



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOSIANE MONTANHO MARIÑO

**ANÁLISE DA ESTRATÉGIA DE RASTREIO DO CÂNCER DO
COLO DO ÚTERO POR AUTOCOLETA E TESTE RÁPIDO PARA HPV
EM MULHERES RIBEIRINHAS DO MUNICÍPIO DE COARI/AM.**

MANAUS

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOSIANE MONTANHO MARIÑO

**ANÁLISE DA ESTRATÉGIA DE RASTREIO DO CÂNCER DO
COLO DO ÚTERO POR AUTOCOLETA E TESTE RÁPIDO PARA HPV
EM MULHERES RIBEIRINHAS DO MUNICÍPIO DE COARI/AM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr. Kátia Luz Torres Silva

Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo Levi – USP

MANAUS

2015

M339a Marino, Josiane Montanho
Análise da estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM / Josiane Montanho Marino. 2015
141 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Dra. Kátia Luz Torres Silva
Coorientador: Dr. José Eduardo Levi
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Autocoleta. 2. HPV. 3. E6. 4. Genótipo. 5. Câncer Cervical. I. Silva, Dra. Kátia Luz Torres II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, APRESENTADA PELA ENFERMEIRA JOSIANE MONTANHO MARIÑO, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, REALIZADA NO DIA 23 DE SETEMBRO DE 2015.

Aos vinte e três dias do mês de setembro do ano de dois mil e quinze, às nove horas, no Auditório da Fundação Centro de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, nesta cidade de Manaus/Amazonas, reuniu-se a Banca Examinadora, indicada pela Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Mestrado em Ciências da Saúde, para julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **JOSIANE MONTANHO MARIÑO**, na Área de Concentração Ciências da Saúde, Linha de Pesquisa – Biodiversidade Amazônica aplicada às doenças regionais, intitulada “Análise da estratégia de rastreamento do câncer do colo do útero por autoamostragem e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM”. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública, compreendendo exposição seguida de arguição dos examinadores. Ao término dos trabalhos, a banca examinadora composta pelos membros Dra. Kátia Luz Torres Silva (Orientadora), Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos (membro titular) e Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani (membro titular) consideraram a aluna **JOSIANE MONTANHO MARIÑO** (X) Aprovada () Não Aprovada.

Manaus, 23 de setembro de 2015.

Prof^ª. Dra. Kátia Luz Torres Silva
Orientador

Prof^ª. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos
Membro Titular Interno

Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani
Membro Titular Externo

Prof. Dr. Edson de Oliveira Andrade
Coordenador

JOSIANE MONTANHO MARIÑO Josiane Montanho Mariño
Candidata

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois só Ele é merecedor de toda honra e glória. Ao meu esposo Jailson e meu filho Felipe que compreenderam os momentos de minha ausência. À minha mãe que sempre me incentivou a buscar o conhecimento e, a todas as pacientes que me receberam com atenção em suas casas, e que confiaram nesse trabalho.

Agradecimentos

À professora Kátia Luz Torres Silva, minha eterna gratidão, por ter abraçado comigo esse projeto, seu entusiasmo com os resultados dos projetos me contagiava e me dava ânimo para a pesquisa, e por ter compreendido minhas limitações. Na minha essência, tento absorver suas melhores características, não só para minha vida profissional, mas também pessoal. Com ética e empenho consegue colocar brilho em tudo que faz. É digna de admiração, sua elegância ao pontuar um erro e fazer suas correções com grande estilo. Aprendi que o verbo orientar tem uma definição muito mais ampla do que habitualmente encontrada nos dicionários. Conseguimos caminhar de mãos dadas, apesar dos trezentos quilômetros de distância física (Coari), e com a ajuda das inovações do mundo moderno. Independente de crenças e religiões, diria que és realmente LUZ, uma mulher guerreira e, acima de tudo “Amiga”.

Ao professor José Eduardo Levi pela confiança, pela honra em ter o seu nome junto às minhas produções científicas; Obrigada pelos esclarecimentos nas dúvidas relacionadas ao mundo novo de testes que foi me apresentado no Mestrado (“Pensei até que não iria conseguir”).

Mãe, obrigada por ter me ensinado a buscar o conhecimento mesmo nas adversidades, me mostrando com suas experiências de vida que nunca devemos desistir dos nossos objetivos. Tu és meu maior exemplo, mulher guerreira, ousada em tudo que faz. Não poderia ter ganhado de Deus um presente melhor, uma mãe tão especial como a senhora.

Minha eterna gratidão aos meus irmãos Evandro Júnior, Lene e Neide que sempre estiveram presentes me ajudando e me apoiando em todas as etapas da minha carreira profissional. E principalmente compreendendo minha ausência durante os almoços em família.

À professora Daniele Albuquerque, por estar sempre presente num momento importante do trabalho, que com habilidade, delicadeza e competência auxiliou, sobretudo, nas realizações das PCRs e leituras dos géis de eletroforese.

Ao funcionário do Laboratório de Genética do ISB/Coari, Renato Reis que se empenhou na busca das pacientes selecionadas, bem como na realização e análise dos testes. Pela disponibilidade em auxiliar para o progresso da pesquisa e o benefício das pacientes.

À Dra Mônica Bandeira, pela contribuição de enorme valor referente a realização das colposcopias e dos ensinamentos transmitidos com paciência e dedicação dados a mim e aos alunos de graduação do curso de enfermagem. Além disso, agradecer a Deus pela sua vida e sua amizade, pois é uma pessoa guerreira que luta pelos seus ideais e também por melhoria das condições de saúde da mulher no estado do Amazonas.

Aos alunos de graduação do curso de enfermagem (Cássia, Emily, Adriene, Antônio, Lígia, Lainara) que não mediram esforços para ajudar na fase de coleta de dados, participando de todas as viagens às comunidades e compartilhando comigo as expectativas em cada etapa do estudo.

Às minhas amigas do grupo de pesquisa HPV: Luciane, Heyde, Vanessa, Valquíria, Joana que me ajudaram nas etapas do processamento e análise das amostras.

À Enfermeira e colega, Silvia Caroline Camargo Soares pela ajuda no recrutamento das pacientes para seguimento e continuidade do estudo.

Ao Felician, pela ajuda nas análises estatística dos dados da população estudada;

Às pacientes pela boa vontade ao participarem da pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro.

À Diagnocel e Becton Dickinson que gentilmente cederam os insumos e equipamentos para os ensaios de citologia em meio líquido;

À Arbor Vita Corporation por gentilmente ter cedido os testes rápidos Onco E6™ para a realização do estudo.

À Rovers Medical Devices por gentilmente ter cedido os dispositivos de autocoleta utilizados no estudo.

À equipe do laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo pelo apoio na realização dos ensaios de Papillocheck e pelo suporte técnico nas fases de treinamento da equipe de Coari para realização do teste Onco E6 e PCR convencional para HPV.

RESUMO

Segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o câncer do colo do útero é a quarta causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo. A relação do HPV com o câncer cervical já está bem estabelecida. A Amazônia é a região do mundo com maior taxa de câncer cervical proporcional. A prevenção do Câncer cervical (CC) é pautada em muitos países e no Brasil em ações de rastreamento através de exame citológico pelo método de Papanicolaou. No entanto, o rastreamento do câncer cervical é um serviço de saúde crítico, que é muitas vezes indisponível para as mulheres nos países com poucos recursos. A possibilidade de se coletar amostra através da autocoleta seria uma alternativa bem-vinda, possibilitando que parte da população que não tem acesso aos programas de prevenção ou até foge deles pelo temor ou constrangimento viesse a ele se incorporar, aumentando assim os índices de cobertura no Amazonas. O presente estudo objetivou analisar a estratégia de rastreamento do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV, em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM. Trata-se de um estudo transversal realizado com 412 mulheres ribeirinhas do município de Coari/Brasil no período de agosto de 2014 a fevereiro de 2015, cuja amostra foi obtida nas suas casas por autocoleta utilizando dispositivo próprio (escova Rovers® Evalyn®). As amostras foram processadas utilizando teste rápido Onco E6™ (Arbor Vita Corporation-AVC), seguido do teste para DNA do HPV através de PCR in house tendo como alvo a região L1 do vírus e genotipagem pelo PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany). Mulheres com triagem positiva para um dos testes foram submetidas a avaliação colposcópica, e exame histopatológico quando necessário. O consentimento informado foi solicitado e um questionário de caráter anônimo e confidencial foi aplicado com questões sócio-econômicas, clínicas, comportamentais e sobre a aceitação da autocoleta. Para a análise das variáveis categóricas, foi utilizada a frequência absoluta e relativa e para as variáveis numéricas utilizou-se a média \pm ds, para a associação das variáveis com a infecção por HPV, utilizou-se o teste do Qui-quadrado de Pearson (χ^2) e/ou o teste exato de Fisher, através do programa Epi Info versão 7.0. Todas as 412 mulheres forneceram amostras independentes. A autocoleta com a escova Rovers® Evalyn® foi uma ferramenta aceita em 97,8% das mulheres entrevistadas e considerada fácil por 95,4% das participantes. A possibilidade do uso da autocoleta em conjunto com o teste rápido Onco E6™, em áreas remotas e de difícil acesso seria uma boa alternativa para o aumento da cobertura de rastreamento no estado do Amazonas. A prevalência da infecção pelo HPV foi de 18,7%, e os genótipos mais encontrados pela técnica do Papillocheck® foram o 51(1,94%), HPV 16 (1,7%), HPV 53 (1,2%) e HPV 18 (1%). Foram detectados 9 alterações histopatológicas (5 casos de NIC I, 2 NIC III, 2 Carcinoma invasor).

Palavras-Chave: Autocoleta. HPV. E6. Genótipo. Câncer Cervical. Rastreamento.

ABSTRACT

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), cervical cancer is the fourth most common cause of cancer among women worldwide. The relation of HPV with cervical cancer is already well established. The Amazon region is the world's region with the highest proportion of cervical cancer rate. Prevention of cervical cancer (CC) in Brazil, as in many other countries, is based on cytological examinations using the Papanicolaou method. However, screening for cervical cancer is a critical health service, which is often unavailable to women in resource-poor countries. The ability to collect samples by self-collection would be a welcome alternative, allowing part of the population to be covered, who does not have access to prevention programs or tends to avoid them due to fear of embarrassing exams, thus increasing coverage rates in the state of Amazonas. This study aims to analyze the screening strategy for cervical cancer by self-collection and a rapid test for HPV, among women living in riverfront populations in Coari / Amazonas (Brazil). This is a cross-sectional study of 412 women from such populations from Coari from August 2014 to February 2015, whose sample was obtained in their homes by using self-collection devices (brush Rovers® Evalyn®). The samples were processed using the rapid test Onco™ E6 (Arbor Vita Corporation, stroke), followed by the test for DNA of HPV by PCR in house, targeting the L1 region of the virus and genotyping by PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany). Women who screened positive for one of the test were submitted to a colposcopic evaluation, and to a histopathological exam when necessary. Informed consent was requested and a confidential and anonymous questionnaire was distributed with questions regarding socio-economic issues, clinical and behavioral questions, as well as concerning the acceptance of self-collection. For the analysis of categorical variables, we used the absolute and relative frequency and for numerical variables we used the mean \pm ds, for the association of variables with HPV infections, we used the chi-square test de Pearson (χ^2) and/or Fisher's exact test, using Epi info, version 7.0 software. All 412 women provided independent samples. The self-collection with Rovers® Evalyn® brush was a tool accepted by 97.8 % of the women interviewed and was considered easy by 95.4 % of the participants. The possibility of using self-collection together with the Onco E6™ rapid test in remote areas of difficult access would be a good alternative to increasing screening coverage in the state of Amazonas. The prevalence of the HPV infection was 18.7 %, and most common genotypes found by the technique of Papillocheck® were HPV 51 (1.94 %), HPV 16 (1.7%), HPV 53 (1.2%) and HPV 18 (1%). There were also detected 9 histopathological changes (5 cases of CIN I, 2 CINIII, 2 invasive carcinomas).

Keywords : Self-collection. HPV. E6 . Genotype. Cervical cancer. Tracking.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância em Saúde
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
AVC	Arbor Vita Corporation
CC	Câncer Cervical
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DNA	Acido desoxirribonucléico
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
DPCC	Departamento de Prevenção e Controle de Câncer
FAPEAM	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papiloma Vírus</i>
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em câncer
ICTV	<i>International Comittee on Taxonomy of Viruses</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
JEC	Junção escamocolunar
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LCR	<i>Long Control Region</i>
mAb	Anticorpos monoclonais
MCT	Ministério de Ciência e Tecnologia
MS	Ministério da Saúde
NIC	Neoplasia Intraepitelia Cervical
NIC I	Neoplasia Intraepitelia Cervical grau I
NIC II	Neoplasia Intraepitelia Cervical grau II
NIC III	Neoplasia Intraepitelia Cervical grau III
NICE	<i>National Institute of Health & Clinical Excellence</i>
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
Pb	Pares de base
pRb	Proteína do retinoblastoma (pRb)
SCC	Carcinoma de células escamosas
SEMSA	Secretaria Municipal de Saúde
SISCOLO	Sistema de Informação do. Câncer do Colo do Útero
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido

UFAM	Universidade Federal do Amazonas
USP	Universidade de São Paulo
VLPs	Partículas <i>virus-like</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore Filogenética da família <i>Papillomaviridae</i>	21
Figura 2: Genoma viral do HPV	23
Figura 3: Relação entre incidência da infecção cervical pelo HPV, pré-câncer e câncer com a idade.	25
Figura 4: Progressão do câncer de colo do útero.....	29
Figura 5: Estimativa da incidência de câncer do colo do útero em todo o mundo em 2012	30
Figura 6: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	31
Figura 7: Princípio do Teste Onco E6.....	42
Figura 8: Fluxograma metodológico primeira etapa	56
Figura 9: Fluxograma metodológico segunda etapa.....	57
Figura 10: Escova Evalyn Rovers®.	59
Figura 11: Uso da guia de leitura para interpretação dos resultados	60
Figura 12: Coleta de amostra cervical com a escova Rovers® Cervix Brush Combi.....	69
Figura 13: Kit de coleta de citologia em meio líquidoSurePathTM.....	69
Figura 14: Localização geográfica das comunidades incluídas no estudo.	74
Figura 15: Fluxograma dos resultados	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Comunidades visitadas durante o estudo e sua localização	53
Quadro 2- Sequência do primer PGMY09/11	63
Quadro 3- Condições necessárias da PCR para detecção do HPV	64
Quadro 4- Etapas do processo da PCR.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, no estado do Amazonas e em Manaus	32
Tabela 2- Características socioeconômicas e demográficas das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM, 2014	73
Tabela 3- Características clínicas e comportamentais das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM, 2014 (N=412).....	76
Tabela 4- Descrição da aceitação do uso do dispositivo de autocoleta pelas mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM, 2014.	78
Tabela 5- Alterações dos exames das mulheres positivas no teste Onco E6.....	79
Tabela 6- Distribuição da frequência da Infecção pelo HPV nas mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014.....	80
Tabela 7- Características sócio-demográficas das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014 infectadas pelo HPV	82
Tabela 8- Resultado citopatológico das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014.....	83
Tabela 9- Resultado colposcópico.....	83
Tabela 10: Resultado Histopatológico das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM	84
Tabela 11- Perfil sócioeconômico e de risco das mulheres com Carcinoma Invasor.	85
Tabela 12-Seguimento das mulheres com lesão para NIC III+.....	86
Tabela 13: Alterações citopatológicas comparadas com o teste molecular	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição da Frequência de idade das mulheres infectadas por HPV.....	80
Gráfico 2: Distribuição dos genótipos do HPV de alto risco das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014.	87

