de anticorpos anti-HPV para que haja a proteção e assim da necessidade de reforço da vacina (bricks et al., 2007; WHO 2007).

Atualmente, no Brasil, ambas as vacinas são encontradas na rede privada de saúde e indicada para mulheres a partir dos nove anos de idade. A partir de março de 2014 a vacina quadrivalente entrou para o PNI (Programa Nacional de Imunização) e esta sendo disponibilizada gratuitamente pelo SUS para meninas entre 11 e 13 anos, em 2015 essa faixa será ampliada e ficará entre 9 e 13 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2013). A introdução da vacina Gardasil no SUS só foi possível por conta de acordo parceria para o desenvolvimento produtivo (PDP), com transferência de tecnologia entre o laboratório internacional Merck Sharp & Dohme (MSD) e o Instituto Butantan, que passará a fabricar o produto no Brasil a um custo de 30 reais por dose (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2013).

3. JUSTIFICATIVA

As mulheres do estado do Pará que moram em comunidades ribeirinhas são carentes de cuidados primários de saúde pública e, por isso, o rastreamento citológico do cérvix uterino e a identificação de indicadores que possam ajudar nas ações de saúde para essas comunidades são fundamentais na prevenção da infecção pelo HPV e, conseqüentemente, do CCU. Tal carência pode ser considerada o principal argumento para estudos que definiram tendências de aumento da mortalidade por câncer de colo do útero no estado do Pará (Gonzaga et al., 2013), e também em cidades do interior das regiões norte e nordeste (Silva et al., 2010).

Estudos mundiais já destacaram que a atenção básica a saúde e o alto índice de cobertura do exame citopatológico periódico em mulheres, são fatores essenciais para a queda da incidência e mortalidade pelo câncer em questão. Países com uma taxa de cobertura pelo exame citopatológico periódico superior a 50% das mulheres, apresentam uma taxa de mortalidade menor que três mortes a cada 100 mil mulheres ao ano, e em países onde a cobertura por este mesmo é maior que 70% a taxa de mortalidade cai para menos de duas mortes por ano a cada 100 mil mulheres (Anttila et al., 2009; Arbyn et al., 2009). Em comparação, a taxa de mortalidade brasileira por este câncer em 2011 que foi de 4,66 mortes. No estado Pará a situação é mais alarmante, pois verificou-se a taxa de 8,26 mortes a cada 100 mil mulheres no mesmo período em decorrência deste câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA 2011).

Poucos estudos acerca do HPV englobam dados de comunidades ribeirinhas pelo difícil acesso a essas mulheres, por questões culturais, medo de realização dos exames, desconhecimento ou preconceito. No entanto estudos relatam taxa de prevalência pela infecção do HPV condizente com a literatura (Hildesheim et al., 1993; Silva et al., 2009; WHO/ICO 2010) em mulheres não referenciadas. Em comunidades ribeirinhas do estado do Pará foi relatado em Duarte et al, (2010) uma prevalência de 11,4% em mulheres de ribeirinhas de um município do interior do estado, Brito et al. (2002) observou a taxa de prevalência de 14,3% da infecção em indígenas da tribo Parakanã,

que se localiza na bacia do Tocantins entre os municípios de Novo Repartimento, Jacundá e Itupiranga. Tais dados nos indicam a presença do vírus nessas comunidades tradicionais, muito frequentes na Amazônia brasileira.

A implantação das vacinas profiláticas contra o HPV na rede pública de saúde pelo Ministério da Saúde do Brasil foi iniciada em março de 2014, as vacinas já desenvolvidas atingem um número limitado de tipos de HPV, entre eles os tipos 16 e 18 que são o foco deste projeto, e seu custo ainda é elevado, mesmo com um cenário de parceria do ministério da saúde e o laboratório produtor da vacina além de custos como armazenamento, distribuição... Tendo em vista a grande diversidade de comunidades ribeirinhas no Estado do Pará e na Região Norte, será de fundamental importância determinar a frequência, a diversidade e a relação desses tipos oncogênicos de HPV com as lesões uterinas, para composição de melhores políticas na prevenção da infecção por HPV.

O exame citopatológico evidencia resultados positivos no rastreamento de lesões precursoras do câncer do colo do útero associadas ao HPV, porém é necessário reconhecer que este teste ainda necessita de especificidade devido o resultado depender da expertise do citologista que analisará a lâmina com material da cérvix uterina, além de sensibilidade, pois o exame possui uma taxa de falsos-negativos que podem chegar até 20% e da sobreposição celular, que pode dificultar a visualização do material e consequente avaliação das alterações citológicas (Aide et al., 2009), Os exames moleculares com resultado negativo estão associado a uma baixa taxa de desenvolvimento de NIC III no próximos 6 anos, o que faz com que o intervalo de realização dos mesmos sejam ampliados com segurança, podendo fazer com que os teste moleculares ultrapassem o custo benefício do exame citopatológico tradicional (Dillner et al., 2008).

Dados também relatam que a infecção persistente pelo HPV 16 aumenta em 20% o risco das mulheres desenvolverem lesões do tipo NIC III ou piores em um período de dez anos (Kjaer et al., 2010) e que segundo a organização mundial da saúde (WHO/ICO 2010) o HPV 16 é o tipo mais comum em mulheres sem alterações citológicas.

Sendo assim e pela forte associação entre os tipos de HPV de alto risco oncogênico e o câncer de colo uterino, estudos já relataram a fundamental importância a implementação de testes moleculares de diagnóstico em políticas de rastreamento para detectar a presença do HPV (Sankaranarayanan et al., 2009) e o tipo viral associado, em mulheres assintomáticas, dando ênfase aos tipos 16 e 18, pelo fato destes tipos serem reconhecidos como os mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico (Clifford et al., 2006; Zur Hausen et al., 2002; Bosch et al., 2002; Govan et al., 2008).

No caso de comunidades ribeirinhas da Amazônia, tais testes serão fundamentais, pois poderão proporcionar um possível aumento na periodicidade do rastreamento do cérvix uterino entre estas mulheres, o que resultará em economia de recursos, visto o difícil acesso às comunidades em questão.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Definir o perfil da infecção geral pelo papilomavírus humano e dos tipos 16 e 18, em mulheres de comunidades ribeirinhas do Estado do Pará.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil da população estudada
- Estimar a frequência da infecção pelo papilomavírus humano nas comunidades estudadas
- Estimar as frequências da infecção pelos tipos 16 e 18 de papilomavírus humano na população estudada
- Determinar os fatores associados à infecção viral nas comunidades ribeirinhas investigadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

Este estudo transversal realizou uma análise descritiva e analítica da infecção geral por HPV e pelos seus tipos 16 e 18, em mulheres que já iniciaram sua vida sexual, possuem residência fixa em comunidades ribeirinhas do estado do Pará – Brasil e que realizaram coleta de material para o exame colpocitológico ou preventivo de câncer de colo de útero (PCCU), entre fevereiro e dezembro de 2008. Este foi caracterizado pela busca ativa de mulheres para realização do exame preventivo de câncer de colo do útero e contou com a participação de 353 mulheres de sete municípios paraenses conforme representado na figura 8.

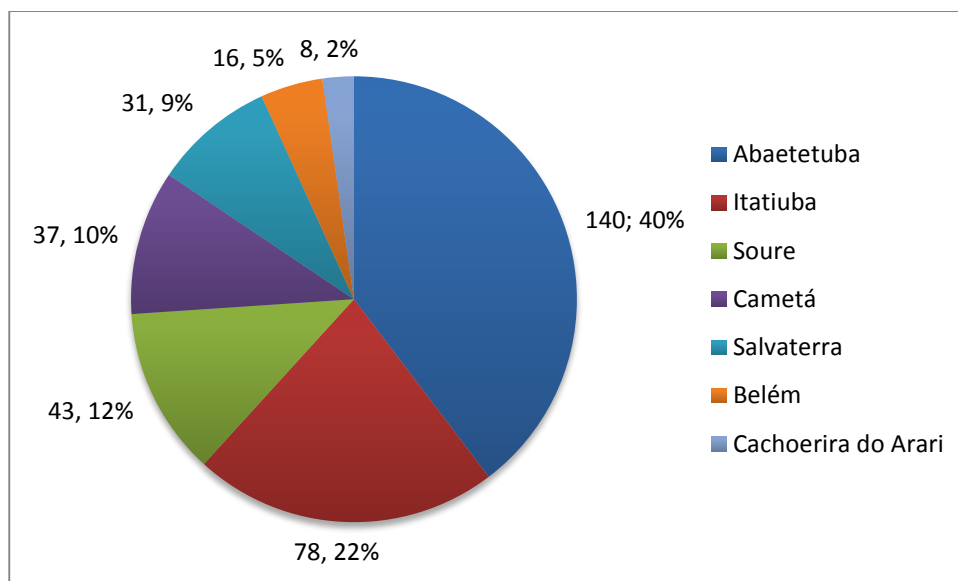


Figura 8: Distribuição das participantes do projeto de acordo com o município investigado.

5.2 Aspectos Característicos Éticos

As mulheres participantes do estudo foram orientadas sobre a importância do projeto e convidadas a fazer parte da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo 1). O protocolo de pesquisa deste projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa em Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical – NMT pertencente a Universidade Federal do Pará – UFPA, em três de dezembro de 2007, segundo o ofício de nº 050/2007 CEP/NMT (Anexo 2).

5.3 Questionário epidemiológico

Os dados socioeconômicos, demográficos, comportamentais, de história sexual e reprodutiva foram coletados das mulheres que participaram do projeto antes da realização do exame de PCCU e através de entrevistas estruturadas e posterior preenchimento de questionário epidemiológico padronizado (Apêndice 1). As pessoas que executaram as entrevistas receberam orientação dos protocolos do estudo e foram treinadas para o preenchimento dos questionários pela médica responsável pela coleta do material analisado com intuito de evitar o viés de informação.