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	21
1.1.1 Taxonomia e Nomenclatura.....	21
1.1.2 Genoma do HPV	22
1.1.3 Infecção pelo Papilomavírus.....	23
1.1.4 Transmissão	25
1.1.5 Epidemiologia da infecção pelo HPV.....	26
1.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	28
1.2.1 HPV e Carcinogênese	28
1.2.2 Epidemiologia do Câncer do Colo do Útero	30
1.2.3 Fatores de Risco	33
1.3 DIAGNÓSTICO	34
1.3.1 Papanicolaou (Citologia Oncótica)	34
1.3.2 Citologia em meio líquido.....	36
1.3.3 Detecção do HPV por diagnóstico Molecular.....	37
1.3.4 Genotipagem do HPV	39
1.3.5 Testes Rápidos de detecção da Oncoproteína E6.....	41
1.3.6 Autocoleta associada a rastreio molecular do HPV	42
1.4. PREVENÇÃO	44
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	50
3.1 GERAL	50
3.2 ESPECÍFICOS	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 MODELO DE ESTUDO	51
4.2 PROBLEMÁTICA	51

4.3 HIPÓTESES	51
4.4 ÁREA DO ESTUDO	51
4.5 POPULAÇÃO DE ESTUDO	52
4.6 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	54
4.6.1 Critérios de inclusão:.....	54
4.6.2 Critérios de exclusão:	54
4.7 CÁLCULO AMOSTRAL.....	54
4.8. COLETA DE DADOS, DE AMOSTRA E PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES.	55
4.8.1 Coleta de dados e amostras por autocoleta.....	58
4.8.2 Realização do teste de detecção da proteína E6.....	60
4.8.3 Extração do ácido nucléico	61
4.8.5 Eletroforese	65
4.8.6 Genotipagem do HPV	65
4.8.7 Coleta de Amostras por citologia em meio líquido e colposcopia.....	68
4.8.8 Leitura das Lâminas	69
4.9.1 Análise dos Dados.....	71
4.11 RESULTADOS	72
4.12 DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO.....	120
PERSPECTIVAS E DESDOBRAMENTOS DO ESTUDO	122
APÊNDICES	139
ANEXOS	148

INTRODUÇÃO

Segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o câncer do colo do útero é a quarta causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo. O câncer do colo do útero figura no Brasil como a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo o tipo mais comum em algumas áreas menos desenvolvidas do país. No estado do Amazonas o câncer de colo de útero ocupa o primeiro lugar entre as neoplasias malignas em mulheres (BRASIL, 2016)

De acordo com o IARC, foi estimada a ocorrência de 527 mil casos novos e 266 mil mortes por câncer do colo do útero em mulheres, no mundo, em 2012. Cerca de 85% dos casos e 87% do total de mortes ocorrem nos países em desenvolvimento, principalmente devido à falta de acesso aos cuidados de saúde para a detecção e tratamento precoce das lesões (GLOBOCAN, 2012).

Sua prevenção é possível, pois sua evolução em geral ocorre de forma lenta, com fases pré-clínicas detectáveis, exibindo expressivo potencial de cura dentre todos os tipos de câncer (HOORY *et al.*, 2008). O prognóstico no câncer de colo uterino depende muito da extensão da doença no momento do diagnóstico, estando sua mortalidade fortemente associada ao diagnóstico tardio em fases avançadas (PINTO, D. S., FUZII, H. T. e QUARESMA, J. A. S., 2011).

A infecção persistente por tipos oncogênicos do HPV tem sido descrita como principal fator causal para o desenvolvimento do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras (CORNALL *et al.*, 2014; FERRAZ, SANTOS e DISCACCIATI, 2012; FONSECA, FERREIRA e NETO, 2013). A proporção de cânceres atribuíveis ao HPV varia conforme o local anatômico, com quase 100% da região cervical, 88% da região anal e <50% do trato genital inferior e câncer de orofaringe (GIULIANO *et al.*, 2015). Seu controle é de grande importância para a prevenção do câncer do colo de útero (FONSECA, FERREIRA e NETO, 2013).

A citologia oncológica é o principal método para o diagnóstico precoce das lesões cervicais. O exame de Papanicolaou permite que seja efetuada a detecção precoce em mulheres assintomáticas contribuindo para a detecção de lesões precursoras e da doença em

estágios iniciais. Ainda que seja um exame rápido, de baixo custo e efetivo para detecção precoce, sua técnica de realização é vulnerável a erros de coleta e de preparação da lâmina e a subjetividade na interpretação dos resultados (NASCIMENTO, 2010).

Novas tecnologias têm sido somadas ao arsenal diagnóstico disponível para detecção precoce desse tipo de neoplasia, entre as quais se incluem a citologia em meio líquido, os testes para detecção do HPV por meio da autocoleta, os testes rápidos, testes moleculares e outros. A autocoleta tem sido uma alternativa que permite aumentar a cobertura do exame em regiões de difícil acesso, pois não demanda o deslocamento das pacientes e nem o enfrentamento de condicionamentos sociais e culturais que impedem a obtenção de amostra cervical (LORENZI *et al.*, 2013).

A autocoleta consiste na introdução de um dispositivo estéril no canal vaginal tomados pela própria mulher com o objetivo de obter amostras de células da vagina e do colo do útero para avaliar a presença de HPV (Papilomavírus humano) e de outros patógenos sexualmente transmissíveis. Existem hoje vários formatos e modelos de dispositivos para este uso tais como: escovas, swabs, tampões, lavados entre outros (DARLIN *et al.*, 2013; JENTSCHKE, SOERGEL e HILLEMANN, 2013; LONGATTO-FILHO *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012).

Num estudo realizado na Índia, a técnica por autocoleta foi bem aceita pelas mulheres, 98,1% das mulheres foram capazes de fornecer uma amostra satisfatória, contrariando os questionamentos de que esta técnica não poderia ser adequada na Índia. Além disso, o teste de HPV com base na autocoleta pode ser uma boa alternativa para aumentar a participação entre mulheres no exame em lugares de difícil acesso, sendo uma estratégia justificável para a prevenção do câncer cervical (BHATLA *et al.*, 2009).

Um estudo recente de metanálise mostrou que para pesquisa da infecção por HPV de amostras obtidas pelo médico é necessário exame ginecológico, e que se forem autocoletadas podem prevenir o câncer de colo em áreas remotas. E que apesar do valor preditivo positivo do teste de HPV ser mais baixo em amostras vaginais autocoletadas comparadas com citologia, tais testes podem ser preferíveis para detectar neoplasias intra-epiteliais cervicais tipo 2 (NIC 2) ou lesões mais graves em ambientes de baixos recursos, onde a restrita infraestrutura reduz a eficácia dos programas de triagem citológica (ARBYN *et al.*, 2014).

A Amazônia é conhecida como uma área com um nível elevado de doenças sexualmente transmissíveis e alta incidência de câncer cervical. É uma região que tem um

grande território, onde há muitas comunidades isoladas na zona rural e indígena, áreas onde o acesso só é possível por via fluvial. Além disso, nas áreas urbanas o sistema de saúde é muito precário, tornando difícil o acesso às prevenções primárias e secundárias. As comunidades ribeirinhas do Estado do Amazonas encontram-se nas margens de rios, furos (comunicação natural entre dois rios ou entre um rio e uma lagoa de várzea) e igarapés, com difícil acesso aos centros urbanos e, conseqüentemente, aos serviços de saúde.

Historicamente, especialmente nessa região, os programas de rastreamento não foram capazes de superar o isolamento geográfico e as barreiras culturais significativas existentes. No último censo do IBGE feito em 2010, a população feminina do Amazonas dos 25 aos 64 anos era de 737.428 mulheres. Segundo os dados do SISCOLO, no ano de 2014, foram realizados 161.496 exames citopatológicos. Ao calcular esses dados, a razão de exames nesse ano é de 0,21%, ou seja, a cobertura realizada neste ano de 2014 em relação à população de rastreamento foi de 21%, mostrando que a cobertura do nosso Estado ainda está muito abaixo do preconizado pelo Ministério da Saúde, que é de 80% (BRASIL, 2014c)

Admite-se que o rastreamento das lesões precursoras ou neoplásicas cervicais permanece com importantes limitações na região amazônica. Diante disso, o estudo busca avaliar as estratégias que auxiliem o rastreamento e diagnóstico precoce do câncer de colo do útero e subsidiar discussões que reduzam os números de morbidade e mortalidade pela neoplasia.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.1.1 Taxonomia e Nomenclatura

A classificação taxonômica e a nomenclatura dos vírus são de responsabilidade do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Atualmente, os Papillomavirus são incluídos na família *Papillomaviridae* que, por sua vez, é dividida em 16 gêneros (alfa, beta, gama, delta, epsilon, zeta, eta, theta, iota, kappa, lambda, mu, nu, xi, omikron, pi), sendo que os Papilomavírus Humanos (HPVs) estão distribuídos em cinco gêneros: alfa (com 15 espécies), beta (5 espécies), gama (5 espécies), mu (2 espécies) e nu (1 espécie); e cada espécie pode apresentar vários genótipos virais (PIERCE CAMPBELL *et al.*, 2013; VAN DER MAREL *et al.*, 2014).

Foi então construída uma árvore filogenética de Papilomavirus humano (figura 1) e de outros animais, para melhor interpretação e demonstração da correlação entre a classificação genômica e o tropismo característico do HPV (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

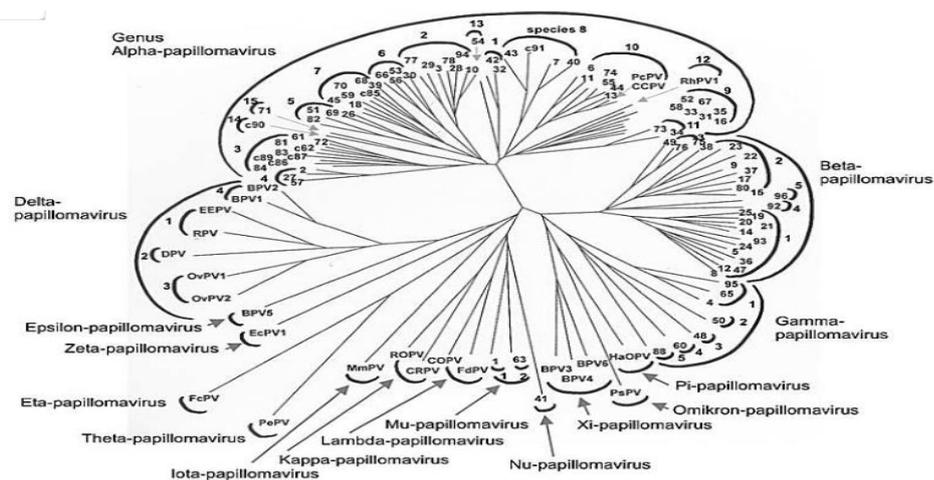


Figura 1: Árvore Filogenética da família *Papillomaviridae*
 Fonte: De Villiers *et al.*, (2004)

Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados e cerca de 40 destes infectam o trato anogenital feminino e 18 dos 40 tipos estão diretamente relacionadas ao câncer cervical (CC). Esses vírus são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, ou seja, a sua capacidade em gerar neoplasias malignas: em HPVs de baixo risco e alto risco oncogênico. Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico são representados principalmente pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72 e 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem frequentemente associados às neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) 2 e 3 e às neoplasias invasoras, são representados principalmente pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (BURK, HARARI e CHEN, 2013; MUNOZ *et al.*, 2003).

1.1.2 Genoma do HPV

O papilomavírus humano (HPV) pertencente à família *Papillomaviridae*, apresentando capsídeo icosaédrico e envoltório formado principalmente por proteínas denominadas L1 e L2. Os HPVs são epiteliotrópicos, não-envelopados, com genoma circular de fita dupla e cerca de 8.000 pb, medindo 55 nm de diâmetro. Seu genoma é dividido em três regiões: uma região longa de controle (*long control region* [LCR]) e as regiões precoce (E) e tardia (L). As regiões E e L codificam as proteínas virais, enquanto a LCR é chamada de região não-codificante (Figura 2) (ZONTA *et al.*, 2012).

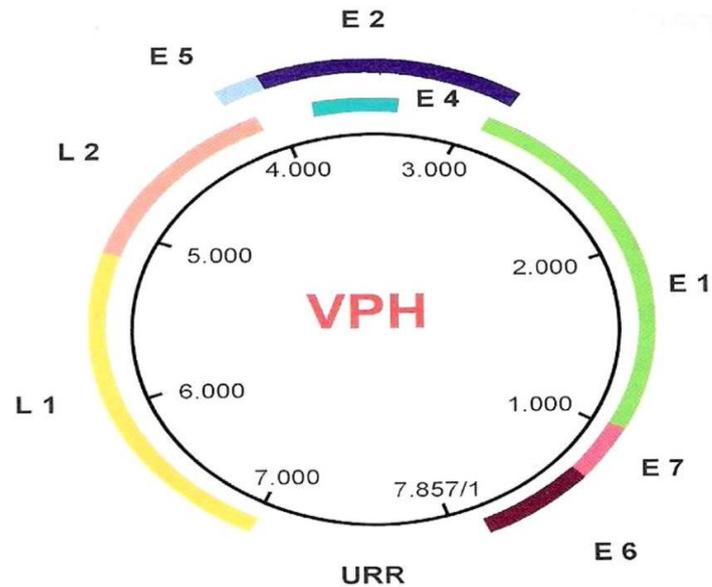


Figura 2: Genoma viral do HPV
 Fonte: (MUNOZ *et al.*, 2006)

A região reguladora LCR (*Long Control Region*) contém as sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da sequência de origem de replicação. A região E é formada pelos genes E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7. Dentre esses, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. Os genes E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular (ROSA *et al.*, 2009).

A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo. Assim, as regiões E são expressas logo após a infecção e codificam as proteínas envolvidas na indução e na regulação da síntese de DNA, enquanto as regiões L são expressas em estágios posteriores da infecção, sendo responsáveis por codificar as proteínas do capsídeo viral (ORTIZ *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2009).

1.1.3 Infecção pelo Papilomavírus

Os HPVs infectam a pele e mucosas e iniciam o ciclo infeccioso no momento em que penetram as camadas mais profundas do tecido epitelial como o que ocorre na cérvix uterina.

Em especial infectam células da junção escamo-colunar ou em regiões com microlesões que podem ocorrer durante o intercurso sexual (HOSTE, VOSSAERT e POPPE, 2013).

A infecção pelo HPV pode ocorrer em três formas distintas: clínica, subclínica e latente. As formas clínicas correspondem às lesões verrucosas, ou lesões exofíticas, tecnicamente denominadas condilomas acuminados e popularmente chamadas “crista de galo” ou “cavalo de crista” (EZECHI *et al.*, 2014).