5.4 Análise citológica do colo uterino

O esfregaço citológico convencional foi constituído de raspado ectocervical e endocervical, colhidos com espátula de Ayre e escova endocervical, estendido em lâmina de vidro, fixado com polietilenoglicol e corado pela técnica de Papanicolaou. As amostras de cérvix uterino foram examinadas e diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia do Núcleo de Medicina Tropical – NMT, Unidade da Universidade Federal do Pará – UFPA e os resultados obtidos foram reclassificados de acordo com 3ª edição da *Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais* (INCA 2012).

5.5 Preparação do DNA das amostras do colo útero

As amostras biológicas coletadas pela escova endocervical foram armazenadas no Universal Collection Medium (UCM/Digene do Brasil Ltda) para posterior transporte até o Laboratório de Biologia Molecular e celular do NMT – UFPA. Para a extração do DNA, as células foram suspensas em 200 µL da solução de digestão (1 mM Tris, 200 µg/mL de Proteinase K, 0,5%

SDS) por agitação e incubadas a 55°C por 2 horas. Posteriormente, o DNA foi purificado pelo método de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico na proporção 25:24:1 respectivamente, precipitado em etanol, que após evaporação foi ressuspenso e diluído em 100 µL da solução de TE (1 mM Tris, 100 µM Edta, pH 8,2) e estocado em freezer na temperatura de -20 °C (Pitta et al., 2010).

5.6 PCR para detecção de DNA de HPV

Foi realizada a detecção molecular do HPV pela amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os oligonucleotídeos iniciadores consenso MY-09 e MY-11 (Figura 9) que amplificam um fragmento de 449-458 nucleotídeos (dependendo do tipo de HPV) de uma região altamente conservada do gene L1 (Manos et al., 1989). Cada reação de PCR foi preparada com um volume total de 8,0 µL, sendo 1,0 µL de DNA da amostra biológica e 7,0 µL de uma mistura (MIX) de reagentes [2,5µL de água estéril, 2,5 µL de 1x Go-Taq Green Master Mix® (Promega) [200µM de cada dNTP, 1.5mM MgCl₂ (pH 8.5)] e 1,0µL de cada oligonucleotídeo iniciador para HPV (200 ng/µL). A reação foi submetida ao termociclador (Biocycler MJ96G) com a seguinte programação: 4 minutos a 95 °C para desnaturação do DNA, seguidos por 35 ciclos com 3 etapas, sendo a primeira de 94 °C por 30 segundos, a segunda de 56 °C por 30 segundos e a terceira de 72 °C por 30 segundos, foi executado um último passo de 72 °C por 8 minutos para extensão final do DNA.

Todas as amostras foram previamente amplificadas para um fragmento do gene da beta globina humana para confirmar a qualidade do DNA para PCR, utilizando o mesmo MIX de reagentes, com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para HPV, que foram substituídos pelos oligonucleotídeos iniciadores G73 e G74 (Figura 9), que amplificam um fragmento de 268 pares de base (Greer et al., 1991). Foi usado como controle positivo para a reação de detecção de HPV, amostra de DNA conhecida positiva para o vírus, e como controle negativo, água estéril. Também foi usado MIX de reagente sem adição do DNA para averiguar a possível contaminação

da reação. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (200 ml de Tris-Acetato-EDTA 1x TAE, 2g de Agarose) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. Os fragmentos genômicos amplificados foram comparados com marcadores de peso molecular (*ladder*) de 100 pares de base (promega) para estimar o seu tamanho.

Oligo.	Nº de nucleotídeos	Sequência de nucleotídeos	Fragmento isolado
G73	21	GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA	268PB
G74	22	TGAGCATCCAAAGTCTCCAATC	268PB
MY09	20	CGTCCMARRGGAWACTGATC	450PB
MY11	20	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	450PB

Figura 9: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores genéricos para detecção da beta globina e do HPV. Fonte: Greer et al., 1991 e Manos et al., 1989.

5.7 PCR em tempo Real para detectar HPV tipos 16 e 18

Após o resultado da PCR com oligonucleotídeos iniciadores MY09/11, as amostras positivas para o DNA viral foram submetidas a PCR em tempo real distintas para detecção de cada genótipo (16 e 18) do papilomavírus humano utilizando sondas específicas e kit Platinum® qPCR SuperMix-UDG® (Invitrogen). Para cada amostra foi utilizado 1,0 µl de DNA, 7,30 de mix, 0,375 µl de sonda, 0,15 µL de ROX Dye, 0,15 µL de magnésio e 6,07 de água Milli Q autoclavada, totalizando 15 µL para cada reação.

A reação de amplificação consistiu em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 30 segundos. Os resultados foram analisados pelo software StepOne v2.0 (Figura 10). Controles negativos (mix de reagentes sem adição de DNA) e positivos (mix de reagente adicionada de amostras conhecidamente positivas para os tipos virais) foram utilizados. As análises de PCR em tempo real para detecção do HPV 16 e 18 foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia do NMT – UFPA.

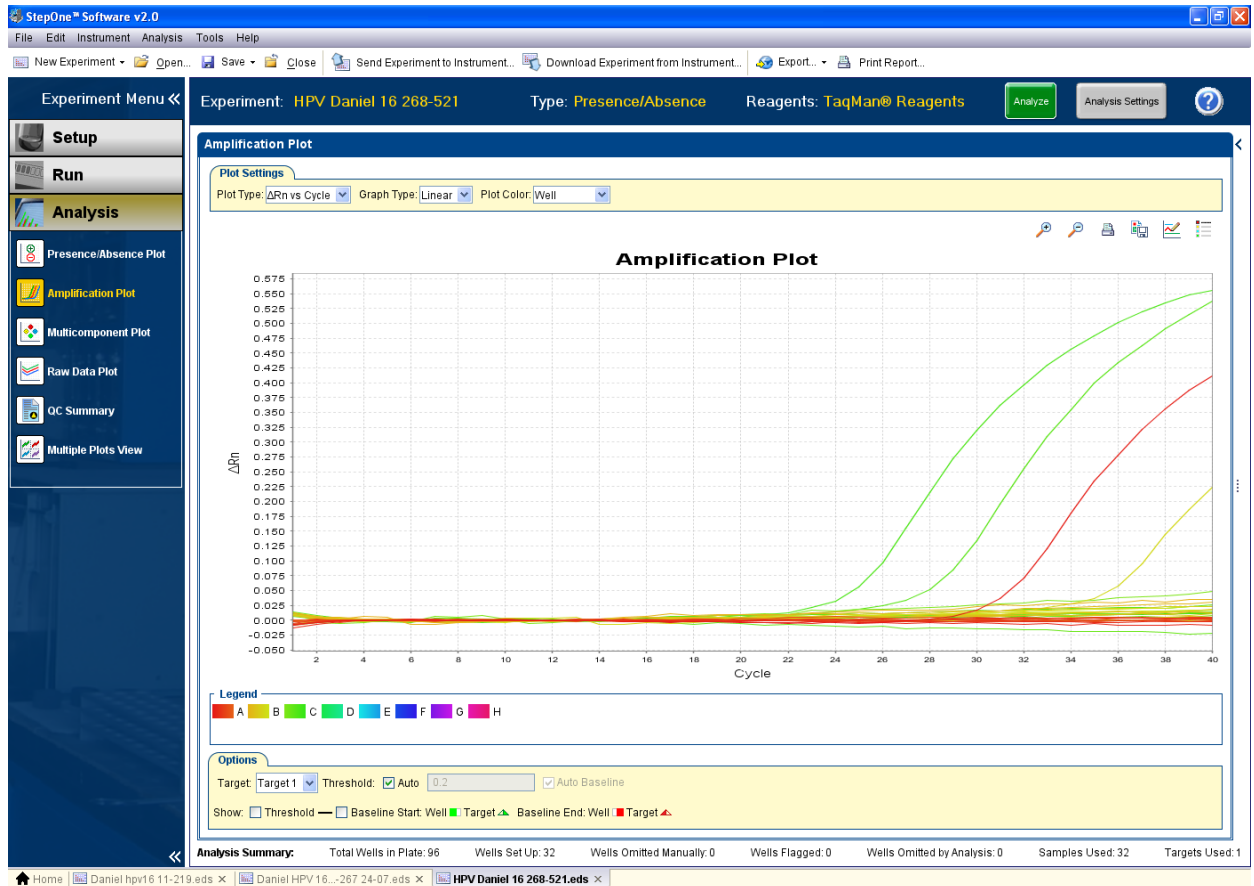


Figura 10: Exemplo de PCR em tempo real analisado pelo software StepOne v2.0

5.8 Análises Estatísticas

Para a estatística descritiva os dados foram transferidos dos questionários para planilhas Excel (Microsoft Office), onde foram gerados gráficos e tabelas. As medidas de tendência central e de dispersão foram identificadas no programa BioEstat 5.0.3 (Ayres2007). Para a estatística inferencial foi utilizado o teste de qui-quadrado – χ^2 para avaliar a associação entre as variáveis investigadas no projeto com a prevalência total do HPV e o teste G para averiguar a mesma associação com a prevalência dos tipos específicos do vírus (16 e 18), ambas ao nível de confiança de 95%, utilizando o programa BioEstat 5.0.3 (Ayres 2007).

6. RESULTADOS

6.1 Características da população

A média etária das 353 participantes foi de 36,9 anos (desvio padrão – 13,7). Quanto ao estado civil, mais de 77% eram casadas ou possuíam parceiro fixo.

Aproximadamente 47% das mulheres investigadas apresentaram, no mínimo, 8 anos de estudo por relatarem a conclusão do primeiro grau (ensino fundamental), sendo que cerca de 31% delas já haviam completado o segundo grau, totalizando 11 anos de estudo (ensino médio), sendo maior a parcela de mulheres que relataram não terem concluído o ensino fundamental incluindo as que se declararam não alfabetizadas (48,1%). Mais da metade das mulheres (53%) revelaram viver com menos de 1 salário mínimo mensal, já incluídos valores referentes a programas sociais governamentais. Quanto ao estado civil, quase metade das mulheres relataram viverem em regime de união estável e quase 80% do total de mulheres entrevistadas afirmaram possuírem parceiro sexual fixo. A tabela 2 apresenta a distribuição dos participantes de acordo com as características sociodemográficas investigadas.