Na forma latente não existem evidências clínicas, citológicas, colposcópicas ou histológicas desta infecção. É a forma evidenciada apenas através de técnicas de biologia molecular pois não há forma de lesões e somente o DNA do vírus pode ser detectado. A infecção pelo HPV depois de instalada pode estacionar, regredir ou progredir e transformar - se, dando origem às displasias e/ou carcinomas (FERRAZ, SANTOS e DISCACCIATI, 2012).

A forma subclínica é muitas vezes evidenciada por alterações na citologia, colposcopia ou no resultado histopatológico. No colo do útero, são chamadas de Lesões Intra-epiteliais de Baixo Grau/Neoplasia Intra-epitelial grau I (NIC I), que refletem apenas a presença do vírus, e de Lesões Intra-epiteliais de Alto Grau/Neoplasia Intra-epitelial graus II ou III (NIC II ou III), que são as verdadeiras lesões precursoras do câncer do colo do útero (DOOBAR, 2006).

Aproximadamente, 90% das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regredem espontaneamente, ao passo que acima dessa idade, a persistência é mais frequente, como ilustrado na figura 3, evoluindo para o câncer de colo do útero. A persistência e a progressão das infecções por HPV variam de acordo com o genótipo do vírus, e a idade também representa um fator de risco importante (NASCIMENTO, 2010).

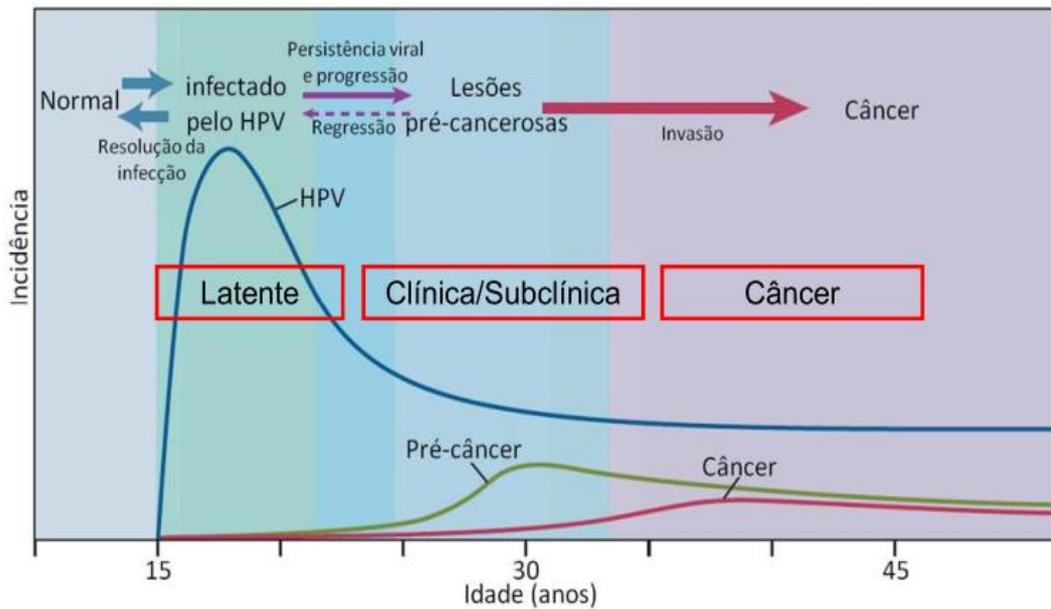


Figura 3: Relação entre incidência da infecção cervical pelo HPV, pré-câncer e câncer com a idade.
 Fonte: Adaptado de (SCHIFFMAN e CASTLE, 2005)

1.1.4 Transmissão

As vias de transmissão do HPV podem ser sexual e não sexual. Entre elas, a via sexual representa a grande maioria dos casos. Pode também ocorrer transmissão não sexual, como ocorre com as verrugas cutâneas, por fômites (toalhas, roupas íntimas etc.) e materno-fetal (gestacional, intra e periparto) (AYRES e SILVA, 2010).

A transmissão do HPV ocorre geralmente através do contato sexual ou por meio de fragmentos de tecido infectado que penetram através de soluções de continuidade. É necessário trauma no epitélio para indução da infecção pelo HPV. Os sítios mais comuns para o desenvolvimento da infecção são nas áreas sujeitas à abrasão durante o ato sexual, como por exemplo, o intróito posterior, nas mulheres, e o prepúcio, nos homens (AMARAL *et al.*, 2009).

1.1.5 Epidemiologia da infecção pelo HPV

Anualmente, cerca de 5 – 15% das mulheres previamente sem o vírus são infectadas com qualquer tipo de HPV de alto risco e aproximadamente 25% da incidência da infecção se concentra na faixa etária dos 15 – 19 anos. As taxas de incidência apresentam grande variação, conforme divulgado pelo *International Agency for Research on Cancer – IARC* em 2011: na Colômbia, foi registrada incidência de 5.0 por 100 pessoas-ano, nos EUA, de 15.8 por 100 pessoas-ano, já no Canadá foi de 16.8 por 100 pessoas-ano.

O HPV é considerado o agente infeccioso de transmissão sexual mais comum. Estima-se que o número de mulheres portadoras do DNA do vírus HPV em todo o mundo chega a 291 milhões e cerca de 105 milhões de mulheres no mundo inteiro terá infecção pelo HPV 16 ou 18 pelo menos uma vez na vida (IARC, 2011).

Um estudo envolvendo 11 países dos quatro continentes do mundo com a participação de 15.613 mulheres com citologia normal mostrou uma prevalência de 10.5% de infecção por HPV. Houve uma variação de até 20 vezes na taxa de prevalência entre os diferentes países investigados, sendo que a mais baixa foi encontrada na Espanha (1.4%) e mais alta na Nigéria (25.6%). A Europa foi o continente com menor taxa (5.2%). A Ásia teve uma taxa de prevalência de 8.7%, a América do Sul de 14.3% e a África de 25.6%. No entanto, foi encontrado uma maior prevalência do vírus HPV tipo 16 na Europa e o HPV 18 teve uma distribuição homogênea (IARC, 2011).

No Brasil, estima-se que 9 a 10 milhões de pessoas sejam portadoras do vírus e que se registrem 700 mil novos casos a cada ano (WHO, 2011). Uma metanálise de 104 estudos nacionais registrou um perfil de prevalência da infecção por HPV de alto risco semelhante ao dos países subdesenvolvidos sendo entre 11-15% na população citologicamente normal (AYRES e SILVA, 2010).

Num estudo transversal com amostra de 2.300 mulheres (15–65 anos) que buscaram rastreamento para o câncer cervical entre fevereiro de 2002 e março de 2003 em São Paulo e Campinas, a prevalência total da infecção genital por HPV de alto risco foi de 17,8% (RAMA *et al.*, 2008). A infecção genital por HPV de alto risco ocorreu em 14,3% das citologias

normais, em 77,8% das lesões escamosas de alto grau e nos dois (100%) casos de carcinoma (RAMA *et al.*, 2008).

Num estudo clínico-laboratorial da infecção pelo papilomavírus humano em homens HIV+/AIDS atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na cidade de Manaus, foi realizada coleta esfoliativa para detecção de DNA de HPV de alto risco através de Captura Híbrida em 266 pacientes do estudo, sendo encontrados os seguintes resultados: 120 (43%) de amostras positivas e 146 (57%) negativas testadas para DNA de HPV de alto risco (FIGLIUOLO, 2011).

Em um estudo realizado na cidade de Manaus-AM, com 61 mulheres sexualmente ativas sem alterações citológicas e 83 mulheres com lesões pré- malignas e malignas, detectou-se por PCR a presença de genótipos de HPV de alto risco identificados como 16, 33, 58, 66 e 68. O genótipo 16 foi o mais prevalente e um genótipo raro, tipo 13, foi relatado (CASTRO *et al.*, 2011).

Num estudo transversal realizado com 444 mulheres de duas regiões da Amazônia Oriental brasileira, submetidas ao rastreamento para câncer cervical, de janeiro de 2008 a março de 2010, utilizando a pesquisa do DNA do HPV por reação em cadeia da polimerase (PCR), verificou-se que 14,6% (IC95%: 11,4%-17,9%) apresentavam infecção genital pelo HPV, e a prevalência dessa infecção variou entre 15% (IC95%: 10,7%-20,3%) para a amostra urbana e 14,2% (IC95%: 9,8%-19,7%) na amostra rural, não ocorrendo diferença significativa entre os locais de recrutamento, mesmo considerando a estratificação por faixas de idade (PINTO, D. S., FUZII, H. T. e QUARESMA, J. A. S., 2011).

Rocha *et al.*, (2013), realizaram um estudo de detecção de DNA do HPV, no qual foram incluídas 361 mulheres sexualmente ativas com idade acima de 18 anos, no município de Coari-AM. A presença de DNA do HPV utilizando o *Nested* PCR foi encontrada em 105 mulheres (29,1%), e os tipos mais frequentes foram HPV 16 (58,1%) e HPV 58 (20%). No entanto, foram encontrados mais de 13 tipos de HPV, demonstrando que há uma alta diversidade genotípica de HPV em mulheres dessa região.

1.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

1.2.1 HPV e Carcinogênese

A infecção persistente por HPV de alto risco é condição necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento do câncer cervical (CC), estando presente o DNA viral em 99% dos casos (ORTIZ *et al.*, 2014).

A infecção se inicia na camada basal da epiderme, em decorrência da abrasão e micro lesões da pele ou mucosa. Na camada proliferativa o vírus pode se replicar e expressar suas proteínas precoces. No entanto, a replicação vegetativa do DNA, ou seja, a síntese de proteínas do capsídeo e a montagem de partículas virais, só têm lugar nas células mais diferenciadas. Todos os tipos de HPVs são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira.

Nas lesões malignas, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros. Para integrar-se ao DNA celular, é necessário que haja uma quebra no genoma viral. Esta separação não ocorre de forma aleatória, pois a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, resultando em transformação da célula hospedeira (DOOBAR, 2006; WOODMAN, COLLINS e YOUNG, 2007).

A ação oncogênica desse vírus está relacionada à interação das oncoproteínas E6 e E7 com a célula infectada, produzidos pelos genes precoces E6 e E7, respectivamente. Estas proteínas estão envolvidas no controle da proliferação celular, controlados pelos genes p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente, responsáveis pelo controle e correção do DNA celular, pela transformação celular e a evolução maligna das lesões (LEUNG *et al.*, 2014; LONGWORTH e LAIMINS, 2004).

A proteína E6 de HPV de alto risco oncogênico associa-se à proteína p53, que regula a passagem pelas fases G1/S e G2/M. E6 recruta as proteínas celulares, como é o caso das proteínas da família AP1 (E6-AP) que funcionam como uma ubiquitina ligase; atuando no complexo p53, podendo impedir o efeito supressor da proteína no ciclo celular. A formação

desse complexo protéico resulta na ubiquitinação de p53 seguido por sua rápida degradação mediada por um complexo proteossômico (LEUNG *et al.*, 2014).

A função principal do gene E7 é desregular a maquinaria do ciclo celular da célula infectada principalmente pela indução da transição da fase Go/S. A proteína E7 liga-se às proteínas da família pRb. Essa interação permite que E2F atue na ativação constitutiva dos fatores transcricionais, o que levaria à progressão do ciclo celular. Assim, a célula é induzida a dividir-se continuamente conduzindo à formação de um tumor de acordo com o demonstrado na figura 4 (ALBERTS *et al.*, 1994; DOOBAR, 2006).

Foi demonstrado que o gene E5 do HPV16 está envolvido na transformação celular e interage com o fator de crescimento epidérmico, EGF (*epidermal growth factor*), o que implica na estimulação do crescimento celular. Porém, a proteína E5 não está presente em carcinomas cervicais, o que indica não ser essencial na manutenção da transformação maligna das células do hospedeiro (GENTHER WILLIAMS *et al.*, 2005).

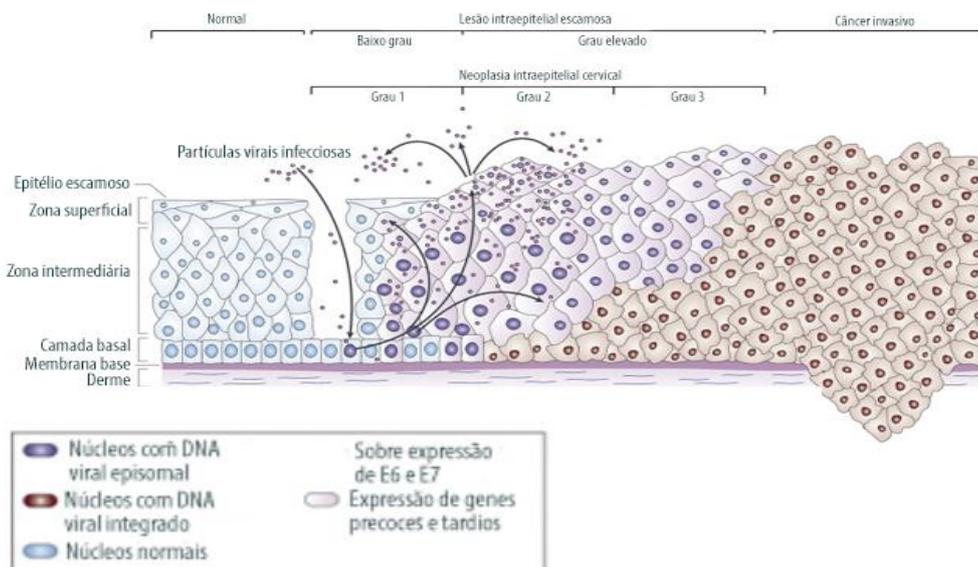


Figura 4: Progressão do câncer de colo do útero

Fonte: Adaptado de (WOODMAN, COLLINS e YOUNG, 2007)

1.2.2 Epidemiologia do Câncer do Colo do Útero

O câncer de colo uterino é um dos mais importantes, com incidência mundial estimada de aproximadamente meio milhão de casos por ano. O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres, e o sétimo no geral com uma estimativa de 528 mil novos casos em 2012. Cerca de 85 % da carga global ocorre nas regiões menos desenvolvidas, onde responde por quase 12% de todos os cânceres femininos (GLOBOCAN, 2012).

Em regiões de alto risco, como, a África Oriental (42,7), estima-se mais de 30/100.000 mulheres. As taxas são mais baixas na Austrália / Nova Zelândia (5.5) e Ásia Ocidental (4.4). Em 2012 a estimativa foi de 266 mil mortes por câncer do colo do útero em todo o mundo, representando 7,5 % de todas as mortes por câncer do sexo feminino (GLOBOCAN, 2012). Nos países ocidentais, a incidência e a mortalidade do CC declinaram substancialmente ao longo das últimas décadas, ao passo que nos países em desenvolvimento, há um ligeiro aumento na morbidade (figura 5).