Tabela 2: Distribuição das 353 mulheres que participaram do estudo de acordo com as características sociodemográficas investigadas.

Característica	n	%
Faixa etária (em anos)		
≤ 20	26	7,4
21 - 35	164	46,4
36 - 51	102	28,9
52 - 66	47	13,3
67+	14	4,0
Escolaridade		
Não alfabetizada	41	11,6
Lê e escreve	129	36,5
1º grau	114	32,3
2º grau	46	13,0
3º grau	7	2,0
Não informado	16	4,6
Estado Civil		
Solteiro	49	13,9
Casado	128	36,2
União estável	150	42,5
Separadas, Divorciadas ou Viúvas	26	7,4
Renda Familiar (em salários mínimos)		
< a 1	187	53,0
1 a 2	132	37,4
2 a 3	22	6,2
3+	8	2,3
Não informado	4	1,1

Mais de 37% das participantes relataram que sua primeira relação sexual ocorreu com idade igual ou inferior aos 15 anos e mais da metade 56,1% das mulheres alegaram possuir apenas um parceiro sexual ao longo da vida.

Quanto ao histórico gestacional das mulheres participantes da pesquisa, constatou-se que cerca de 33% delas tiveram até duas gestações, e em aproximadamente 21% de todas as mulheres, relatou ao menos um episódio de abortamento (espontâneo ou provocado) durante a gestação (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das 353 mulheres que participaram do estudo conforme características sexuais e de história reprodutiva investigadas.

Característica	n	%
Idade da primeira relação sexual (em anos)		
≤ 15	132	37,4
> 15	208	58,9
Não informado	13	3,7
Números de parceiros sexuais		
1	198	56,1
2 a 3	110	31,2
4 a 5	20	5,7
6 ou mais	10	2,8
Não informado	15	4,2
Número de gestações		
Nenhuma	29	8,2
1 a 2	88	24,9
3 a 4	105	29,8
5 ou mais	131	37,1
Ocorrência de aborto		
Não	275	77,9
Sim	78	22,1

Na tabela 4 encontra-se a distribuição das participantes de acordo com o uso ou não de métodos contraceptivos, o hábito de fumar, a ingestão de bebidas alcoólicas e se já haviam realizado o exame de papanicolaou (PCCU) antes de participarem da pesquisa.

Constatou-se que menos de 10% das mulheres admitiram usar algum método contraceptivo e de todas as participantes cerca de 70% nunca haviam realizado o exame preventivo do câncer do colo do útero. Cerca de um quarto das participantes afirmaram serem consumidoras de bebidas alcoólicas e menos de 10% tem o hábito de fumar (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das 353 participantes de acordo com o uso de métodos contraceptivos, realização do PCCU, ingestão de bebidas alcoólicas e hábito de fumar.

Característica	n	%
Uso de métodos contraceptivos orais		
Sim	34	9,6
Não	260	73,7
Não informado	59	16,7
Realização prévia de exame preventivo CCU		
Sim	107	30,3
Não	246	69,7
Ingestão de bebidas alcoólicas		
Sim	96	27,2
Não	246	69,7
Não informado	11	3,1
Habito de fumar		
Sim	35	9,9
Não	312	88,4
Não informado	6	1,7

6.2 Citologia Oncológica Cervical

As 353 mulheres que participaram do estudo apresentaram esfregaços citológicos satisfatórios para avaliação, sendo que delas foi constatado que 43 (12,2%) apresentavam células glandulares ou escamosas atípicas possivelmente não neoplásicas ou que não se possa afastar a lesão de alto grau. Cerca de 15% (n=54) das mulheres apresentaram algum tipo de lesão intraepitelial em células escamosas (tabela 5)

Tabela 5: Diagnóstico citológico cervical das 353 mulheres de acordo com a *Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais 2012*

resultado da citologia	n	%
Dentro dos limites da normalidade	7	2
Inflamação sem identificação do agente	249	70,5
AGUS possivelmente não neoplásicas	9	2,5
AGUS onde não se pode descartar HSIL	3	0,9
ASCUS possivelmente não neoplásicas	28	7,9
ASCUS onde não se pode descartar HSIL	3	0,9
LSIL	48	13,6
HSIL	6	1,7

AGUS – Células Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado
 ASCUS – Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
 LSIL – Lesão Intraepitelial de Baixo Grau
 HSIL – Lesão Intraepitelial de Alto Grau

6.3 Prevalência da infecção genital por HPV.

A prevalência da infecção pelo papilomavírus humano foi identificada em 58 mulheres ribeirinhas (16,4%). A taxa prevalência dos tipos de HPV de alto risco oncogênico 16 e 18 entre as mulheres investigadas foi de 2,3% (n=8) e 1,4% (n=5) respectivamente, um caso de infecção múltipla dos tipos averiguados foi encontrado, ou seja, uma mulher estava infectada pelo HPV 16 e HPV 18.

A presença do HPV foi constatada em todos os intervalos de faixa etária analisados. Os tipos virais em foco nesse estudo (16 e 18) não foram encontrados em mulheres com mais de 67 anos e o tipo 18 também não foi encontrado em mulheres que variaram entre 52 e 66 anos (tabela 6).

Tabela 6: Distribuição da infecção por HPV de acordo com a faixa etária das mulheres investigadas.

Presença do vírus	Faixas etárias					Total
	≤ 20	21 - 35	36 - 51	52 - 66	≥ 67	
HPV	9	22	11	14	2	58
HPV 16	1	5	1	1	-	8
HPV 18	2	2	1	-	-	5
HPV 16 e HPV 18	-	1	-	-	-	1

Faixas etárias em anos

Sinal convencional utilizado: "-" Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

6.4 Fatores associados à infecção por HPV

A prevalência da infecção por HPV apresentou uma distribuição bimodal com picos da infecção evidenciados em mulheres com 20 anos ou mais jovens e mulheres que possuíam idade entre 52 e 66 anos ($p= 0,003$). Constatou-se também uma maior taxa de infecção por HPV em mulheres que não possuíam parceiro sexual fixo (33,3%), quando comparadas a mulheres que relataram possuir parceiro sexual fixo (11,8%) ($p < 0,01$). Evidenciou-se também uma associação entre a presença do HPV com o resultado da citologia oncótica realizada, onde foi detectada uma maior taxa de infecção viral em amostras diagnosticadas com atipias celulares ou lesões intraepiteliais escamosas, quando comparadas com resultados citológicos dentro dos limites de normalidade ($p=0,026$) (Tabela 7).

Tabela 7: Prevalência da infecção por HPV de acordo com as características sociodemográficas, comportamentais, história reprodutiva e achados citológicos.

Características selecionadas	Total	HPV+ (n)	HPV+ (%)	p-valor
Faixa etária (em anos)				0,003
≤ 20	26	9	34,6	
21 - 35	164	22	13,4	
36 - 51	102	11	13,6	
52 - 66	47	14	24,4	
67+	14	2	16,6	
Único parceiro sexual fixo				< 0,001
Ausente	75	25	33,3	
Presente	278	33	11,8	
Escolaridade				0,622
Analfabeta	41	8	19,5	
Lê e escreve	129	19	14,7	
1º completo	114	21	18,4	
2º grau completo	46	9	19,6	
3º grau completo	7	0	0	
Renda Familiar (em salários mínimos)				0,683
< que 1	187	33	17,6	
1	132	21	15,9	
2	22	2	9,1	
3+	8	2	25	
Números de parceiros sexuais				0,117
1.	198	26	13,1	
2 a 3	110	24	21,8	
4 a 5	20	2	10,0	
6+	10	3	30,0	
Número de gestações				0,144
Nenhuma	29	6	20,7	
1 a 2	88	18	20,5	
3 a 4	105	10	9,5	
5+	131	24	18,3	
Diagnóstico citológico				0,026
Normal ou inflamatório	256	34	13,3	
Células atípicas escamosas ou glandulares	43	9	20,9	
Lesão intraepitelial de baixo grau - LSIL	48	14	29,2	
Lesão intraepitelial de alto grau - HSIL	6	2	33,3	

As demais variáveis sociodemográficas, comportamentais e de história reprodutiva não apresentaram associação estatisticamente significativa com a infecção por HPV, assim como também não houve associação estatisticamente significativa da infecção pelos tipos 16 e 18 do vírus, quando analisadas somente mulheres que foram diagnosticadas a presença viral, com nenhuma

variável investigada nas comunidades participantes da pesquisa. No entanto a característica, início da vida sexual, se aproximou da significância estatística quando associada com o HPV do tipo 18 (Tabela 8).

Tabela 8: Características sociocomportamentais e achados citológicos com a infecção por HPV, tipo 16 e 18.

Característica	HPV 16		HPV +	p-valor	HPV 18		HPV +	p-valor
	Ausência	Presença			Ausência	Presença		
Faixa etária ¹				0,59				0,35
≤ a 20	8	1	9		7	2	9	
21 - 35	17	5	22		20	2	22	
36 - 51	10	1	11		10	1	15	
52 - 66	13	1	14		14	-	10	
67+	2	-	2		2	-	2	
Total	50	8	58		53	5	58	
Parceiro sexual fixo				0,73				0,27
Ausente	22	3	25		24	1	25	
Presente	28	5	33		29	4	33	
Total	50	8	58		53	5	58	
Citologia				0,82				0,77
Normal-inflamatório	30	4	34		32	2	34	
Células atípicas	7	2	9		8	1	9	
LSIL	12	2	14		12	2	14	
HSIL	1	-	1		1	-	1	
Total	50	8	58		53	5	58	
Início da vida sexual ²				0,68				0,07
≤ 15	21	3	24		20	4	24	
16 - 20	22	4	26		25	1	26	
21+	2	1	3		3	-	3	
Total	45	8	53		48	5	53	

¹Faixas etárias em anos

²5 mulheres com diagnóstico de HPV positivo não informaram quando iniciaram sua atividade sexual.

Sinal convencional utilizado: "-" Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

7. Discussão

As comunidades ribeirinhas da Amazônia brasileira são comunidades tradicionais, geralmente com acesso apenas através de pequenas embarcações, o que dificulta ou impossibilita que os habitantes dessas comunidades tenham serviços básicos, como saúde e educação. Tal fato se reflete em algumas das características sociais investigadas nesta pesquisa. Constatamos que mais de 80% das mulheres não possuem o ensino médio completo, isso pode ser explicado pela distancia entre as escolas de nível médio e as comunidades. Também pode corroborar com esse fato, os valores repassados em muitas dessas comunidades, como, trabalhar desde cedo, mulher deve ser responsável pela criação dos filhos e de afazeres domésticos, etc. Sendo a baixa escolaridade já relatada como associada com o desenvolvimento do câncer de colo do útero (Thuler 2008; Calazan et al., 2008).

Outro fator que é característico a essas comunidades, e também é fator de risco para infecção do HPV, é o alto número de gestações entre estas mulheres (Fife et al., 1996). Neste trabalho constatou-se que 66,9% das mulheres possuíram três ou mais gestações, destacando-se que muitas mulheres investigadas são jovens e ainda terão, potencialmente, mais gestações.

Entre as mulheres investigadas, quase 70% nunca tinha realizado o exame preventivo do câncer do colo do útero. O isolamento destas comunidades aliado ao desconhecimento e uma atenção básica de saúde deficitária, pode explicar a ocorrência desta taxa. Isso indica a necessidade de políticas públicas que vise criar uma infraestrutura que permita as mulheres ribeirinhas realizarem o PCCU para um diagnóstico e tratamento precoce das lesões precursoras do câncer de colo do útero além de esclarecer as tais mulheres sobre o exame, ressaltando sua importância.

Analisando a associação da infecção genital por HPV com o desenvolvimento do câncer de colo do útero, torna-se essencial rastrear entre as mulheres ribeirinhas, não somente, a presença viral, mas também identificar os tipos de maior potencial oncogênico presentes entre as mulheres para um melhor prognóstico. A metodologia utilizada neste projeto possibilitou a

identificação de uma prevalência da infecção por HPV de 16,4% nas comunidades ribeirinhas estudadas.

Estudos mundiais de base populacional demonstram que a prevalência da infecção viral é maior em mulheres referenciadas do serviço público de saúde em comparação com amostras populacionais aleatórias. Em estudo com mulheres italianas advindas do serviço de saúde primário, foi averiguada uma prevalência do vírus de 35,9% (Piana et al., 2011), considerando esse tipo de amostragem. Dados semelhantes foram relatados por Banister et al, (2013) e Rocha et al, (2013) onde foram encontradas prevalências gerais por HPV de 32% e 29,1%, respectivamente.

Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos relatados na literatura identifica a taxa de infecção e os tipos de HPV em uma demanda referenciada de mulheres que apresentam lesões no colo do útero, invasivas ou não, ou em mulheres que buscam os serviços de saúde para a realização do preventivo de câncer de colo do útero, onde há uma tendência de maiores taxas de prevalência por HPV pela associação de lesões na cérvix uterina com a infecção viral. A prevalência e os tipos de HPV diagnosticados neste estudo são originários de mulheres que aceitaram realizar o exame de PCCU, provenientes de uma busca ativa e aleatória realizada pelos profissionais de saúde nas comunidades ribeirinhas selecionadas. Na Espanha, estudo conduzido por San Jose et al, (2003), com características de amostragem semelhante a este projeto a taxa de prevalência por HPV encontrada foi menor que 3%.

A prevalência encontrada neste projeto é corroborada com dados de outros estudos regionais com populações de características semelhantes, como, em Pinto et al, (2011) que encontrou uma taxa de prevalência de infecção por HPV igual 14,2% em mulheres que residiam as margens direita e esquerda do lago da usina hidroelétrica construída na cidade de Tucuruí, no estado do Pará. Em Brito (2006) que estudou 49 mulheres de uma aldeia indígena no estado do Pará encontraram prevalência de 22,4%. Em outros estudos regionais de mulheres conduzidos por Cortinhas et al, (2009) e Duarte et al, (2010) relataram taxa de prevalência geral de 18,52% e 11,39% respectivamente.

Neste estudo dividimos a população amostral em cinco faixas etárias, e encontramos uma distribuição bimodal significativa da infecção pelo papilomavírus humano, onde temos o primeiro pico da infecção, em mulheres com 20 anos ou mais jovens, e o segundo pico entre mulheres de 52 e 66 anos. Essa distribuição é encontrada em outros estudos (Dursun et al., 2009; Smith et al., 2004; Lazcano-Ponce et al., 2001) e pode ter várias razões de acordo com a literatura, entre elas, a maior frequência sexual, a maior quantidade e rotatividade de parceiros sexuais, a irregularidade no uso de contraceptivos de barreira além da fragilidade da cérvix uterina, ainda em processo de maturação em mulheres jovens (Molano et al., 2002). Em mulheres com idade mais avançada pode ser explicada pela perda gradual da imunidade após a menopausa o que facilitaria a persistência da infecção viral. Outro fator que pode sugerir um aumento na prevalência neste perfil etário é simplesmente pela presença de novas infecções ocasionadas pela aquisição de novos parceiros sexuais ou rotatividade dos mesmos (Trottier & Franco 2006).

Também foi encontrado neste estudo associação entre a infecção geral por HPV e a citologia da cérvix uterina, onde constatou-se um padrão crescente relativo a prevalência viral de acordo com a presença de anormalidade celulares e o aumento na gravidade da lesão uterina observada. Este achado está de acordo com o padrão encontrado na maioria dos estudos realizados onde se compara o resultado da citologia cervical com a infecção pelo HPV e já é bem estabelecido na literatura (Noronha et al., 2011; Giuliano et al., 2005; Dursun et al., 2009).

A presença de um parceiro sexual fixo se mostrou estatisticamente significativo com menores taxas de infecção por HPV, mulheres que relataram possuírem parceiro sexual apresentaram uma prevalência da infecção viral de 11,8% sendo cerca de três vezes menor em comparação com mulheres que afirmaram não possuírem parceiro fixo 33,3% ($p < 0,001$). Dados semelhantes foram encontrados em estudo conduzido por Foliaki e colaboradores em 2014 e pode ser explicado pela limitação da principal via de transmissão viral, a via sexual. Já é estabelecido mundialmente que o alto número de parceiros sexuais e a rotatividade dos mesmos são fatores de risco para a presença da

infecção por HPV e câncer do colo de útero (Duarte et al., 2010; IARC 2007; Vaccarella et al., 2006).

A prevalência dos tipos de HPV específicos de alto risco oncogênico em foco neste trabalho e alvos da vacina bivalente, 16 e 18, em mulheres ribeirinhas foi de 2,3% e 1,4% respectivamente. Este resultado condiz com a prevalência encontrada para o HPV 16 de acordo Rama (2009) em jovens brasileiras e lazcano-ponce et al, (2001) em mulheres mexicanas, e para o tipo 18 em Dursun et al., (2009) na Turquia, ele também é semelhante aos achados encontrados em Foliaki et al (2014) para ambos tipos virais, porém se encontra bem abaixo de estudos de prevalência considerados referência mundialmente, analisando estes tipos virais entre mulheres que possuem a infecção por HPV (San Jose et al., 2007, Clifford et al., 2006).

Tal fato pode estar relacionado principalmente ao tipo de amostra do estudo, como mulheres referenciadas de serviço de saúde, com anormalidades na cérvix uterina, portadoras de HIV, com câncer do colo do útero já estabelecido entre outras causas, onde há uma tendência de se encontrar maiores taxas dos tipos virais enfatizados neste estudo, além de diferenças geográficas naturais da prevalência viral. Sendo importante averiguar os tipos virais circulantes na região para avaliar o impacto que as vacinas comercializadas terão sobre a população mesmo levando em conta a imunização através da proteção cruzada que as vacinas em questão proporcionam a outros tipos virais já relatadas em outros estudos (Linhares et al., 2006; Lepique et al., 2009).

Estudos mundiais os tipos de HPV 16 e 18 são considerados os tipos de alto risco oncogênico mais prevalentes em mulheres que possuem lesão intraepitelial de alto grau – HSIL e carcinoma invasor (Obeidat et al., 2013; Boumba et al., 2014; Clifford et al., 2003), Porém neste estudo os tipos virais 16 e 18 não foram encontrados em mulheres diagnosticadas com lesão intraepitelial de alto grau – HSIL. Este achado pode ser explicado pelo baixo número de mulheres ribeirinhas que apresentaram esse tipo de lesão no cérvix uterino (n=6), também pode corroborar a este fato a diferença natural da prevalência viral entre regiões geográficas diferentes, como infere alguns estudos que relatam prevalências relevantes de outros tipos de HPV de alto risco na região amazônica, como em estudo conduzido por Brito 2006 que

relatou tipo viral 58 o mais prevalente entre indígenas do sul do Pará e em Belém foi encontrado prevalência de 17,8% do HPV tipo 58 em mulheres que apresentaram alterações citológicas (Noronha et al., 2011).

Não foi constatada neste estudo a associação da infecção viral pelos tipos 16 e 18 com os fatores de risco já descritos na literatura Associados ao HPV (Faixa etária primária, Início precoce da vida sexual, ausência de parceiro sexual fixo, Presença de lesões citológicas), talvez, pela amostragem reduzida. No entanto valores próximos a significância estatística foram encontrados, dentre mulheres positivas para o vírus, na relação entre HPV 18 e o início da vida sexual, prevalecendo este tipo viral em mulheres que iniciaram a sua vida sexual com até 15 anos. Tais características sociocomportamentais, já estabelecidas como fatores de risco da infecção viral, através de mais estudos epidemiológicos poderão demonstrar relação mais íntima com os tipos virais 16 e 18, podendo constituir então foco investigativo da infecção e de prevenção do câncer de colo de útero.