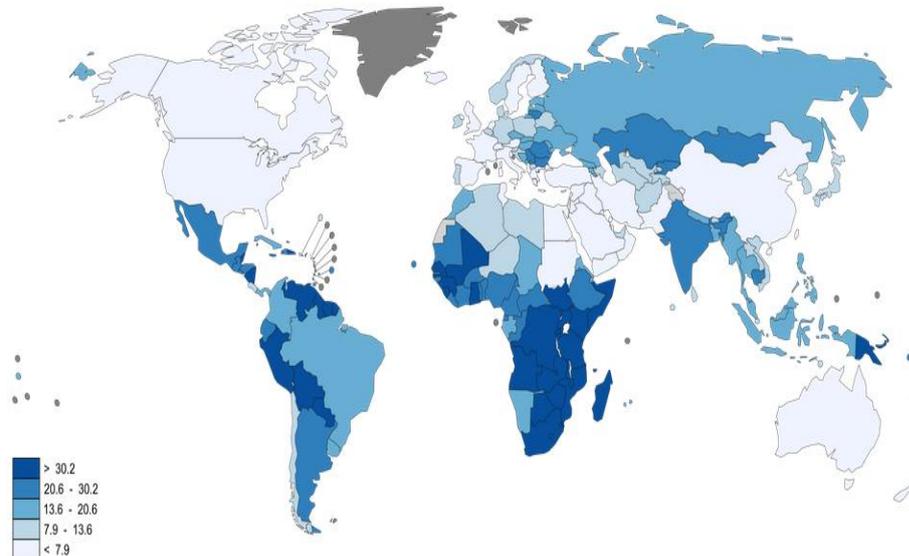


Figura 5: Estimativa da incidência de câncer do colo do útero em todo o mundo em 2012

Fonte: (GLOBOCAN, 2012)

Sua incidência aumenta consideravelmente em países em desenvolvimento, especialmente nos de baixa renda. As maiores taxas de incidência de câncer de colo uterino são encontradas na América Latina, Caribe e África (BRAY *et al.*, 2012).

Em geral, a incidência do CC começa a partir dos 30 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos (GLOBOCAN, 2012).

Apesar de a incidência ser nessa faixa etária, dados demonstra que em regiões como a Amazônia brasileira essas mulheres chegam a ser acometidas por esta doença ainda muito jovens. Num estudo realizado com 42 mulheres portadoras de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON), na cidade de Manaus foi encontrado um caso de lesão intraepitelial escamosa de alto grau ocorreu em idade de 18 anos e um caso de câncer invasor na idade de 24 anos (CORREA, 2005).

Para o ano de 2016, no Brasil, são esperados 16.340 casos novos de câncer do colo do útero (figura 6), com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres, sendo o terceiro câncer mais prevalente em mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma (BRASIL, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 6: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma

Fonte:(BRASIL, 2016).

De acordo com dados do INCA (2016) estimou-se 1.970 casos novos para a região Norte. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição (BRASIL, 2016).

A análise detalhada dos dados mostra um panorama mais alarmante para o estado do Amazonas e sua capital (Manaus). A incidência projetada para o ano de 2016 para o estado foi de 37/100.000 e para Manaus de 53/100.000 (taxa bruta), conforme a tabela 1, aproximando-se dos números verificados em países africanos sem programas estabelecidos de rastreio e com frequente co-infecção pelo HIV como o Malawi, a Tanzânia e a Zâmbia (ARBYN, 2011).

Tabela 1- Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, no estado do Amazonas e em Manaus

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	520	28,08	330	35,31	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	440	24,25	380	39,34
Colo do Útero	-	-	-	-	680	37,14	520	53,73
Traqueia, Brônquio e Pulmão	180	9,63	120	12,57	120	6,53	100	9,79
Cólon e Reto	100	5,60	90	9,17	130	6,98	100	10,73
Estômago	270	14,47	200	21,24	130	7,20	100	10,14
Cavidade Oral	70	3,75	60	6,61	30	1,44	20	1,93
Laringe	80	4,39	70	7,38	**	0,79	**	1,07
Bexiga	40	2,36	30	3,42	20	1,04	20	1,74
Esôfago	40	2,19	30	3,65	**	0,66	**	0,95
Ovário	-	-	-	-	70	3,90	60	6,44
Linfoma de Hodgkin	20	1,26	20	2,19	**	0,51	**	0,94
Linfoma não Hodgkin	60	3,33	50	5,28	40	2,24	30	3,34
Glândula Tireoide	**	0,70	**	0,79	80	4,24	50	5,16
Sistema Nervoso Central	60	3,17	50	5,19	50	2,87	40	4,55
Leucemias	70	3,90	50	5,79	50	2,87	40	4,27
Corpo do Útero	-	-	-	-	70	3,59	50	4,82
Pele Melanoma	20	1,04	**	1,53	**	0,62	**	0,90
Outras Localizações	470	25,53	340	36,70	320	17,66	240	25,02
Subtotal	2.010	108,13	1.460	156,53	2.270	123,70	1.790	183,06
Pele não Melanoma	490	26,40	310	33,60	500	27,44	300	31,05
Todas as Neoplasias	2.500	134,50	1.770	189,76	2.770	150,95	2.090	213,74

Fonte: (BRASIL, 2016)

Apesar de haver uma alta incidência do CC no estado do Amazonas, acredita-se ainda que muitos casos diagnosticados sejam subnotificados. Dentre alguns motivos destaca-se a falta de informação das pacientes diagnosticadas que acabam por procurar serviços de saúde privados para acompanhamento e tratamento dos casos. Desta forma, as informações referentes aos resultados dos exames colposcópico e histopatológico, bem como o tratamento das mulheres não chegam a ser registradas no SISCOLO.

1.2.3 Fatores de Risco

Muitos estudos têm tentado mostrar um tipo de associação entre idade, fatores reprodutivos, conjugais, grau de instrução, religião, ocupação e comportamentos sexuais com o risco de desenvolver o HPV e o câncer cervical. A exposição ao HPV é criticamente dependente do comportamento sexual, idade da primeira relação sexual, seleção de métodos de barreira e, do número de parceiros sexuais durante toda a vida (PINTO, D. D. S., FUZII, H. T. e QUARESMA, J. A. S., 2011).

Esse tipo de câncer é, na maioria dos casos, associado a fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente e aos hábitos de vida como promiscuidade, grande número de filhos, início precoce de atividade sexual e infecções ginecológicas repetidas, estando a curva da prevalência relacionada, na maioria das regiões, com a idade (ALBRING, BRENTANO e VARGAS, 2006).

Silva *et al.*, (2011) relataram que outros co-fatores têm sido associados com o desenvolvimento do câncer cervical como uso de contraceptivos orais, tabagismo, imunossupressão, particularmente relatado em paciente com HIV, infecções com outras doenças sexualmente transmissíveis e deficiências nutricionais; porém, seus verdadeiros papéis no desenvolvimento do câncer permanecem obscuro.

O tabagismo eleva o risco de desenvolvimento do câncer do colo do útero, diminui a quantidade e função das células de Langerhans, células apresentadoras de antígenos que são responsáveis pela ativação da imunidade celular local contra o HPV (SIMONATO e MIYAHARA, 2007). Esse risco é proporcional ao número de cigarros fumados por dia e aumenta, sobretudo, quando o ato de fumar é iniciado em idade precoce (ZHEN, HU e BIAN, 2013).

A alta paridade é um fator consistente para o câncer cervical em mulheres que possuem DNA do HPV. O fator de risco dobra nas mulheres que tiveram 4 filhos, quando comparado com as que tiveram 1 ou nenhum. Com relação aos contraceptivos orais, o seu uso prolongado aumenta o risco de desenvolver carcinoma cervical. (QUEIROZ, CANO e ZAIA, 2007).

A imunossupressão ou a imunodeficiência como a encontrada em receptores de transplantes ou em pessoas portadoras de HIV, não é somente um fator de risco para infecções genitais por HPV e sua progressão para neoplasias intra-epiteliais cervicais e cânceres genitais, mas também um fator de risco para lesões cutâneas benignas e malignas induzidas por HPV (BRENDLE, BYWATERS e CHRISTENSEN, 2014). As doenças sexualmente transmissíveis como as provocadas por Citomegalovírus e Clamídia são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de lesão intra-epitelial escamosa (EZECHI *et al.*, 2014; RAMOS, 2009).

Num estudo clínico-laboratorial da infecção pelo papilomavírus humano em homens HIV+/AIDS atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na cidade de Manaus, observou-se que a prevalência foi maior nos indivíduos de baixa escolaridade, aproximadamente 50%, e naqueles que usavam drogas 55%, inclusive com significância estatística (FIGLIUOLO, 2011).

1.3 DIAGNÓSTICO

1.3.1 Papanicolaou (Citologia Oncótica)

O exame de citologia oncótica descrito por George Nicholas Papanicolaou em 1941 ainda constitui o principal método utilizado para a detecção do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras. Esta técnica consiste na avaliação morfológica das células de esfregaços obtidos da superfície do colo uterino colhido através do uso de dispositivos como escovas ou espátulas (OLIVEIRA, 2011).

É o método mais utilizado em todo o mundo para detectar câncer de colo do útero, e identifica entre 80% e 95% dos casos da doença, inclusive nos estágios iniciais. Geralmente se recomenda que as mulheres realizem o exame anualmente a partir dos 25 anos. Tendo dois resultados negativos, a periodicidade do exame passa a ser a cada três anos, conforme as Diretrizes do Ministério da Saúde (INCA, 2013).

Atualmente, a classificação de Bethesda é uma das mais utilizadas para o diagnóstico citológico das amostras provenientes do colo uterino e categoriza as células anormais em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (L-SIL) e lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (H-SIL) (BRASIL, 2012).

As lesões de baixo grau representam, na sua grande maioria, modificações morfológicas associadas à replicação ativa do HPV (por exemplo, a coilocitose), enquanto as lesões de alto grau indicam a transformação celular, caracterizada principalmente por alterações nucleares. Amplos estudos epidemiológicos têm demonstrado um grande impacto na redução das taxas de incidência do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras, quando utilizada esta metodologia para o rastreamento desta doença (BRASIL, 2012; VAN DER MAREL *et al.*, 2014).

Apesar de sua grande especificidade, esta metodologia possui sensibilidade limitada na detecção de lesões precursoras do colo uterino, fato atribuível à variação da interpretação deste método e a baixa qualidade nos processos de coleta e preparação da amostra. Este método apresenta uma variabilidade na detecção de lesões de alto grau, além de não ser determinante na classificação das amostras atípicas definidas como “células escamosas atípicas de significado indeterminado” (ASCUS) (CASTLE, 2008; OLIVEIRA, 2011; SCHIFFMAN *et al.*, 2011).

Desta forma, existem controvérsias na literatura quanto à utilização deste exame como triagem única na detecção de lesões precursoras do câncer do colo uterino, principalmente na detecção de adenocarcinomas e de suas lesões precursoras, em que este teste não se mostrou suficientemente sensível (LAZCANO-PONCE *et al.*, 2011). Entretanto, quando bem realizado, o que inclui a coleta, o processamento e a leitura das lâminas, este exame ainda é de fundamental importância no rastreamento do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras (BRASIL, 2013).

1.3.2 Citologia em meio líquido

Outro método que vem sendo empregado é a citologia em meio líquido. A citologia em base líquida foi introduzida como uma alternativa à utilização do método convencional, com o propósito de melhora na especificidade e qualidade da amostra na lâmina. Como neste método é feita uma suspensão de células, cria-se a possibilidade de fazer outros testes que não apenas a leitura da lâmina no microscópio ótico, na coloração de Papanicolau (BEERMAN *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2014).

Consiste em um método em que as células cervicais coletas são imersas em um líquido conservante antes do processamento da amostra. Além disso, o kit de coleta utilizado nessa metodologia permite que sejam utilizadas 100% das células coletadas da região cervical. A melhor qualidade dos resultados resulta em uma sensibilidade potencialmente maior que a do teste de Papanicolaou, permitindo, ainda, que o material residual seja utilizado para o diagnóstico molecular (ARBYN *et al.*, 2008; LONGATO FILHO e SCHMITT, 2010; LONGATTO FILHO *et al.*, 2005).

Tal metodologia retém hemácias e células inflamatórias, além de evitar artefatos como excesso de muco, ressecamento provocado pelo ar e sobreposição celular (LEGOOD, WOLSTENHOLME e GRAY, 2009; NANDINI *et al.*, 2012).

Há evidências de que a citologia em base líquida tem dificuldades de implementação em razão do custo elevado, em relação ao método convencional. Porém, no ano de 2000, o Instituto Nacional de Saúde e Excelência Clínica (*National Institute of Health & Clinical Excellence –NICE*), com sede em Londres no Reino Unido, analisou a implementação desta técnica neste país, como alternativas em automatizada ao método convencional. A inserção de vários projetos pilotos avaliaram em um relatório provisório que seria possível a implementação do teste por 5anos. Isso ocorreu em 2003 e em 2007, 85% dos laboratórios da Inglaterra haviam convertido sua técnica para a citologia em base líquida, ou tinham planos firmes para tal (LEGOOD, WOLSTENHOLME e GRAY, 2009).

Diversas técnicas de citologia em base líquida vêm sendo desenvolvidas, baseadas na utilização de uma solução estável para a preservação do material coletado e no preparo da lâmina no laboratório, não mais nos consultórios de ginecologia, onde geralmente ocorre a coleta da amostra (GIRIANELLI e SANTOS THULER, 2007; RONCO *et al.*, 2012).

1.3.3 Detecção do HPV por diagnóstico Molecular

O estabelecimento do HPV como agente etiológico do câncer do colo uterino promoveu nas duas últimas décadas o desenvolvimento de diversas metodologias utilizadas para sua detecção. Desta forma, além do teste de Papanicolaou, a detecção da presença do HPV é atualmente utilizada na triagem de lesões do colo uterino em países como a Holanda (ARBYN *et al.*, 2014; LENSELINK *et al.*, 2009; LORENZI *et al.*, 2013).

Infecções por HPV sub-clínicas do colo do útero podem ser diagnosticadas por colposcopia, hibridização de DNA viral, reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, histologia ou pelas mudanças características do HPV no esfregaço Papanicolaou (OLIVEIRA, 2011). Dentre elas a mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilita à amplificação específica de um determinado fragmento de DNA (JENTSCHKE, SOERGEL e HILLEMANN, 2013). A PCR possibilitou uma nova forma de isolamento e identificação de genes sem que houvesse a necessidade da clonagem celular destes. A PCR se baseia na amplificação específica dos segmentos do DNA-alvo e tem potencial para detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos, mesmo em infecção ditas não-produtivas (AMARO-FILHO *et al.*, 2013; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2011). Através desta técnica é possível obter uma grande quantidade de DNA de uma região específica a partir de quantidades extremamente pequenas de um DNA-molde, permitindo que a presença de determinado agente infeccioso possa ser diagnosticada de forma direta, através da identificação de seus genes (RODRIGUES *et al.*, 2009).