Os demais dados sociocomportamentais e de história reprodutiva, investigados nesta pesquisa, não revelaram associação estatisticamente significativa com a infecção geral por HPV, sendo algumas dessas características consideradas fatores de risco para a aquisição da infecção viral de acordo com a literatura, como, hábito de fumar (Silva et al., 2009), o elevado número de gestações (Gopalkrishna et al., 1995) o início precoce da atividade sexual (Roteli-Martins et al., 2007) o uso prolongado de medicamentos anticoncepcionais (Moreno et al., 2002).

A ausência da associação da presença viral com os dados investigados, que já possuem associação estabelecida na literatura, pode ser explicada pelo baixo número de mulheres participantes do projeto, que por sua vez pode ser justificado pelo quantitativo de mulheres nessas comunidades e pela resistência na realização de testes diagnósticos invasivos. Esta ausência de associação também pode ser justificada por características comportamentais intrínsecas a este tipo de comunidades e já estabelecidas como mitigadoras da infecção viral, como o baixo número de parceiros durante a vida sexual dessas mulheres (Silva et al., 2009, Baseman & Koutsky, 2005) em comparação a comunidades de centros urbanos.

Também foi encontrado um caso de infecção múltipla pelos tipos virais estudados em uma mulher de 26 anos que iniciou a vida sexual aos 20 anos e possui único parceiro sexual desde então, com diagnóstico citológico de lesão intra-epitelial de baixo grau. Esta mulher, pelo conjunto de fatores associados ao desenvolvimento do câncer, deve realizar rastreamento do cérvix uterino com menor periodicidade para acompanhamento minucioso da evolução da lesão no colo do útero.

As técnicas de diagnóstico molecular da infecção viral, utilizadas nesta pesquisa, identificaram mulheres portadoras de HPV de alto risco oncogênico sem necessariamente apresentar alteração celular no cérvix uterino. Este resultado, conciliado a outras características, é um indicativo, de acordo com autores (Kjaer et al., 2010. Cibas et al., 2007), para um rastreamento cervical com menor periodicidade, pela taxa significativa de desenvolvimento de lesões precursoras do CCU em mulheres portadoras destes tipos virais sem alterações citológicas. Porém o exame preventivo do câncer de colo do útero com análise da cérvix uterina não deve ser substituído, visto que este exame descreve diversos aspectos citológicos que vão além da identificação indireta da presença viral e que não podem ser evidenciados pelas técnicas de biologia molecular, devido a isso que muitos programas de rastreamento utilizam as técnicas citadas de forma em que uma complementa à outra (ACOG 2003, 2009).

Uma das limitações deste estudo esta relacionada ao uso dos questionários de coleta das informações referentes aos fatores de risco para aquisição e manutenção do HPV descritos na literatura, visto que as análises estatísticas foram compostas exclusivamente das informações passadas pelas participantes do projeto, havendo a possibilidade de imprecisão, omissão ou inverdades das respostas, por motivos diversos, como, vergonha, medo, esquecimento entre outros. Além disso, o desenho transversal impossibilitou a utilização do tempo como fator de causa para a infecção viral, uma vez que os fatores de risco e o desfecho foram coletados no mesmo momento e o viés da causalidade reversa não pôde ser extinto.

Uma metodologia que poderá ampliar a cobertura e facilitar a realização do exame de diagnóstico molecular em comunidades de difícil acesso e diminuir as causas de rejeição das mulheres com a coleta para o

exame, como, vergonha, preconceito, medo... se trata da utilização da autocoleta de material de cérvix uterino, que além destas vantagens diminuiriam os custos com infra-estrutura e pessoal para realização deste exame em loco (Caetano & Caetano, 2005). Estudos, que já compararam a autocoleta com a coleta convencional, demonstraram concordância excelente no resultado da prevalência viral em amostras de ambas metodologias de coleta (Gravitt et al., 2001., Gage et al., 2011) além de evidenciarem uma melhor relação custo-efetividade do que a citologia convencional (Flores et al., 2003).

Portanto o conhecimento não só da prevalência da infecção, como também do tipo oncogênico de HPV associado e o discernimento epidemiológico da infecção genital por este vírus são etapas fundamentais para subsidiar o desenvolvimento de políticas de prevenção de doenças em decorrência de infecções sexualmente transmissíveis mais adequadas a realidade de comunidades ribeirinhas, como o câncer de colo do útero citado nesta dissertação. A identificação da frequência viral semelhante às encontradas em populações rurais e indígenas de mesmas características e o diagnóstico de HPV de alto risco nas comunidades investigadas também ressalta a importância de ações preventivas das infecções e doenças sexualmente transmissíveis voltadas as mulheres ribeirinhas.

8. Conclusão

As mulheres das comunidades ribeirinhas investigadas, em geral, possuem um baixo nível de escolaridade; possuem apenas um parceiro sexual fixo (casadas ou não) durante a vida; nunca fizeram o exame preventivo de colo de útero; possuem renda familiar menor a dois salários mínimos; relatam um alto numero de gestações; não possuem o hábito de utilizar contraceptivos orais, álcool ou cigarro.

A prevalência da infecção pelo HPV em mulheres de comunidades ribeirinhas investigadas do estado do Pará foi de 16,4% (58/353) e mostrou-se compatível com o relatado em estudos com desenhos e amostras semelhantes. Em 2,3% (8/353) das mulheres ribeirinhas foi encontrado o tipo HPV 16 e em 1,4% (5/353) foi encontrado o HPV tipo 18, sendo relatado um caso de múltipla infecção por ambos os tipos virais investigados.

A infecção por HPV mostrou-se distribuição bimodal, onde observou-se picos da infecção em mulheres com 20 anos ou mais jovens e entre 52 e 66 anos. Também foi encontrada maior frequência do vírus em mulheres que não possuíam parceiros sexuais fixos e em mulheres com alguma anormalidade citológica do cérvix uterino. Não houve associação significativa entre os tipos virais 16 e 18 com os dados epidemiológicos coletados.

REFERÊNCIAS

ACOG American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice Bulletin No. 45. American Cervical Cytology Screening College of Obstetricians and Gynecologists. **Obstet Gynecol**;102: 417–27 2003.

AIDÉ S, ALMEIDA G. Neoplasia intraepitelial cervical. **J bras Doenças Sex Transm**: 21(4): 166-170 2009

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Infectious Diseases. Recommended immunization schedules for children and adolescents-United States, 2007. **Pediatrics**;119:207-8 2007.

ACOG American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin no. 109: Cervical cytology screening. **Obstet Gynecol**. 114(6):1409-20 2009.

ANTONSSON, A., ERFURT, C., HAZARD, K., HOLMGREN, V., SIMON, M., KATAOKA, A., HOSSAIN, S., HAKANGARD, C. & HANSSON, B.G. Prevalence and type spectrum of human papilomavíruses in healthy skin samples collected in three continents. **J Gen Virol** 84, 1881–1886 2003.

ANTTILA A et al. Cervical cancer screening policies and coverage in Europe. **Eur J Cancer**; 45(15):2649-5 2009.

ARBYN M et al. Trends of cervical cancer mortality in the Member States of the European Union. **Eur J Cancer**.; 45(15):2640-8 2009a.

AYRES M, AYRES JUNIOR M, AYRES DL, SANTOS AA. 2007. BIOESTAT - 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: **Ong Mamiraua**; 2007.

BANISTER CE, MESSERSMITH AR, CHAKRABORTY H, WANG Y, SPIRYDA LB, GLOVER SH, PIRISI L, CREEK KE. HPV prevalence at enrolment and baseline results from the Carolina women's care study, a longitudinal study of HPV persistence in women of college age. **Int J Womens Health**. 2;5:379-88 2013.

BASEMAN JG, KOUTSKY LA. The epidemiology of human papilomavírus infections. **J Clin Virol** 32S: 16-24 2005.

BERNARD HU, BURK RD, CHEN Z, VAN DOORSLAER K, HAUSEN H, et al. Classification of papilomavíruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology** 401: 70–79 2010.

BERNARD H U., S. Y. CHAN, M. M. MANOS, C. K. ONG, L. L. VILLA, H. DELIUS, C. L. PEYTON, H. M. BAUER E C. M. Wheeler. Identification and assessment of known and novel human papilomavíruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide

sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis.** 170(5):1077-85 1994.

BERNARD, H-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**, 32, 1-6 2005

BOSCH FX, LORINCZ A, MUÑOZ N, MEIJER CJ, SHAH KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol.** Apr;55(4):244-65 2002.

BOSCH, F. X., M. M. MANOS, N. MUNOZ, M. SHERMAN, A. M. JANSEN, J. PETO, M. H. SCHIFFMAN, V. MORENO, R. KURMAN E K. V. SHAH. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst.**, 87(11):796-802 1995.

BOUMBA LMA, LAHOUCINE H , MUSTAPHA M, DONATIEN M AND MOULAY MUSTAPHA E. Specific genotypes of human papillomavirus in 125 high-grade squamous lesions and invasive cervical cancer cases from Congolese women. **BMC Public Health** 14:1320, 2014.

BOUVARD, V., R. BAAN, K. STRAIF, Y. GROSSE, B. SECRETAN, F. EL GHISSASSI, L. 360 BENBRAHIM-TALLAA, N. GUHA, C. FREEMAN, L. GALICHET, AND V. COGLIANO. A 361 review of human carcinogens-Part B: biological agents. **Lancet Oncol.** 10:321-322, 2009.

BOYER, S. N., D. E. WAZER, AND V. BAND. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Res.** 56:4620–4624 1996.

BOYLE P, LEVIN B, World cancer report 2008. Lyon: **IARC Press**; 510 p 2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero: atualização 2011. Rio de Janeiro: **INCA**; 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais 3ª edição. Rio de Janeiro: **INCA**; 2012.

BRICKS, LF. Vacina HPV: nova perspectiva na prevenção de câncer. **Pediatria**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 154-156, 2007.