A PCR em tempo real (PCR-TR), por sua vez, é uma variação do método da PCR convencional (PCRc). É uma técnica que realiza a detecção constante do sinal fluorescente de uma ou mais regiões da PCR ao longo dos ciclos de amplificação. Esta metodologia permite distinguir as sequências de bases amplificadas de DNA por análise da temperatura de separação das duplas fitas, e como as reações ocorrem em ambiente fechado, diminui a ocorrência de contaminações. Além disso, o uso de Primers universais permite, teoricamente, a detecção de todos os tipos de HPV existentes (RODRIGUES *et al.*, 2009). As metodologias mais utilizadas na reação de PCR em tempo real são: *SYBR® Green I* e *TaqMan®*.

O sistema *SYBR*® I envolve a incorporação do corante na dupla fita de DNA formada. Esse complexo formado resulta em um aumento da produção de fluorescência, quando devidamente excitado, de cerca de 2000 vezes o sinal inicial. Esse sistema tem uma boa relação sinal/ruído. Apresentam vantagens de ser de baixo custo, desenvolvimento do ensaio fácil, necessita apenas de um par de iniciadores, e o mesmo mecanismo de detecção pode ser usado para diferentes ensaios. No entanto, tem a desvantagem de ser inespecífico; toda molécula de DNA fita dupla, como os dímeros de iniciadores e produtos de PCR inespecíficos irá gerar um sinal (NOVAIS e ALVES, 2004).

No sistema *TaqMan*® se utilizam sondas (fragmentos de DNA marcados, usados para hibridizar outra molécula de DNA) para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Durante a PCR em tempo real a sonda *TaqMan*® hibridiza com a sequência de uma fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo de amplificação, a sonda *TaqMan*® é degradada devido à atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida. O resultado da reação é lido por programa de computador acoplado ao aparelho de PCR em tempo real, não sendo necessário, portanto, processamento pós-reação (corrida em gel de agarose para visualização do fragmento amplificado), facilitando e diminuindo o tempo do processamento (NOVAIS e ALVES, 2004).

Outro teste molecular muito utilizado para a detecção do HPV, é a captura híbrida 2 (CH 2). Trata-se de um teste quantitativo que detecta 18 tipos de HPV divididos em grupos de baixo (6, 11, 42, 43 e 44) e alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). A CH2 apenas detecta os HPVs de alto risco, mas não pode determinar o tipo viral específico. Além disso, não detecta todos os tipos virais de alto risco e a sensibilidade do método (cerca de 5.000 cópias/mL) pode não ser adequada para revelar a presença do vírus no início da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2009).

1.3.4 Genotipagem do HPV

A genotipagem do HPV é importante ferramenta para a condução clínica, determinação do prognóstico da infecção e análise epidemiológica do padrão da infecção em determinada população.

1.3.4.1 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Esta técnica se baseia na análise do perfil de restrição (tamanho dos fragmentos gerados após a clivagem) de um determinado fragmento de DNA. Na técnica de PCR-RFLP, primeiramente é realizada uma PCR e, posteriormente, o amplicon é clivado com uma ou mais enzimas de restrição. O perfil de restrição é analisado em um gel de agarose ou poliacrilamida. Este método é laborioso e depende da capacidade das enzimas de restrição em detectar mutações específicas. É um bom método para a detecção de infecções únicas pelo HPV, mas não é aplicável para a detecção de infecções múltiplas (ROSSETI, SILVA e RODRIGUES, 2006).

1.3.4.2 Hibridização Reversa

A hibridização reversa é um método que permite a hibridização simultânea de um produto de PCR a múltiplas sondas de oligonucleotídeos. Consiste na imobilização de múltiplas sondas em uma fase sólida e a adição do produto de PCR biotilado. Após a hibridização seguem-se as etapas de lavagem, adição do conjugado e substrato, que permitirá a visualização do tipo de HPV presente na amostra por meio do desenvolvimento de cor na linha da sonda à qual o produto de PCR hibridizou (MOLIJN *et al.*, 2005).

1.3.4.3 Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, USA)

O Linear Array é um teste qualitativo que detecta simultaneamente 37 genótipos de HPV que infectam a região anogenital (HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51,

52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39, e CP6108) (GUETTITI *et al.*, 2014).

O teste baseia-se na amplificação por PCR de um fragmento de 450 pb da região L1 do HPV. Este teste utiliza *primers* PGMY09/11 biotinizados para amplificar o fragmento de 450 pares de base correspondente a região L1 do genoma do HPV e baseia-se em quatro etapas: preparação da amostra, amplificação por PCR do DNA alvo, hibridização dos produtos amplificados com sondas específicas fixadas em linhas paralelas em fitas de membrana de nylon e detecção dos produtos amplificados e ligados a sonda por determinação colorimétrica. Como controle da extração do DNA e eficiência da amplificação, é utilizado um par de *primers* da β -globina humana. A identificação dos diferentes genótipos do HPV é feita mediante leitura visual das linhas azuis que apareceram nas tiras, as quais são comparadas com o padrão das linhas de referência fornecidas pelo fabricante (DALSTEIN *et al.*, 2009; SERRAVALLE *et al.*, 2015).

1.3.4.4 Microarrays (Chips de DNA)

O teste PapilloCheck® é baseado na amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 350 pb na região E1 do HPV, utilizando um conjunto de iniciadores consenso, e posterior hibridização com sondas de DNA fixadas em um chip. Cada iniciador reverso possui na ponta 5' uma marcação universal, na qual ligam-se as sondas marcadas com Cy5-dUTP (cyanine 5) contidas no tampão de hibridização. A leitura do chip é realizada por meio do instrumento CheckScanner™, nos comprimentos de onda de 532nm e 635nm, e o resultado é automaticamente interpretado pelo software CheckReport™ (DALSTEIN *et al.*, 2009; SERRAVALLE *et al.*, 2015).

Cada Chip de DNA do PapilloCheck® compreende 12 poços, que contêm um *microarray* com 28 sondas, em cinco réplicas cada. Permite a detecção e identificação simultânea de 24 genótipos do HPV (HPV – 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82) (BERTHET *et al.*, 2014; DALSTEIN *et al.*, 2009).

O gene humano ADAT₁ (adenosina deaminase 1) é amplificado simultaneamente como controle interno com a finalidade de verificar a qualidade do DNA e a presença de inibidores de PCR.

Essa técnica contém quatro controles que permitem avaliar a qualidade de todas as etapas do processamento da amostra (extração de DNA da amostra, PCR, hibridização e orientação) (DALSTEIN *et al.*, 2009).

1.3.5 Testes Rápidos de detecção da Oncoproteína E6

A falta de implementação de testes de rastreio adequados para o pré-câncer e câncer cervical ainda contribui muito para a alta prevalência de câncer cervical principalmente em regiões de difícil acesso e com poucos recursos. Um teste de triagem em ambientes de baixos recursos deve ser: simples, rápido, custo-benefício, sensível e específico para detecção de lesões que necessitam de intervenção clínica (VARNAI *et al.*, 2008).

Os principais eventos que provocam a transformação do epitélio do colo uterino são desencadeados pela expressão desregulada dos oncogenes virais E6 e E7 dos HPV de alto risco nas células replicativas basais e parabasais do epitélio infectado (JABBAR *et al.*, 2012).

Existem testes como o cervical Onco E6TM que são qualitativos e detectam os níveis elevados da Oncoproteína E6 expressos pelo HPV 16 e 18, usando células lisadas geradas a partir de amostras de esfregaços cervicais. Estes testes baseiam-se na incubação de anticorpos monoclonais (mAb) à oncoproteína E6 do HPV 16 e 18 conjugada com fosfatase alcalina (AP) (figura 7) (ZHAO *et al.*, 2013). Neste caso, a interpretação do resultado é feita por uma tira teste de nitrocelulose com anticorpos de captura monoclonal para E6 16/18. A tira contendo fosfatase alcalina é colocada na solução lise da amostra. Se a oncoproteína E6 estiver presente na faixa uma linha roxa é visível no local específico para o HPV 16 e 18 (Quadro 2). Estes tipos de ensaio não exigem equipamentos complexos, nem exigem uma cadeia de frios para o transporte e armazenamento de amostras (JABBAR *et al.*, 2012).

Os ensaios que detectam a oncoproteína E6 auxiliam na avaliação da probabilidade de que a malignidade está presente quando usado em conjunto com outras avaliações clínicas. O teste não é concebido como rastreio ou para fins diagnósticos isolados. Ele pode prever quais pacientes sem lesões na biópsia iriam um ano mais tarde desenvolver a doença (NIC 3+) e quais pacientes com biópsia anormal teriam regredido sem tratamento (ZHAO *et al.*, 2013).

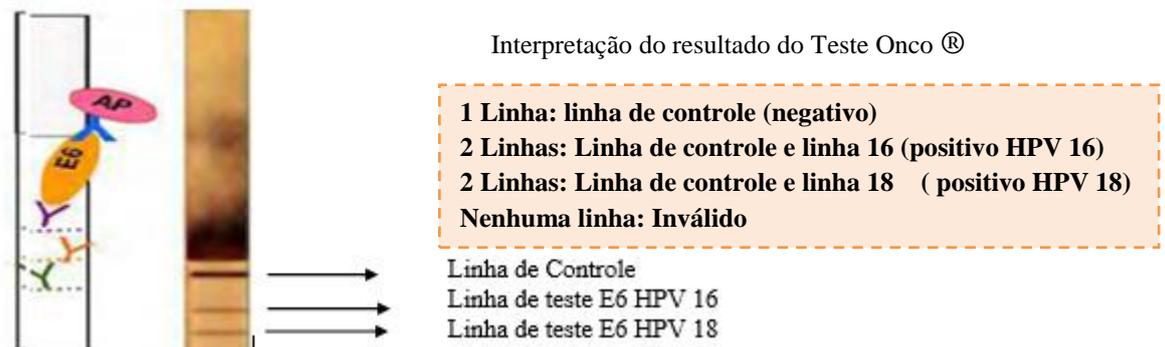


Figura 7: Princípio do Teste Onco E6.

Fonte: www.arborvita.com: acesso em 23 de novembro de 2013

Um resultado preditivo positivo deste tipo de ensaio não só identifica a doença cervical de alto grau, mas também é preditiva no futuro para o alto risco de câncer do colo do útero, enquanto um resultado negativo Onco E6™ é altamente preditiva de regressão futura. A alta especificidade e valor preditivo destes testes é fundamental para a relação custo-eficácia, permitindo a melhor utilização em lugares de escassos recursos para acompanhamento das mulheres e tratamento daquelas que estão em situação de risco para a doença cervical (NIC 2+) (ZHAO *et al.*, 2013).

Num estudo feito com mulheres da área rural da china com idades entre 25 a 65 anos, o percentual positivo de E6 aumentou de forma constante com o aumento da gravidade do diagnóstico: 0,8% para negativa ou nenhuma para histologia, 8,5% para NIC 1, 17,8% para NIC 2, 48,8% para NIC 3, e 84,6% para o câncer cervical. A sensibilidade do OncoE6™ foi de 42,4% para NIC 2 e 53,5% para NIC 3+. No entanto, a especificidade do teste foi de 99% para NIC 2 e NIC 3+ (ZHAO *et al.*, 2013).

1.3.6 Autocoleta associada a rastreamento molecular do HPV

Além do teste de Papanicolau a detecção precoce do hr-HPV é importante para identificar mulheres em risco de desenvolver lesões cervicais. Dentre os métodos de coleta de material cervical surgiu a autocoleta, que tem sido uma alternativa que permite aumentar a cobertura do exame em regiões de difícil acesso, pois não demanda o deslocamento das

pacientes e nem o enfrentamento de condicionamentos sociais e culturais que impedem a obtenção de amostra cervical (LORENZI *et al.*, 2013).

A autocoleta consiste na introdução de um dispositivo estéril no canal vaginal tomados pela própria mulher com o objetivo de obter amostras de células da vagina e colo do útero para avaliar a presença de HPV e de outros patógenos sexualmente transmissíveis. Existem hoje vários formatos e modelos de dispositivos para este uso tais como: escovas, swabs, tampões, lavados entre outros. Entretanto, o uso dos dispositivos têm se limitado ao diagnóstico do vírus HPV como indicador da presença de lesão cervical precursora ou neoplásica (DARLIN *et al.*, 2013; DE ALBA *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2012).

Atualmente a autocoleta tem sido utilizada na triagem de lesões do colo uterino em países como a Holanda. Num estudo realizado com 45 mulheres recrutadas no departamento de obstetrícia e ginecologia do Radoud Universidade Nijmegen Medical Center, na Holanda, entre setembro e outubro de 2008, observou-se que das 45 amostras cérvico-vaginais autocoletadas, 62,2% (28) apresentaram positividade para um ou mais genótipos de HPV. Esta alta prevalência era esperada devido à natureza do acompanhamento. Destas 28 amostras, 25 também eram positivos para o HPV na amostra de esfregaço cervical obtida pelo médico (LENSELINK *et al.*, 2009).

Além disso, as amostras cervicais obtidas por autocoleta, têm provado serem tão confiáveis quanto às amostras colhidas pelo médico. Vários estudos têm demonstrado que a autocoleta da amostra para teste de HPV é altamente aceitável para as mulheres, embora algumas mulheres estejam preocupadas com a realização do teste corretamente (ADLER *et al.*, 2012; BRINK *et al.*, 2006).

Vários estudos têm mostrado que a autocoleta tem sensibilidade para a detecção de lesões de baixo e alto grau e até mesmo câncer invasivo, e que é equivalente ou mesmo superior ao exame de Papanicolaou (ARBYN *et al.*, 2014; BELINSON *et al.*, 2012; PETIGNAT *et al.*, 2007).

Os resultados de uma revisão sistemática feita por Paudyal *et al.* (2015), mostraram que a autocoleta é um método altamente aceitável por 85% das mulheres, sendo considerada fácil pela maioria (88%) das participantes e uma técnica de maior preferência quando comparada ao exame feito pelo profissional.

Um estudo recente de metanálise demonstrou que para pesquisa de infecção por HPV de amostras obtidas por profissional médico é exigido exame ginecológico, e que se forem autocoletadas pode prevenir o câncer de colo em áreas remotas. E que apesar do valor preditivo positivo do teste de HPV ser mais baixo em amostras vaginais autocoletadas comparadas com a citologia, tais testes podem ser preferíveis para detectar NIC 2 ou lesões mais graves em ambientes de baixos recursos, onde a infraestrutura precária prejudica a eficácia dos programas de triagem citológica (ADLER *et al.*, 2012; ARBYN *et al.*, 2014).

Num estudo para verificar o predomínio de genótipos de HPV em amostras cervicais vaginais autocoletadas e coletada pelo médico, observou-se que a maioria das participantes (91%) descreveu a escova como fácil de usar, e muitas destas mulheres referiram o aspecto da autocoleta ser menos demorado e ter um maior benefício (DIIJKSTRA *et al.*, 2012).

A autocoleta no estudo de Silva *et al.* (2011), com 435 adolescentes de oito escolas do ensino médio e duas instituições universitárias da região norte de Portugal com idades de 14 a 30 anos, foi considerado um método menos dispendioso e não invasivo que reduz o desconforto e mal-estar das mulheres quando este é comparado ao exame com o profissional de saúde nos programas de rastreio.

1.4. PREVENÇÃO

O câncer cervical pode ser evitado pela prevenção primária e secundária. A prevenção primária refere-se à vacinação, e a secundária refere-se à detecção precoce de lesões pré-cancerosas que podem ser alcançadas pelo diagnóstico precoce e a triagem (HOSTE, VOSSAERT e POPPE, 2013).