BRITO EB, MARTINS SJ, MENEZES RC. Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. **Epidemiol Infect.** Jun;128(3): 485-9 2002.

CAETANO R; CAETANO CMM. Custo-efetividade no rastreamento do câncer cérvico-uterino no Brasil: Um Estudo Exploratório. INCA ministério da Saúde 2005

CALAZAN C, LUIZ RR, FERREIRA I. O diagnóstico do câncer de colo uterino invasor em um centro de referência brasileiro: Tendência temporal e potenciais fatores relacionados. **Rev Bras Cancerol**. out-dez;54(4):325-31 2008.

CARCOPINO X, HENRY M, BENMOURA D, FALLABREGUES AS, RICHET H, BOUBLI L. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. **J MED Virol**; 78: 1131-40, 2006.

CARVALHO J J M, OYAKAWA N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: **BG Cultural**; P. 143 2000.

CHAN, S. Y., DELIUS, H., HALPERN, A. L. & BERNARD, H. U. .Analysis of genomic sequences of 95 papilomavírus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. **J Virol** 69, 3074–3083 1995.

CHANG, C.H.; CHEN, T.H.; HSU, R.C.; CHOU, P.H.; YANG, J.J.; HWANG, G.Y. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. **J Clin Virol**.Jan. 32(1):33-7, 2005.

CHEN, S.; O´SULLIVAN, H.; TABRIZI, S. N.; FAIRLEY, C. K.; QUIN, M. A.; CIBAS ES, HONG X, CRUM CP, FELDMAN S. Age-specific detection of high risk HPV DNA in cytologically normal, computer-imaged ThinPrep Pap samples. **Gynecol Oncol** 104: 702–706 2007.

CLIFFORD G, FRANCESCHI S, DIAZ M, MUNOZ N, VILLA LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine** ;24:S26-34 2006.

CLIFFORD G, SMITH JS, AGUADO T, FRANCESCHI S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer** ;89(1):101–5, 2003.

CORTINHAS, JACQUELINE MONTEIRO. **Prevalência da infecção pelo papilomavírus humano (hpv) em mulheres investigadas para o câncer cervical, na cidade de Belém, Pará**. Dissertação (mestrado) Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, 2009.

CREMONESI A, TAROMARU E, DORES GB, CASTELO A, LONGATTO FILHO A, VERAS TMCW, HOLANDA JÚNIOR F. Reprodutibilidade do teste de captura híbrida de segunda geração na detecção de HPV de alto risco em material cervicovaginal de autocoleta. **DST J bras Doenças Sex Transm** 16: 5-10, 2004.

D´SOUZA G, KREIMER AR, VISCIDL R, PAWLITA M, FAKHRY C, KACH WM, WESTRA WH, GILLISON ML. Case-Control Study of Human Papilomavírus and Oropharyngeal Cancer. **N Engl J Med**;356:1944-56 2007.

DANOS O, M KATINKA, M YANIV Human papilomavírus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae. **EMBO J.**, 1 pp. 231–236 1982.

DALSTEIN V, RIETHMULLER D, PRETET JL, LE BAIL CARVAL K, SAUTIERE JL, CARBILLET JP, KANTELIP B, SCHAAL JP, MOUGIN C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of highgrade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. **Int J Cancer** 106:396–403 2003.

DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZURHAUSEN H. Classification of papilomavíruses. **Virology**; 324:17-27 2004.

DEPUYDT, C.; VANBRABANT, M; BOELS, L. Prevalence of human papilomavírus types in high-grade squamous intra-epithelial lesions in Belgium. **In: 19 th International Papilomavírus Conference. Florianópolis –Brasil.** Abstract, Book.p. 103, 2001.

DE SANJOSE S, ALMIRALL R, LLOVERAS B. FONT R, DIAZ M, CATALÀ I, MEIJER, CJLM, SNIJDERS PJF, ROLANDO H, BOCSCH X. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. **Sex Transm Dis** ;30:788–93 2003.

DILLNER J, REBOLJ M, BIREMBAUT P, PETRY KU, SZAREWSKI A, MUNK C, SANJOSE S, NAUCLER P, LLOVERAS B, KJAER S, CUZICK J, VAN BALLEGOOIJEN M, CLAVEL C, IFTNER T. Long term predictive values of cytology and human papilomavírus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. **BMJ**, 377: 2008.

DINIZ, MARIANA DE OLIVEIRA. **Avaliação das repostas imunológicas e protetora de uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16.** 2010. Tese, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DINIZ, MO; FERREIRA, LCS. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estud. av.**, São Paulo , v. 24, n. 70, 2010.

DOORBAR J, CAMPBELL D, GRAND RJ, GALLIMORE PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. **EMBO J.** 5: 355-362 1986

DOORBAR J. Molecular biology of human papilomavírus infection and cervical cancer. **ClinSci (Lond)**;110(5):525–41 2006.

DOORBAR, J. Papilomavírus life cycle organization and biomarker selection. **Dis. Markers**, v. 23, n. 4, p. 297-313, 2007

DUARTE, D V. Frequência e genotipagem do Papilomavírus humano em mulheres de comunidades ribeirinhas do Município de Abaetetuba, Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v.1 n. 3, set 2010.

DURSun P, Senger SS, Arslan H, Kuscu E, Ayhan A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. **BMC Infect Dis** 9:191 2009

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. Virus taxonomy. The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Family Papillomaviridae. **Elsevier**, pp. 239–255 2005.

FDA Food and Drug Administration. Licenses quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18). recombinant vaccine (gardasil) for the prevention of cervical cancer and other diseases in females caused by human papillomavirus. (online). Disponível: <http://www.fda.gov> acesso 07 set 2006.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento. **Projeto Diretrizes**. set. 2002.

Fehrmann, F.; Laimins, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201-5207, 2003.

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncol**; 3:11-6 2002.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>, 2013.

Fife KH, Katz BP, Roush J, Handy VD, Brown DR, Hansell R. Cancer associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 174(5):1487–1493, 1996.

Flores, Y; Bishai, D; Lazcano, E; Shah, K; Lörincz, A et al. Improving cervical cancer screening in Mexico: Results from the Morelos HPV Study. **Rev de Salud Pú b de Méx**, 45 (Supl. 3): S388-398 2003.

Foliaki S et al.: Prevalence of HPV infection and other risk factors in a Fijian population. **Infect Agents and Cancer** 9:14 2014.

Gage JC, Partridge EE, Rausa A, et al. Comparative performance of human papillomavirus DNA testing using novel sample collection methods. **J Clin Microbiol**, 49:4185–4189 2011.

Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. **J Virol**. Feb;64(2):723–730 1990.

GARLAND, S. M. Prevalence and genotyping of HPV in cervical cancer among Australian women. **Int J Gynaecol Obstet**. Dec;67(3):163-8, 1999.

GIULIANO AR,PAPENFUSS MR,DENMAN CA,ZAPIENJG, ABRAHAMSEN M, HUNTER JB. Human papilomavírus prevalence at the USA-Mexico Border among women 40 years of age and older. **Int J STD AIDS**. Mar 16(3):247-51 2005.

GOMEZ DT, SANTOS JL. Human papilomavírus infection and cervical cancer: pathogenesis and epidemiology. **formatez**; 680-8 2007.

GONDOS A, BRENNER H, WABINGA H, et al. Cancer survival in Kampala, Uganda. **Br J Cancer** 92: 1808-1812 2005.

GONZAGA, Carolina Maciel Reis et al. Cervical cancer mortality trends in Brazil: 1980-2009. **Cad. Saúde Púb** [online]. vol.29, n.3, pp. 599-608. ISSN 0102-311X, 2013.

GOPALKRISHNA, V.; MURTHY, N.S.; SHARMA, J.K. et al. Increased human papillomavírus infection with the increasing number of pregnancies in Indian women. **J of Infect Dis**, 75: 75-78, 1995

GOVAN, V. A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papilomavírus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil®). **Therap and Clin Risk Management**, 4(1), 65-70 2008.

GREER CE, PETERSON SL, KIVIAT NB, MANOS MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues.Effects of fixative and fixation time. **Am J Clin Pathol**. 95:117-24 1991.

HILDESHEIM A, GRAVITT PE, SCHIFFMAN MH, KURMAN RJ, BARNES W, JONES S. Determinants of genital HPV infection in low-income women in Washington, DC. **Sex Transm Dis**. Sep-Oct;20(5):279-85 1993.

HOWLEY PM. Papillomaviridae and their replication. **Fund Virol**. 2nd ed. Ravar Press, p.947-78 1996.

HOWLEY, P.M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papilomavíruses. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, 117: 113-126, 2006.

IARC biological agents volume 100 BA review of human carcinogens lyon, france – 2012.

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. lyon, france – 2007.

ICTV-THE UNIVERSAL VIRUS DATABASE OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/vis.html>>. Acesso em: 09 Julho. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/> **J Clin Virol** 19(1-2):1-5 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil Rio de Janeiro: **INCA**; 2014.

JUAN DU, XIAONIAN LU, JUN LIANG, YONGSHENG YANG, JINRAN LIN, XIAOHUA ZHU, JINHUAXU. Detection and typing of human papillomavirus (HPV) in *Condyloma acuminatum* and *Bowenoid papulosis* HybriBio HPV GenoArray test kit, real-time polymerase chain reaction (PCR) and sequencing **Afric J of Pharmacy and Pharmacology** Vol. 7(3), pp. 73-77, 22 January, 2013

Kabsch, K. & Alonso, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocytes by different mechanisms. **J Virol** 76, 12162–12172, 2002.

KAJITANI N, SATSUKA A, KAWATE A, SAKAI H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. **Front Microbiol.** 3:152 2012.

KANESHIMA, E.N.; BIDOIA, C.C.G.; GABRIEL, M.; SUZUKI, L.E.; CONSOLARO, M.E.L. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, 23:731-737, 2001.

KANODIA, S. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KAWAI K, YAGINUMA Y, TSURUOKA H, GRIFFIN M, HAYASHI H, ISHIKAWA M. Telomerase activity and human papillomavirus (HPV) infection in human uterine cervical cancers and cervical smears. **Eur J Cancer**; 34: 2082-2086, 1998.

KITCHENER HC, CASTLE PE, COX JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**. Suppl 3: S63-S70 2006.

KJAER S, HOGDALL E, FREDERIKSEN K, MUNK C, VAN DEN BRULE A, SVARE E, MEIJER C, LORINCZ A, IFTNER T. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus positive, cytologically normal women over a 10-year period. **Cancer Res** 66:10630–10636, 2006.

KJAER SK et al. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. **J Natl Cancer Inst.** 102(19):1478-88, 2010.

KOMLY, C. A., BREITBURD, F., CROISSANT, O. & STREECK, R. E. The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1 a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens. **J of Virol** 60, 813-816 1986.

KOUTSKY LA, AULT KA, WHEELER CM, BROWN DR, BARR E, ALVAREZ FB, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. **N Engl J Med** 347:1645–51 2002.

LAZCANO-PONCE E, HERRERO R, MUÑOZ N, CRUZ A, SHAH KV, ALONSO P, HERNÁNDEZ P, SALMERON J, HERNÁNDEZ M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. **Int J Cancer** ; 91: 412–20 2001.

LEPIQUE AP, RABACHINI T, VILLA LL. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** ; 104(1):1-10 2009

LEVI, J E. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecol Oncol**, v. 92, p. 225-231, 2004.

LI N, FRANCESCHI S, HOWELL-JONES R, SNIJDERS PJF, CLIFFORD GM. Human Papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **Int J Cancer**. 128:927-35 2011.

LINHARES AC, VILLA LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **J Pediatr**; 82 (3): S25-S34 2006.

MANOS MM, TING Y, WRIGHT DK, LEWIS AJ, BROKER TR, WOLINSKY SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**.;7:209-14 1989.

MAO C, KOUTSKY LA, AULT KA, WHEELER CM, BROWN DR, WILEY DJ, et al. Efficacy of human papillomavirus- 16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstet Gynecol**; 107:18-27 2006.

MCCREDIE MR. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **Lancet Oncol**. May;9(5):425-34 2008.

MELNIKOW J. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol**.; 92(4 part 2):727-35 1998.

MIDDLETON K, PEH W, SOUTHERN S, GRIFFIN H, SOTLAR K, NAKAHARA T, EL-SHERIF A, MORRIS L, SETH R, HIBMA M, JENKINS D, LAMBERT P, COLEMAN N, DOORBAR J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **J Virol**, 77(19):10186-201 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de ciência tecnologia e insumos estratégicos. Portaria Nº 54 de 18 de novembro de 2013. Torna pública a decisão incorporar a vacina quadrivalente contra HPV na prevenção do câncer de colo do útero no Sistema Único de Saúde - SUS. **Diário Oficial da União..**; Poder Executivo, de 19 de Novembro de 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 3.124 de 7 de dezembro de 2006. Vacina quadrivalente recombinante contra papilomavírus humanos. **Diário Oficial da União**. Portaria Nº 3.124 de 7 de dezembro de 2006.; Poder Executivo, de 28 de agosto de 2006.

MODIS Y, TRUS BL, HARRISON SC. Atomic model of the papilomavírus capsid. **EMBO J** 21:4754-4762. 2002

MOLANO M, POSSO H, WEIDERPASS E, VAN DEN BRULE AJ, RONDEROS M, FRANCESCHI S, MEIJER CJLM, ARSLAN A, MUÑOZ N. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. **Br J Cancer**; 87: 324–33 2002.

MOORE MA, TAJIMA K. Cervical cancer in the asian pacific-epidemiology, screening and treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**. Oct-Dec;5(4):349-61 2004

MORENO, V; BOSCH, FX; MUNOZ, N; MEIJER, CJ; WALBOOMERS JM. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**. ;359 (9312):1085-92. Mar 2002.

MOSCICKI AB, ELLENBERG JH, FARHAT S, XU J . Persistence of human papilomavírus infection in HIV-infected and uninfected adolescent girls: Risk factors and differences, by phylogenetic type. **J Infect Dis** 190: 37-45, 2004.

MUNGER, K., B. A. WERNESS, N. DYSON, W. C. PHELPS, E. HARLOW, AND P. M. HOWLEY. Complex formation of human papilomavírus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO J**. 8:4099–4105 1989.

MÜNGER K, BALDWIN A, EDWARDS KM, HAYAKAWA H. Mechanisms of Human Papilomavírus-Induced Oncogenesis. **J Virol**; 78(21):11451-11460 Nov -2004.

MUNOZ N, BOSCH FX, CASTELLSAGUE X, DIAZ M, DE SANJOSE S, HAMMOUDA D, ET AL. Against which human papilomavírus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. **Int J Cancer**;111(2):278–85 2004.

MUNOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSE S, HERRERO R. Epidemiologic classification of human papilomavírus types associated with cervical cancer. **Engl J Med** Feb 6; 348(6):518-527 2003.

MUNOZ, N. Human papilomavírus and cancer: the epidemiological evidence. **J Clin Virol**, 19(1-2):1-5 2000.

NAGAO, S., YOSHINOUCI, M., MIYAGI, Y., HONGO, A., KODAMA, J., ITOH, S., KUDO, T. Rapid and sensitive detection of physical status of human papilomavírus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.** 40, 863–867, 2002.

NOBBENHUIS, M. A. E. Relation of human papilomavírus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. **Lancet**, v. 354, p. 20- 25, 1999.

NOBRE RJ, ALMEIDA LP, MARTINS TC. Complete genotyping of mucosal human papilomavírus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **J Clinic Virol.**;42(1):13-21 May 2008.

NORONHA VL, CRUZ EM, PINHO CN, MELLO WA, VILLA LV, RUSSOMANO FB. Papilomavirus (HPV) em mulheres submetidas a rastreamento para câncer da cérvix uterina Belém Pará Brasil. **J BRAS doenças Sex transm** ;23:5-11, 2011.

NOVAES H M D. A vacina contra HPV e o câncer de colo de útero: desafios para a sua incorporação em sistemas de saúde. **Rev bras epidemiol** .;11(3):505-25 2008.

OBEIDAT B, MATALKA I, MOHTASEB A, JARADAT S. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus genotypes in cervical carcinoma, low-grade, and high-grade squamous intraepithelial lesions in Jordanian women. **Eur J Gynaecol Oncol** 34:257-60, 2013.

ORTIZ, M. Oncogenic human papilomavírus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. **J of Clin Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1428-1434, 2006.

ÖSTOR AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. **Int J Gynecol Pathol**; 12:186-92 1993.

PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**;55:74–108 2005.

PIANA A, SOTGIU G, CASTIGLIA P, PISCHEDDA S, COCUZZA C. Prevalence and type distribution of human papilomavírus infection in women from North Sardinia, Italy. **BMC Public Health** 11: 785-793, 2011.

PINTO, A. P; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Rev da Assoc Méd Bras**, v.48, n. 1, p. 73-78, 2002.

PINTO DS; FUZII HT; QUARESMA J A S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. **Cad. Saúde Públ**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 769-778, 2011

PITTA, D. R. et al . Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, July 2010

RAMA, CRISTINA HELENA. **Prevalência de infecção por HPV em jovens primíparas e fatores associados.** Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5137/tde-19112009-165049>. Acesso em 06-02-2014

RAMANAKUMAR AV, GONCALVES O, RICHARDSON H, et al. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. **BMC Infect Dis**, 10, 326 2010.

RAMOS, KARINA SERRAVALLE. **Estudo do HPV e variáveis sociocomportamentais em mulheres com leão intra-epitelial de alto grau.** 2009. Tese – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-07042010-100935/> Acesso em 08-02-2014.

RICHART RM. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clin Obstet Gynecol.**;10(4):748-84 1967.

RIES LAG, EISNER MP, KOSARY CL. Cancer Statistics Review, 1975-2001. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2001/ acessado em 02/02/2013

ROCHA DAP, BARBOSA FILHO RAA, QUEIROZ FA, SANTOS CMB, “High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil,” **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, vol. 2013, 5 pages, 2013.

RODEN, R. B.; LING, M.; WU, T. C. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. **Hum Pathol.**, v. 35, p. 971-982, 2004.

ROTELI-MARTINS,C.M., LONGATTO-FILHO, A., HAMMES, L.S., DERCHAM, S.F.M., NALD, P., MATOS, J.C., ETUNGER, D., SARIAN, L., GONTIJO, R.C., MAEDA, M.Y.S., SYRJÄNEN, K,J. Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. **Rev Bras de Ginecol e Obstet**, **29(11)**: 580-587, 2007.

SALVIA. PAULO NEWTON DANZI. Correlação entre critérios morfológicos, citológicos e histológicos e presença do DNA do papilomavírus humano em biópsias cervicais uterinas detectado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase 2004 144 f tese (doutorado) pós-graduação da faculdade de ciências médicas, da universidade estadual de campinas 2004.

SANJOSE S, DIAZ M, CASTELLSAGUE X, CLIFFORD G, BRUNI L, MUNOZ N. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human

papilomavírus DNA in women with normal cytology: a meta analysis. **Lancet Infect Dis** ; 7:453-59 2007.

SANKARANARAYANAN R, NENE BM, SHASTRI SS, JAYANT K, MUWONGE R, BUDUKH AM, HINGMIRE S, MALVI SG, THORAT R, KOTHARI A, CHINOY R, KELKAR R, KANE S, DESAI S, KESKAR VR, RAJESHWARKAR R, PANSE N, DINSHAW KA. HPV Screening for Cervical Cancer in Rural India. **N Engl J Med**. 360:1385-94 2009.

SANT M, AARELEID T, BERRINO F. EUROCARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. **Ann Oncol** 14 Suppl 5: s61-118 2003.

SCHEFFNER, M., B. A. WERNESS, J. M. HUIBREGTSE, A. J. LEVINE, AND P. M. HOWLEY. The E6 oncoprotein encoded by human papilomavírus types 6 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell** 63:1129–1136 1990.