Para a prevenção primária já foram desenvolvidos dois tipos de vacinas contra o HPV: a quadrivalente (HPV4) e a vacina bivalente (HPV2). Ambas são compostas por partículas *virus-like* (VLPs) preparadas pela técnica de DNA recombinante, que cria uma das proteínas que compõe o capsídeo do HPV, a proteína L1 (MARKOWITZ *et al.*, 2007).

As VLPs são capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes em títulos altos, que são suficientes para proteger quem recebe a vacina (HULL *et al.*, 2014).

O laboratório *Merck Sharp & Dhome* foi o precursor nas pesquisas da vacina e lançou em 2007 a Gardasil® – Vacina Quadrivalente Recombinante contra Papilomavírus humano

tipos 6, 11, 16 e 18. A mesma confere proteção contra a infecção persistente pelo HPV, lesões cervicais precursoras de câncer, lesões vaginais e vulvares precursoras de câncer e verrugas genitais causadas pelos HPV entre mulheres de 16 a 26 anos que não tenham sido previamente infectadas pelo respectivo tipo de HPV (KJAER *et al.*, 2009). Essa vacina é indicada para indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 9 e 26 anos. Ela deve ser administrada com esquemas de intervalos de 0, 2 e 6 meses (GIULIANO *et al.*, 2011; HULL *et al.*, 2014).

A vacina HPV2 contém VLPs semelhantes aos HPVs tipos 16 e 18, produzidos por meio da técnica de DNA recombinante em células de inseto. Essa vacina é indicada para indivíduos do gênero feminino, com idade entre 10 e 25 anos. Deve ser administrada com esquemas de intervalos de 0, 1 e 6 meses. A HPV2 é fabricada pelo laboratório *GlaxoSmithKline* com o nome comercial de Cervarix®. A idade ideal para a vacinação é entre os 11 e 12 anos de idade (GROSS, 2014).

A durabilidade do efeito destas vacinas foi avaliada por apenas 5 anos para a vacina quadrivalente e por 6 anos e meio para a vacina bivalente (FONSECA, FERREIRA e NETO, 2013). Na Austrália e na Escócia, uma imensa eficácia tem sido observada tanto em relação à prevenção de verrugas genitoanal benignas e lesões precursoras de câncer causadas pelos tipos de HPV da vacina. Em abril de 2007, a Austrália começou a vacinação de mulheres com idade entre 12-27 anos. No ano seguinte a proporção de mulheres com menos de 28 anos, com verrugas diagnosticadas diminuiu em 25,1% (IC 95%: 30,5-19,3%) por trimestre (CROWE *et al.*, 2014). Além disso, 5 anos mais tarde, a ausência de verrugas genitais em mulheres vacinadas sugeriu uma diminuição da taxa de reprodução do vírus. Um pré-requisito absoluto de uma prevenção tão bem sucedida contra neoplasias associadas ao HPV é a administração da vacina antes do primeiro contato sexual (DOCHEZ *et al.*, 2014; GROSS, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde (2014), no Brasil o programa nacional público de vacinação contra o HPV foi inserido a partir de março de 2014. Assim, a vacina contra HPV entrou oficialmente para o calendário nacional de imunizações e passou a ser oferecida às meninas de 11 – 13 anos.

No entanto, devido à alta incidência do câncer de colo de útero no estado do Amazonas, desde 2013, a vacinação contra o HPV vem sendo realizada nas escolas públicas e privadas do estado.

Atualmente, diversos grupos em todo o mundo têm testado estratégias para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o HPV, uma vez que as vacinas profiláticas não têm efeito na eliminação de lesões e tumores do colo uterino associados ao HPV (FREGNANI *et al.*, 2013).

A vacinação, contudo, não exclui as ações de prevenção e de detecção precoce pelo rastreamento, que busca lesões precursoras e câncer em mulheres sem sintomas. Com exceção do câncer de pele, esse tumor é o que apresenta maior potencial de prevenção e cura, quando diagnosticado precocemente (HOSTE, VOSSAERT e POPPE, 2013).

Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também aprovou a vacina de HPV a meninos e homens, da mesma forma como preconizado pelos órgãos internacionais. Entretanto, apesar desta aprovação, poucos governos têm adotado a vacinação via iniciativa pública a população masculina. Alguns estudos sugerem que a vacinação da população masculina somente seria um investimento rentável caso a cobertura de vacinação entre mulheres fosse baixa. Vale ressaltar que a população masculina observada nestes estudos é somente a heterossexual (CANEPA *et al.*, 2013).

A utilização destas vacinas prevê uma redução significativa na mortalidade e na morbidade associadas às infecções por HPV, que afetam centenas de milhões de indivíduos a cada ano em todo o mundo. Apesar da alta eficácia comprovada destas vacinas e de sua promissora utilização, vale a pena ressaltar suas limitações. Estas vacinas não protegem contra todos os tipos de HPV e não tratam lesões preexistentes HPV positivas (RICKERT *et al.*, 2014).

Para aumentar a proteção, foi desenvolvida e já tem sido usada em alguns países uma vacina profilática nonavalente contra o HPV (6/11/16/18/31/33/45/52/58) (SERRANO *et al.*, 2014). A investigação também é dirigida a vacinas terapêuticas e o desenvolvimento de uma vacina profilática L2 (DOCHEZ *et al.*, 2014).

Quanto a prevenção as medidas de prevenção secundária pelo rastreio utilizando os testes de diagnóstico, deve-se levar em consideração os desafios de cobertura dos programas utilizados. No Brasil, as Diretrizes do Ministério da saúde indicam que a realização periódica do exame citopatológico continua sendo a estratégia mais adotada para o rastreamento do cancer do colo do útero (BRASIL, 2011).

Atingir altos índices de cobertura do rastreamento ainda é um dos grandes desafios. De acordo com o Ministério da Saúde a meta de cobertura do rastreamento é de 80%. No Amazonas, segundo o grupo condutor de doenças crônicas do Estado do Amazonas/SUSAM, a taxa de cobertura da prevenção do câncer do colo do útero no ano de 2014 foi de 50%, levando em consideração que a população feminina da faixa etária de rastreamento (de 25-64 anos) é representada por 1/3 da população alvo, tendo em vista que as mulheres realizariam os exames preventivos a cada 3 anos (BRASIL, 2014c).

Nas diretrizes brasileiras para o rastreamento do colo do útero foram enfatizadas as grandes dificuldades na cobertura dessas mulheres na faixa etária de rastreamento. As dificuldades de acesso à saúde no Brasil, e inclusive no Estado do Amazonas, como barreiras geográficas, socioculturais, de cadastros atuais e universais da base populacional, impedem que sejam realizados o recrutamento e a cobertura dessas mulheres para a realização dos exames e até mesmo o seguimento delas quando se apresenta com alguma lesão. Além disso, tais dificuldades impedem o programa de atingir outras mulheres e não aquelas que realizaram os exames todos os anos, e assim, atingir de fato toda a população feminina. No entanto, o Estado do Amazonas está nessa luta para erradicar ou minimizar estes problemas, para que assim diminua os casos de câncer do colo do útero em nosso Estado.

2. JUSTIFICATIVA

A implementação de programas de rastreamento de lesões precursoras reduziu a mortalidade por câncer cervical (CC) em países desenvolvidos nas últimas décadas. No entanto, a infraestrutura inadequada e dificuldades de financiamento para essa estratégia de controle do CC é limitada em países em desenvolvimento (FONSECA, FERREIRA e NETO, 2013).

No Brasil, o CC representa um importante problema de saúde pública. Estimou-se que 16.340 novos casos de CC para o ano de 2016, que corresponde a uma taxa bruta de incidência de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Na Amazônia brasileira, o problema é ainda mais grave. Devido a uma baixa cobertura de rastreamento do CC na população alvo, uma alta

incidência da doença foi estimada em (até 23,97 casos/100.000 mulheres) , incidência semelhante à de países de baixa renda, como Uganda e Mali (BRASIL, 2016).

No estado do Amazonas a taxa oficial de cobertura do rastreamento para o câncer de colo de útero atualmente é de cerca de 50%, levando em consideração que a população feminina da faixa etária de rastreamento (de 25-64 anos) é representada por 1/3 da população alvo, tendo em vista que as mulheres realizariam os exames preventivos a cada 3 anos (BRASIL, 2014c). Considerando que na prática da atenção básica as mulheres com citologia normal são orientadas a repetir o exame preventivo citológico uma vez ao ano, provocando o alcance das mesmas mulheres repetidamente, a cobertura real de rastreamento no estado do Amazonas pode chegar a 21% (quando se aplica no denominador do cálculo deste indicador a população total - na faixa etária de rastreamento). Assim, atingir a meta preconizada pelo Ministério da Saúde de 80% torna-se um desafio ainda maior para o estado do Amazonas.

Atualmente, existe um consenso na literatura especializada de que o exame citopatológico não é a ferramenta mais completa para o rastreamento do câncer do colo do útero, podendo ser substituída com enorme ganho de eficiência e menores custos, por testes moleculares detectando DNA de Papilomavírus de alto risco (HPV de Alto Risco Oncogênico). A maior vantagem atribuída aos testes moleculares é a maior sensibilidade em relação à citologia, detectando um número bem superior de lesões de alto grau e de carcinomas invasores, destacando-se os adenocarcinomas, notoriamente refratários à detecção citológica (NASCIMENTO, 2010; SCHIFFMAN *et al.*, 2011).

A triagem é fundamental para a detecção precoce de lesões pré-cancerosas. O Acesso a informações sobre saúde e serviços médicos preventivos pode ser um desafio para mulheres dessas comunidades rurais e remotas onde o transporte é um fator limitante e os serviços educacionais e a saúde no local podem ser inadequados (ROCHA *et al.*, 2013).

Ante ao exposto, admite-se que o rastreamento das lesões precursoras ou neoplásicas cervicais permanece com importantes limitações entre os países em desenvolvimento. Destaca-se a dificuldade no acesso à saúde pública, a baixa abrangência do rastreamento oportunístico além da necessidade de exposição da região genitália. Entre as alternativas para o enfrentamento dessas limitações, o uso do dispositivo de autocoleta cervical seguido de testes de triagem alternativos vem apresentando resultados promissores (BHATLA *et al.*, 2009).

O Estado do Amazonas apresenta uma imensa população ribeirinha, vivendo em condições bastante remotas e de difícil acesso. Historicamente, especialmente na região amazônica, os programas de rastreio não foram capazes de superar o isolamento geográfico e as barreiras culturais significativas existentes.

Assim, o rastreio por autocoleta seguido de testes rápidos e moleculares constituem alternativas muito atraentes e de enorme valor regional, que precisa ser avaliado e talvez implementado, permitindo a redução da incidência desta neoplasia, que é passível de detecção precoce e tratamento, portanto erradicável. Este estudo, portanto, se propõe a analisar a estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas da área rural do município de Coari/AM.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar a estratégia de rastreamento do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o perfil sócio-econômico e comportamental das mulheres infectadas com HPV;
2. Verificar a aceitação do uso do dispositivo da autocoleta no rastreamento da infecção pelo HPV na população de mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM;
3. Descrever a frequência da proteína E6 na população de mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM;
4. Descrever a frequência da infecção por HPV na população de mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM;
5. Descrever os genótipos do HPV encontrados na população de mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM;
6. Associar a presença do HPV com os achados citológicos, colposcópicos e histológicos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELO DE ESTUDO

Trata-se de estudo transversal com coleta de dados prospectiva com mulheres de comunidades ribeirinhas do município de Coari que visou analisar a estratégia de rastreamento do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM.

4.2 PROBLEMÁTICA

A estratégia de rastreamento do câncer de colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV é aplicável em comunidades de difícil acesso (ribeirinhas) do Município de Coari/AM?

4.3 HIPÓTESES

H1. A estratégia de rastreamento utilizando a autocoleta seguida de teste rápido para HPV é aplicável na triagem de câncer de colo de útero em mulheres de comunidades de difícil acesso (ribeirinhas).

H0. A estratégia de rastreamento utilizando a autocoleta seguida de teste rápido para HPV não é aplicável na triagem de câncer de colo de útero em mulheres de comunidades de difícil acesso (ribeirinhas)

4.4 ÁREA DO ESTUDO

O estudo foi realizado no período de agosto de 2014 a fevereiro de 2015 no Município de Coari, localizado a 363 km do município de Manaus, confluindo com o rio Solimões no Estado do Amazonas. Atualmente sua economia é a segunda maior economia do estado do Amazonas, devido à exploração de Gás natural e Petróleo. O município foi selecionado para o estudo, pois se percebe que junto com o desenvolvimento do município houve aumento do fluxo de pessoas e a promiscuidade tornou-se um fator relevante para o aparecimento das

DST's, em especial o HPV (BRASIL, 2010). É importante ressaltar a existência do Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari da Universidade Federal do Amazonas, o qual possui na sua estrutura um laboratório de Biologia Molecular para a realização do processamento e análise das amostras coletadas.

4.5 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Mulheres ribeirinhas da área rural do Município de Coari - Amazonas com idade acima de 18 anos que preencham os critérios de inclusão. Atualmente existem 405 comunidades ribeirinhas, distribuídas em 7 calhas de rio, das quais foram selecionadas 32 comunidades ribeirinhas por conveniência, considerando a aleatoriedade e a viabilidade de acesso até que fosse possível alcançar o tamanho amostral calculado. As comunidades foram segregadas em três categorias: com localização à ≤ 20 km de Coari, >20 até ≤ 40 km e > 40 até ≥ 60 Km de distância de Coari de acordo com o quadro 1.

Quadro 1- Comunidades visitadas durante o estudo e sua localização

DISTÂNCIA	COMUNIDADES	LATITUDE	LONGITUDE
≤ 20 Km	1-Saubinha	4° 6'3.50"S	63° 2'4.73"W
	2- N.S. de Fátima	4° 4'13.85"S	63° 4'41.90"W
	3- Isidório	4° 6'11.38"S	63° 9'35.57"W
	4- Santa Maria da C. do Juçara	4° 2'39.16"S	63° 1'42.34"W
	5- Itapéua	4° 3'29.10"S	63° 1'38.36"W
	6- Nossa Sra. do Livramento	4° 2'59.84"S	63° 2'8.00"W
	7-Menino Deus C. Juçara	4° 3'13.03"S	63° 2'33.75"W
	8- Ananindé	3°57'3.56"S	63° 8'4.11"W
	9- Santa Rosa	4° 1'56.60"S	63° 9'26.50"W
	10- Nossa Sra. Aparecida	3°59'51.66"S	63° 8'36.96"W
	11- Esperança I	3°58'20.80"S	63° 9'5.29"W
	12- São Fco. da C. Juçara	3°58'26.66"S	63° 8'12.06"W
	13- Vila Lira	3°56'47.10"S	63°11'7.87"W
<20 ≤ 40 Km	1- Laranjal	3°54'39.85"S	63°23'47.39"W
	2- Santa Terezinha	3°50'6.92"S	63°20'30.64"W
	3- Santo Expedito	3°49'9.19"S	63°20'46.37"W
	4- Vila Fernandes	3°48'10.28"S	63°21'42.78"W
	5- Santa Maria do Poção	3°48'19.49"S	63°22'8.44"W
	6- São José do Esti. S. Antônio	3°47'53.89"S	63°23'9.18"W
	7- Andirá	4° 9'46.95"S	63°23'54.08"W
	8- São José do Boa Vista	4°11'20.79"S	63°24'16.55"W
	9- São Tomé do Patoá	4°12'27.63"S	63°24'31.86"W
	10- São Francisco do Aranaí	3°55'45.95"S	63°17'56.15"W
	11- São Rdo. da C. do Trocaris	3°54'8.68"S	62°52'29.61"W
	12- Vila do Trocaris	3°53'5.23"S	62°50'23.97"W
	13- Curiarrã	4°12'27.22"S	63°19'34.93"W
>40 ≥ 60 Km	1- Nossa Sra. P. S Boa Fé	3°46'25.00"S	63°23'32.75"W
	2- Canaã	3°45'50.57"S	63°23'56.08"W
	3- Amazonino Mendes	3°51'12.47"S	62°43'37.89"W
	4-Nova República	3°50'22.94"S	62°40'26.51"W
	5- Lauro Sodré	3°51'24.90"S	62°35'30.92"W
	6- São Pedro do Toari	3°38'12.08"S	63°12'5.40"W

4.6 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

4.6.1 Critérios de inclusão:

- Mulheres da área rural de Coari, com idade igual ou superior a 18 anos;

4.6.2 Critérios de exclusão:

- Mulheres que apresentem contraindicação médica de coleta de material cervical;
- Mulheres grávidas;
- Mulheres com fluxo menstrual intenso;
- Mulheres que estiverem fazendo uso de medicamento endovaginal nos últimos 7 dias;
- Mulheres que se autodeclararem virgens;

4.7 CÁLCULO AMOSTRAL

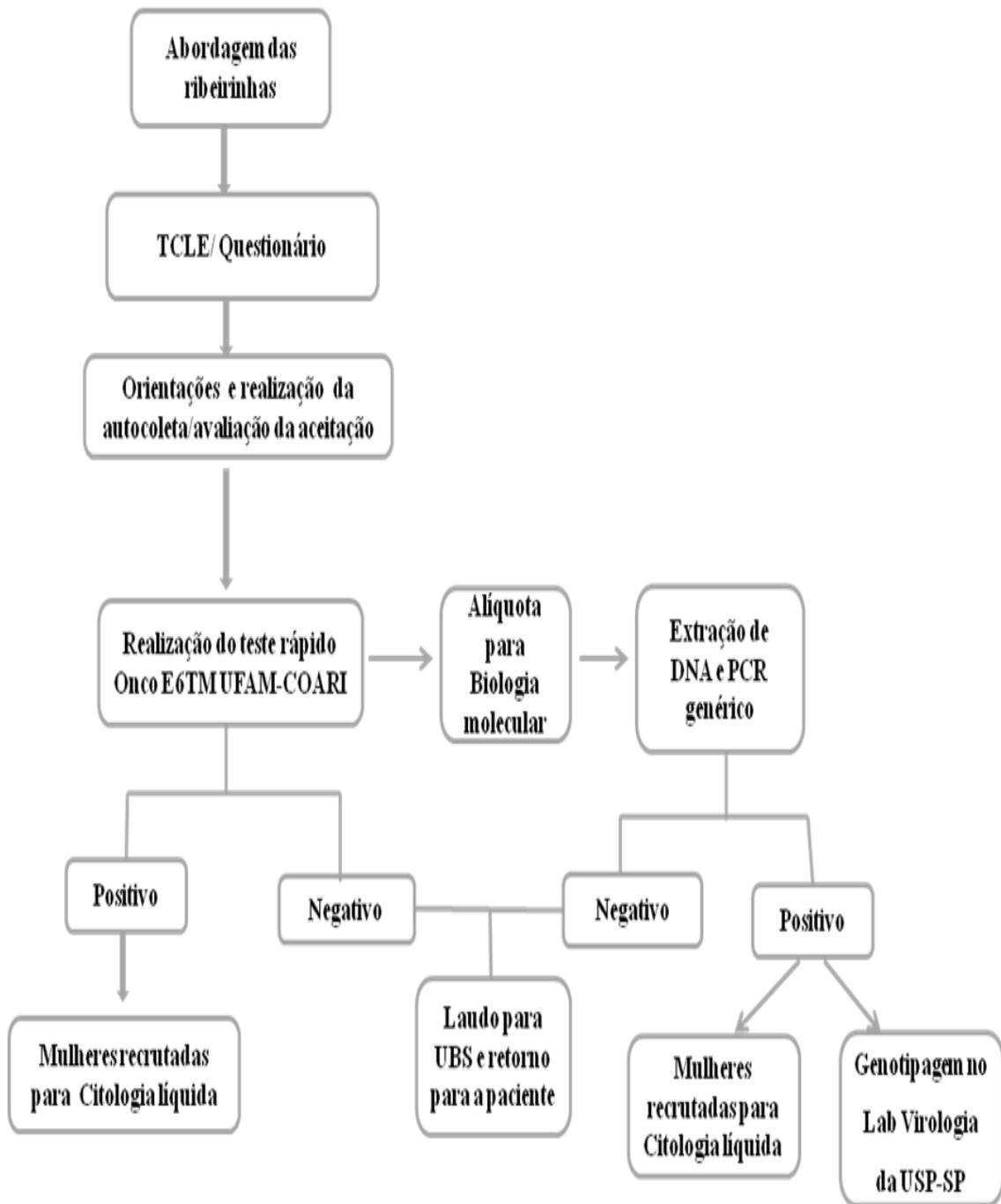
De acordo com o Censo do IBGE no ano de 2010, existem 11.975 mulheres moradoras na zona rural de Coari. Porém, dessas somente 6.011 são maiores de 18 anos (BRASIL, 2010). No Brasil uma metanálise de estudos nacionais registrou um perfil de prevalência da infecção por HPV de alto risco semelhante ao dos países subdesenvolvidos: entre 11-15% na população citologicamente normal (AYRES e SILVA, 2010). Portanto, para este estudo foi considerada a prevalência esperada de 11%.

O tamanho da amostra para esta população foi calculado com um grau de 95% de confiança e uma taxa de erro absoluto de 3% para uma população finita de 6.011 habitantes do sexo feminino, totalizando 391 mulheres a serem estudadas, mas ao decorrer do estudo

acabaram sendo incluídas mais 31 mulheres totalizando 412. Para tal cálculo amostral utilizou-se o software Epi Info versão 7 (www.cdc.gov/epiinfo).

4.8. COLETA DE DADOS, DE AMOSTRA E PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES.

Participaram do estudo 412 mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM. O estudo foi desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa correspondeu a abordagem das mulheres, coleta das amostras, processamento das análises e recrutamento das mulheres que apresentaram alterações nos testes utilizados. A segunda etapa correspondeu a nova abordagem às mulheres que atenderam ao recrutamento para o seguimento clínico e realização dos demais procedimentos previstos no estudo. Os fluxogramas metodológicos das duas etapas estão demonstrados a seguir na figura 8 e 9.



Mulheres recrutadas para atendimento médico em Coari seguirão para a segunda etapa do estudo

Figura 8: Fluxograma metodológico primeira etapa

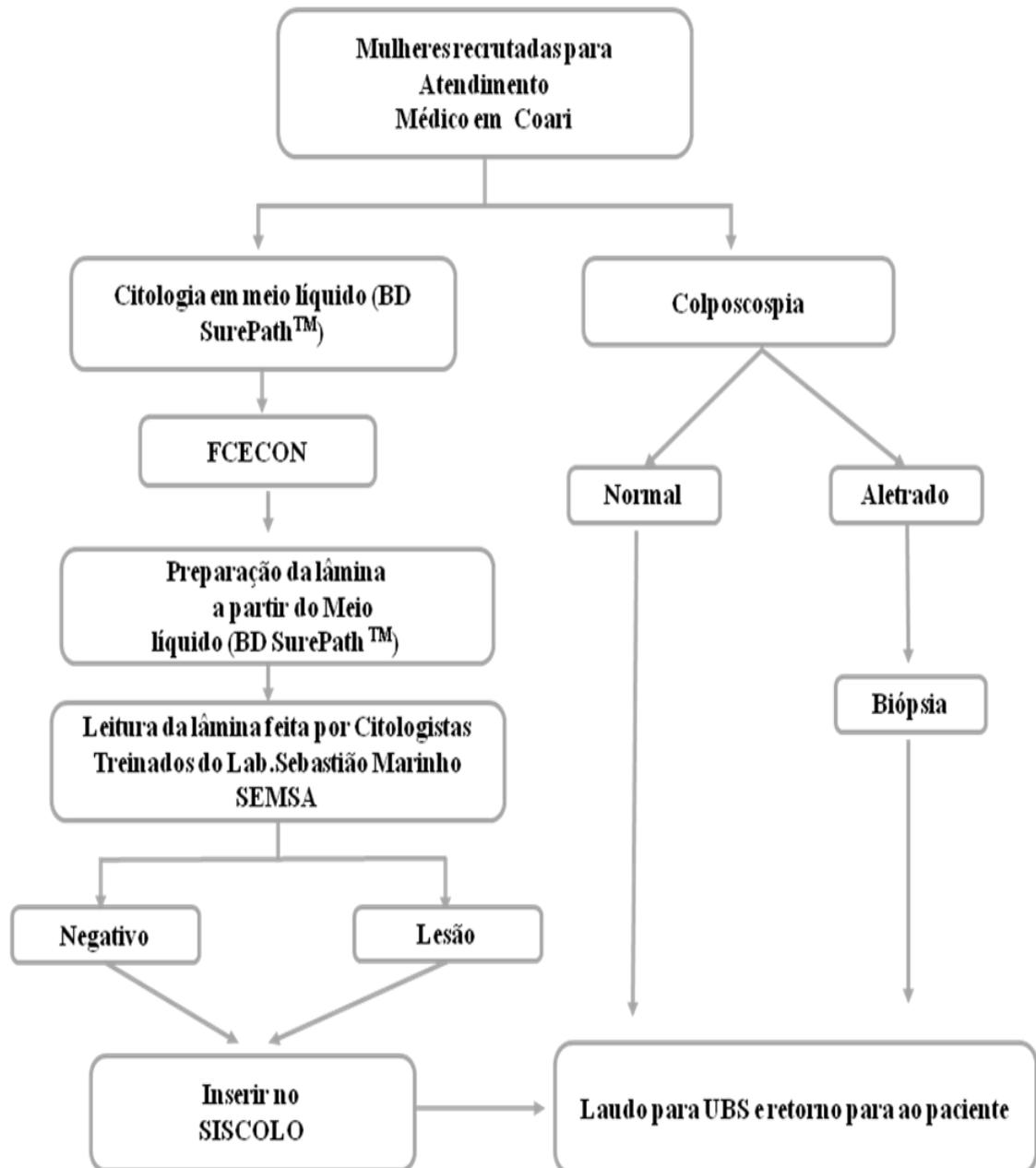


Figura 9: Fluxograma metodológico segunda etapa

4.8.1 Coleta de dados e amostras por autocoleta

Antes da abordagem das mulheres, foram feitas reuniões com os agentes comunitários de saúde das comunidades selecionadas na Secretaria Municipal de Saúde de Coari. Neste momento obtiveram-se acesso as avaliações das produções mensais do Programa Saúde da Família da zona rural e aproveitou-se para explicar assuntos referentes ao desenvolvimento do projeto.

Após conhecer um pouco da realidade sobre as comunidades por meio dos agentes de saúde, foi elaborado um cronograma de viagens para o início das coletas na zona rural. Antes de cada viagem para as comunidades era realizado comunicado pela rádio de Coari, avisando a chegada da equipe naquele local.

Os deslocamentos até as comunidades ribeirinhas foram feitos por uma lancha pequena e por meio de um barco cedido pela Secretaria Municipal de Saúde do município e pela Universidade Federal do Amazonas.

Ao chegar às comunidades, o agente de saúde convocava as mulheres para uma reunião no centro comunitário ou na escola local, onde a equipe do estudo aproveitava para dar palestras sobre o Câncer do colo do útero e o HPV, bem como as convidava a participar do estudo, oferecendo explicações sobre os objetivos, benefícios e riscos da pesquisa. Em comunidades onde não havia agente comunitário de saúde, escola e nem centro comunitário para reunirmos com as mulheres, a equipe se dirigia à casa de cada mulher para explicar o estudo e convidá-las a participar da pesquisa. As mulheres que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Para atender o primeiro objetivo específico de caracterização do perfil sócio-econômico e comportamental, as mulheres foram entrevistadas respondendo a um questionário padrão (Apêndice B) contendo perguntas estruturadas e não estruturadas sobre informações clínicas, epidemiológicos, sócio-econômicas e comportamentais de risco para a infecção pelo HPV. A confidencialidade das respostas foi garantida.

Para atender o segundo objetivo específico foram repassado às mulheres, orientações acerca da técnica de autocoleta, utilizando para isso material didático adequado (Apêndice C). A mulher foi orientada a dirigir-se a um local privativo, na maioria das vezes em sua casa

para realizar a autocoleta e entregar aos membros da equipe de pesquisadores o material coletado em dispositivo de transporte adequado fornecido pelo fabricante. Após a realização da autocoleta a mulher retornava ao pessoal da equipe para avaliação da aceitação da técnica, dando continuidade nas perguntas dirigidas a estas mulheres por meio do formulário padrão (Apendice B).

O dispositivo de autocoleta utilizado foi uma escova em forma cônica (Evalyn Rovers[®]) (figura 10).



Figura 10: Escova Evalyn Rovers[®].
Fonte: Rovers Medical Devices BV

A mulher foi orientada a retirar a tampa da cabeça da escova, inserir o corpo da escova na vagina até 10 cm, empurrar o êmbolo para expor as cerdas da escova, girar no sentido horário cinco vezes antes da remoção, puxar de volta o embolo para recolher as cerdas da escova contendo o material coletado, fixar de volta a tampa da escova e depois guardar a mesma em embalagem própria e entregar em seguida à equipe do estudo para identificação e armazenamento adequado.

Em seguida, as escovas eram conservadas em temperatura ambiente e levadas ao laboratório de Genética do Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari (UFAM).