SCHILLER JT, CASTELLSAGUÉ X, VILLA LL, HILDESHEIM A. An update of prophylactic human papilomavírus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. **Vaccine**.;26S:K53-K61 2008.

SCHLECHT NF, TREVISAN A, DUARTE-FRANCO E, ROHAN T, FERENCZY A, VILLA LL, FRANCO EL. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer**, 103:519-524 2003.

SEEDORF, K., KRAMMER, G., DURST, M., SUHAI, S., ROWEKAMP, W.G. Human papilomavírus type 16 DNA sequence. **Virol** 145, 181–185 1985.

SELLORS J, SANKARANARAYANAN R. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**, 2003.

SILVA AMTC, AMARAL MVT, DA CRUZ AD. HPV e Câncer, (O Papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese). **Rev Biotec**; 29: 48-54 2003.

SILVA KC, ROSA MLG, MOYSE N, AFONSO LA, OLIVEIRA LHS, CAVALCANTI SMB. Risk factors associated with human papilomavírus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009

SILVA, G A E; GIRIANELLI, V R; GAMARRA, C J , BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M T. Cervical cancer mortality trends in Brazil, 1981-2006. **Cad. Saúd Públ [online]**., vol.26, n.12, pp. 2399-2407 2010.

SIMONELLA L M, Type-specific oncogenic human papilomavírus infection in high grade cervical disease in New Zealand. **BMC Infectious Diseases** 13:114 2013.

SMITH EM, JOHNSON SR, RITCHIE JM, FEDDERSEN D, WANG D, TUREK LP. Persistent HPV infection in postmenopausal age women. **Int J Gynaecol Obstet** ;87(2):131–7 2004.

SMITH JS, LINDSAY L, HOOTS B, KEYS J, FRANCESCHI S, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer** 121: 621–632 2007.

SOUSA R, DOSTATNI N, YANIV M. Control of papillomavirus gene expression. **Bio chin BiophhyActa.**; 1032:19-37. 1990

STANLEY M. HPV vaccines: are they the answer? **Br Med Bull**; 88:59–74 654161 2008

STEENBERGEN RD, KRAMER D, MEIJER CJ, WALBOOMERS JM, TROTT DA, CUTHBERT AP, et al . Telomerase suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16-immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line. **J Natl Cancer Inst.** ;93(11):865-72 2001.

STOPPLER, M.C., STRAIGHT, S.W., TSAO, G., SCHLEGEL, R. & MCCANCE, D.J. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. **Virology**, 223, 251–254 1996.

THOMISON J, THOMAS LK, SHROYER KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology** ;39:154-66 2008.

TROTTIER H, FRANCO EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**; 24 Suppl 1:S4-15 2006.

THULER L C S. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.** maio; 30(5):216-8 2008.

VACCARELLA S, FRANCESCHI S, HERRERO R. Sexual behavior, condom use and HPV: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. **CANCER EPIDEMIOLOGICAL BIOMARKERS PREVENTION** ;15:326–33 2006.

VALLE GF, BANKS L. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. **J. Gen. Virol.** 76:1239–1245 1995.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CALISHER, C.H., CARSTEN, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B.,. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. **Academic Press**, New-York, San Diego 2002.

VILLA, L.L. Biology of genital human papillomaviruses. **Int J of Gyn and Obst**, v.94, Suppl 1 (S3-S7), 2006.

WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV, ET AL. Human papilomavírus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol.**; 189(1): 12-9 1999.

WALLIN KL, WIKLUND F, ANGSTROM T, BERGMAN F, STENDAHL U, WADELL G. Type-specific persistence of human papilomavírus dna before the development of invasive cervical cancer. **N Engl J Med**; 341:1633-8 1999.

WERNESSE B A, LEVINE A J. HOWLEY P M, Association of human papilomavírus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**; 248:76-79 1990.

WHO. The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care. 2007.

WHO/ICO Comprehensive cervical cancer prevention and control: a healthier future for girls and women **WHO guidance note** 2013

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer Brazil. Human Papilomavírus and Related Cancers, **Fact Sheet** 2010

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. HPV and cervical cancer in the 2007 report. **Vaccine.** ;25(Suppl 3):C1-230 2007.

World Health Organization – WHO. Information Centre on HPV and Cervical Cancer. Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Spain. WHO. 2007.

ZHANG, B., SPANDAU, D.F. & ROMAN, A. E5 protein of human papilomavírus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. **J. Virol**, 76,220–231 2002.

ZIMMERMMANN, J. B.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Associação entre a contagem de linfócitos T CD4+ e a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em mulheres infectadas pelo HIV. **Rev Bras de Ginecol e Obstet**, v. 28, n. 6, p. 345-351, 2006.

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

APÊNDICES**1. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO****CADASTRO DA PARTICIPANTE**

NOME: _____ DN: / / ID:

LOCALIDADE: MUNICIPIO: -PARÁ.

GRAU DE INSTRUÇÃO: analfabeta () lê e escreve () 1º. Grau () 2º.
Grau () 3º. grau ()

ESTADO CIVIL: solteira () casada () separada () viúva () amigada ()
) outros.....

TRABALHO: domestico () lavoura () pesca () outros ()

Renda familiar: salário mínimo -1 () 1 () 2 () 3 () + de 4 ()

Tipo de casa: palha () madeira () alvenaria ()

Compartimentos: 1 () 2 () 3 () +4 ()

Tipo de terreno: seco () alagado () seco e alagado ()

Água: poço () rio ()

Tipo de fossa: à céu aberto () caixa ()

Destino do lixo: mato () queima ()

Numero de pessoas: _____ Número de mulheres e
idade: _____

Uso de roupas íntimas; SIM () NÃO ()

ANTECEDENTES GINECOLÓGICO E OBSTÉTRICO

GESTAÇÃO () PARTOS () ABORTOS () espontâneo ()
provocado ()

Nervosa () Preocupada ()

DOENÇAS CONGENITAS: _____

DOENÇAS NEOPLASICAS _____

DST: sim () não () Qual:
período:

Tipo de tratamento:

Início da atividade sexual: anos no. de parceiros:

Tempo c/ parceiro atual: Parceiros no mesmo período:

Parceiro de risco: sim () não () Porque:

Contraceptivo: condon () hormonal injetável () ACO () Tempo:

Idade da 1ª. menstruação: anos UR:

Ciclos regulares () irregular () Duração: Quantidade:
pouco () muito ()

Início da menopausa: uso de TRH: sim () não ()

Cirurgia: histerectomia () parcial () total () Conização ()
salpingectomia bilateral ()

Unilateral () ooforectomia bil () unilat ()

PCCU: data do primeiro: data do último:

Resultado do último:

Biópsia do colo uterino: Resultado do AP:

Tipo de alimentação: () salgada , () fresca, () carne, () peixe, () caça,
() frutas, () Verdura, () farinha, () açai, () café, () leite,

Fumante: não () sim () quantos cigarros:

No. de refeições: 1 () 2 () 3 () +3 ()

Bebida alcoólica: não () sim () diário () semanal () socialmente ()

Tipo de bebida: cachaça () cerveja () outras ()

Outras informações:

ANEXOS

1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº 050/2007-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** BUSCA ATIVA DE MULHERES RIBEIRINHAS DO ESTADO DO PARÁ NA PREVENÇÃO DAS LESÕES MALIGNAS E PRÉ-MALIGNAS DO COLO UTERINO E O PAPEL DA CARCINOGENESE DO HPV E DO P16
3. **Pesquisador Responsável:** Elza Baia de Brito.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 30/11/2007.
6. **Data do Parecer:** 03/11/2007.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela durante a reunião realizada no dia 03/11/2007. Considerando que foram atendidas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS, manifestou-se pela aprovação do parecer do relator.

Parecer: **APROVADO**

Belém, 03 de dezembro de 2007.


Prof. Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

*Recebi a cópia
nesta data.
Belém, 03/12/2007,
Elza Baia de Brito*

2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

RIO ou COMUNIDADE _____

MUNICÍPIO _____ ESTADO DO PARÁ.

Prezada senhora,

Você é convidada para participar do projeto de título “BUSCA ATIVA DE MULHERES RIBEIRINHAS E QUILOMBOLAS DO ESTADO DO PARÁ NA PRESENÇA DAS LESÕES PRÉ – MALIGNAS E MALIGNAS DO COLO UTERINO E O PAPEL DA CARCINOGENESE DO HPV E DO P16”, registrada no Comitê de Ética e Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, que tem ponto primordial a prevenção e detecção das lesões pré – malignas e câncer do colo uterino.

A sua participação será cumprida com as seguintes etapas do projeto:

- 1- Ouvinte de palestra educativa sobre a prevenção do câncer do colo uterino e doenças sexualmente transmissíveis, e poderá fazer perguntas para esclarecimentos.
- 2- Colheita de material para o exame preventivo e outros da pesquisa em um único ato.
- 3- Receberá o seu resultado de preventivo e tratamento ou indicação para serviço especializado, conforme o diagnóstico.
- 4- Permitir a divulgação dos resultados obtidos em todas as etapas do projeto, que poderão ser apresentados em congressos, em defesas de tese, em apresentações das instituições que fazem parte da pesquisa e publicações de revistas científicas nacional e internacional.

Estes procedimentos não oferecem riscos, são utilizados rotineiramente em ambulatórios médicos. Todos os participantes serão beneficiados, fazendo o exame preventivo e a avaliação da incidência da infecção por HPV, agente principal do câncer cervical pelo método de biologia molecular.

A participação não oferece ganhos financeiros, o nome não será divulgado, os resultados ficarão disponíveis quando forem solicitados.

A comunidade poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento que desejar sem haver nenhum tipo de represália.

Dra Elza Baía de Brito.

Doutora em Medicina / UNIFESP.

Médica do NMT - UFPA

DE ACORDO : _____

NOME COMPLETO

_____ PA, de de 20__.