4.8.2 Realização do teste de detecção da proteína E6

Para alcançar o terceiro objetivo específico de detecção da proteína E6 as amostras obtidas por autocoleta com material cervical foram processadas da seguinte maneira: As cerdas contendo as amostras foram cortadas com a lâmina de bisturi estéril e, transferidas para o tubo de lise disponível no kit Onco E6™ (Arbor Vita Corporation -AVC). Desta etapa em diante todas as recomendações do fabricante foram seguidas rigorosamente. Em seguida foram adicionados para o mesmo tubo 933 mL de solução de lise (A) e 87 mL de solução de condicionamento (B) fornecida pelo kit. Após agitação suave, o tubo de lise foi colocado no rotator orbital por 15 min. Em seguida, a solução da amostra foi centrifugada (Centrífuga refrigerada, modelo 280R – FANEM) durante 10 minutos a > 10000 xg. Em seguida, uma alíquota de 200 mL da solução da amostra foi então transferida para um frasco liofilizado com detector de anticorpos monoclonais (mAb) e, a unidade de teste foi em seguida inserida nos frascos. As soluções das amostras corriam nas fitas de teste por ação capilar. Após 55 minutos, a unidade de teste foi transferida para frascos com solução de lavagem, e depois de uma lavagem de 12 minutos a unidade de teste foi imersa em outro conjunto de frascos contendo solução de desenvolvimento. Após 15-25 minutos a unidade de teste foi removida dos frascos de solução de revelação e colocada sobre uma guia de leitura, o que permitiu a inspeção visual. O aparecimento de uma ou mais linhas de teste indicava oncoproteína E6 do HPV do tipo correspondente, presente na amostra inicial do esfregaço cervical (QIAO *et al.*, 2013) (figura 11)

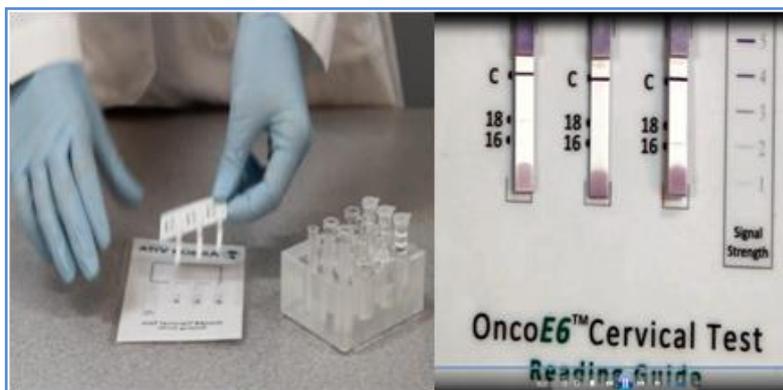


Figura 11: Uso da guia de leitura para interpretação dos resultados
Fonte: Arbor Vita Corporation -AVC

Quando as amostras eram provenientes de comunidades situadas a 20 km de distância do município de Coari, no mesmo dia a amostra obtida era processada no laboratório de biologia molecular do Instituto de Saúde e Biotecnologia de Coari/UFAM. O tempo entre a coleta e o processamento da amostra era em torno de 6 horas. Neste caso a amostra ficava acondicionada em uma caixa em temperatura ambiente.

E quando as amostras eram coletadas em comunidades mais distantes como as situadas à cerca de 40 ou a 60 Km do município de Coari, tínhamos que dormir nas comunidades por três dias. Após a coleta as amostras eram acondicionadas em caixas térmicas com gelo reciclável (gelox) à 4° C para melhor conservação. Ao término da coleta retornávamos ao município para processamento das amostras. O tempo entre a coleta e o processamento chegava há no máximo 72 horas.

4.8.3 Extração do ácido nucléico

O DNA foi extraído a partir da amostra que foi retirada da solução lise do Teste Onco E6™. O processo de extração foi realizado utilizando-se o kit da Qiagen (Qiagen, Gaithersburg, Germany). O protocolo utilizado seguiu rigorosamente as determinações do fabricante.

O tubo contendo as cerdas com o sobrenadante e o *pellet* foi centrifugado durante 5 minutos a 10.000g. Em seguida, por inversão o sobrenadante e as cerdas foram desprezados, restando somente o *pellet* no fundo do tubo. Logo após foram adicionados 200 µL de H₂O livre de DNAase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), e o tubo foi levado ao vórtex para provocar dissolução máxima do *pellet*.

Posteriormente, em um novo tubo foram adicionados 200uL de tampão, 200uL da amostra e 20uL de proteinase K (Qiagen, Gaithersburg, Germany)

A mistura foi incubada a 56° C até que ocorresse a lise total da amostra. Ao término da incubação, foram adicionados 200 µL de etanol e a mistura foi transferida para uma coluna acoplada a um tubo coletor e centrifugada a 6000 x g (8.000rpm) por 2 minutos. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foram adicionados 500 µL

do tampão de lavagem (AW1) disponível no kit, centrifugando-se a 6000 x g (8.000 rpm) por 2 minutos. Novamente, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e adicionou-se 500 µL do segundo tampão de lavagem (AW2), centrifugando-se a 21000 x g (14.000 rpm) por 3 minutos, a fim de remover qualquer resíduo de etanol.

Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo cônico e adicionou-se 140 µL do tampão de eluição (AE). Incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se a 21000 x g (14.000 rpm) por 3 minutos. Ao final, separaram-se duas alíquotas de 70 µL da amostra em microtubos de 0,5 mL (PCR® tubes-Axygen) identificados com o código da amostra. A alíquota de DNA extraído foi armazenada a -20°C.

4.8.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do HPV

Para realização do quarto objetivo específico que é descrever a frequência da infecção pelo HPV na população estudada, foi realizado teste molecular por PCR convencional de todos os DNAs extraídos a partir das amostras obtidas por autocoleta. O teste para identificação do HPV foi realizado no laboratório de genética do ISB/UFAM-Coari.

A PCR foi feita com os iniciadores PGMY09/11 genéricos (Life Technologies, São Paulo, Brasil) (quadro 2), que amplificam um fragmento de 450 pb abrangendo a região L1 da maioria dos tipos de HPV de mucosa (GRAVITT *et al.*, 2000).

Quadro 2- Sequência do primer PGMY09/11

Primer	Sequência (5' – 3')							
PGMY 11 - A	CGA	CAG	GGA	CAT	AAC	AAT	GG
PGMY 11 - B	GCG	CAG	GGC	CAC	AAT	AAT	GG
PGMY 11 - C	GCA	CAG	GGA	CAT	AAT	AAT	GG
PGMY 11 - D	GCC	CAG	GGC	CAC	AAC	AAT	GG
PGMY 11 - E	GCT	CAG	GGT	TTA	AAC	AAT	GG
PGMY09 - F	CGT	CCC	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - G	CGA	CCT	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - H	CGT	CCA	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - I	G	CCA	AGG	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - J	CGT	CCC	AAA	GGA	TAC	TGA	TC
PGMY09 - K	CGT	CCA	AGG	GGA	TAC	TGA	TC
PGMY09 - L	CGA	CCT	AAA	GGG	AAT	TGA	TC
PGMY09 - M	CGA	CCT	AGT	GGA	AAT	TGA	TC
PGMY09 - N	CGA	CCA	AGG	GGA	TAT	TGA	TC
PGMY09 - P	G	CCC	AAC	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - Q	CGA	CCC	AAG	GGA	AAC	TGG	TC
PGMY09 - R	CGT	CCT	AAA	GGA	AAA	TGG	TC
HMB01	GCG	ACC	CAAA	TGC	AAA	TTG	GT

Fonte: adaptado de (GRAVITT *et al.*, 2000)

Além disso, foi realizada a amplificação do gene da β -globina humana, por PCR e obtenção de fragmento de de 268 pb que foi utilizado como controle interno da reação (BERNARD *et al.*, 1994).

A reação de PCR para detecção do HPV ocorreu nas seguintes condições (quadro 3) : 2,5 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), 50 mM de Cloreto de

Magnésio (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) 2,5 μ M de cada primer para HPV PGMY09/11, 10 μ M de cada primer para β -globina humana (PCO4/GH20), 5 μ L do DNA molde (amostra), 5U/ μ L de *Taq* Polimerase Platinum (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), 2,5 μ L de glicerol 57%, 2,5 μ g/ μ L de Cresol Red e 7,25 μ L de H₂O livre de DNAase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil).

Quadro 3- Condições necessárias da PCR para detecção do HPV

REAGENTES	1x
PCR buffer 10x (sem MgCl ₂)	2,5
dNTPs (2,5mM)	2
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
Primer PGMY 09/11 (10 μ M)	0,5
Primer PCO4 (10 μ M)	0,5
Primer GH20 (10 μ M)	0,5
<i>Taq</i> Platinum (5U/ μ L)	0,25
Glicerol 57%	2,5
Cresol Red (2,5 ug/ul)	2,5
H ₂ O	7,25
DNA	5
VOLUME FINAL	25

As sequências de β -globina humana foram GH20: 50-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-30 e PCO4: 50 CA-ACTTCATCCACGTTACC-30 (JENAB *et al.*, 2010) .

A reação da PCR foi processada no equipamento termociclador *My Cycler*, que foi programado para executar o termo ciclo descrito no quadro 4.

Quadro 4- Etapas do processo da PCR.

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO
Incubação Inicial	94° C	5 min
Desnaturação	94° C	60 segundos
Anelamento	55° C	60 segundos
Extensão	72° C	60 segundos
Extensão final	72° C	10 min
Manutenção/Hold	4° C	Tempo indefinido

4.8.5 Eletroforese

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese, migrando sobre um gel de agarose (LW Biotec) a 1,5 % em tampão TEB (Tris borato e EDTA – DNA Express Biotecnologia) 1X, nas seguintes condições: 70 Volts até a entrada da amostra no gel, aumentando a voltagem para 100 volts até a amostra chegar ao final da corrida, com duração de aproximadamente 45 minutos. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil*). O gel foi corado com Brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas correspondentes a 450pb (para HPV) e 268 (para β -globina humana) foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas no equipamento *Transiluminator Loccus Biotecnologia*.

4.8.6 Genotipagem do HPV

Para a realização do quinto objetivo específico as amostras positivas para HPV na PCR foram enviadas ao Laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo para a realização da genotipagem. Primeiramente as amostras foram submetidas a PCR em tempo Real

desenhado para detectar os HPV's 16 e 18, e as amostras negativas neste ensaio foram submetidas ao teste PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany) conforme descrito abaixo:

4.8.6.1 PCR em tempo real específico para HPV-16

A reação de PCR em tempo real específica para HPV-16 foi realizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Inc., EUA), 400nM de cada iniciador *forward* 5'-GATGAAATAGATGGTCCAGC-3' e *reverso* 5'-GCTTTGTACGCACAACCGAAGC-3' (VEO *et al.*, 2015), 200nM da sonda 5' 6FAM-CAAGCAGAACCGGACAG-MGBNFQ-3' e água livre de DNase e RNase (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde foi utilizado 5µL de DNA extraído de cada amostra. Em todas as reações de PCR em tempo real específica para HPV-16 foram adicionados controles positivo (DNA extraído de células SiHa) e negativo (água). Todas as amostras e controles foram testados em duplicata.

4.8.6.2 PCR em tempo real específico para HPV-18

A reação de PCR em tempo real específica para HPV-18 foi realizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Inc., EUA), 400nM de cada iniciador *forward* 5'-AAGAAAACGATGAAATAGATGGA-3' e *reverso* 5'-GGCTTCCACCTTACAACACA-3' (VEO *et al.*, 2015), 400nM da sonda 5' –VIC-AATCATCAACATTTACCAGCC-MGBNFQ-3' e água livre de DNase e RNase (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde foram utilizados 5µL de DNA extraído de cada amostra.

Em todas as reações de PCR em tempo real específica para HPV-18 foram adicionados controles positivo (DNA extraído de células HeLa) e negativo (água). Todas as amostras e controles foram testados em duplicata.

4.8.6.3 PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany)

Para determinar o genótipo do HPV presente na amostra foi o utilizado o kit comercial PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany), que é um teste baseado na tecnologia de “*microarray*” para a detecção e genotipagem de um fragmento do gene E1 do genoma do Papillomavirus Humano (HPV) (SERRAVALLE *et al.*, 2015). O teste PapilloCheck® permite a detecção e identificação simultânea de 24 genótipos do HPV (HPV – 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 3 82) (BERTHET *et al.*, 2014; DALSTEIN *et al.*, 2009)

O ensaio é dividido em quatro etapas : PCR, hibridização, lavagem e escaneamento. A mistura de PCR foi composta por 5 µL do DNA extraído, 19,8 µL de solução contida no PapiloCheck® Master Mix, 1U de Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Quiagen, Germany) e 0,005U de UNG (Uracil N-DNA Glycosylase) (Fermentas, Germany) para volume final de 26 µL. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, USA), segundo o protocolo: 37°C por 20 minutos para a ação da UNG, 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de (95°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos).

Após a realização da PCR procedeu-se a etapa de hibridização na qual, 5 µL do produto da PCR foram adicionados a 30 µL do tampão de hibridização. Após agitação, 25 µL dessa mistura foram aplicados no compartimento do “*chip*” e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente e em atmosfera úmida. Após incubação, procedeu-se a três etapas de lavagem. O “*chip*” foi lavado sob agitação vigorosa para cima e para baixo em solução de lavagem por 10 segundos a temperatura ambiente, 1 minuto a 50°C e 10 segundos temperatura ambiente. Durante a hibridização, o DNA ligado é marcado por fluorescência e o DNA não ligado é removido nas etapas de lavagem subsequentes.

Para secar o *chip*, o mesmo foi acondicionado em tubo cônico de 50mL e centrifugado a 500 x g por 3 minutos. Após a centrifugação, o *chip* foi introduzido no equipamento CheckScanner™ para realização da etapa de fluorescência. O resultado é avaliado e emitido automaticamente pelo CheckReport™.

O relatório indica claramente a presença ou ausência de um ou mais dos 24 tipos de HPV detectáveis e os controles abrangentes no *chip* tornam a análise altamente confiável. Os

protocolos foram padronizados e utilizados no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

4.8.7 Coleta de Amostras por citologia em meio líquido e colposcopia

Para atender ao sexto objetivo específico de associação da presença da proteína E6 com os achados citológicos, os laudos com resultados positivos para HPV 16 ou HPV 18 (com presença da proteína E6) eram repassados ao gestor da Secretaria Municipal de Saúde e à Coordenadora do programa saúde da mulher e posteriormente às mulheres do estudo para providenciar o recrutamento das mesmas. Foram confeccionados e disponibilizados às mulheres os laudos referentes aos testes de detecção do HPV, assim como referente ao teste Onco E6TM (Anexo III)

Em seguida essas mulheres ribeirinhas foram recrutadas e encaminhadas à consulta médica ginecológica na cidade de Coari para avaliação, acompanhamento dos casos, e realização da colposcopia quando necessário. Nesse momento foi realizada uma coleta por citologia líquida (figura 12) pelo profissional da equipe (enfermeiro treinado), permitindo análise citológica e classificação morfológica convencional das células cervicais.

A coleta de células da junção ectocervical-endocervical foi dispensada no recipiente contendo fixador líquido. Toda a cabeça da escova (Rovers® Cervix Brush Combi) foi dispensada no frasco contendo o líquido BD SurePathTM (Figura 13). A coleta foi feita de maneira fácil exigindo apenas 2 rotações em sentido horário, conforme especificações do fabricante, realizada por profissionais, devidamente treinados, envolvidos na coleta de material cérvico-vaginal na Unidade Básica de Saúde.

O material biológico desta segunda coleta foi mantido em solução padrão adequada para realização da citologia pela tecnologia em meio líquido (BD SurePathTM, Burlington, NC, EUA) e encaminhado para a FCECON em Manaus para processamento e produção da lâmina corada de forma semi automatizada em equipamento da BD PrepMateTM e BD PrepStainTM. Todo o protocolo seguiu rigorosamente as recomendações do fabricante.

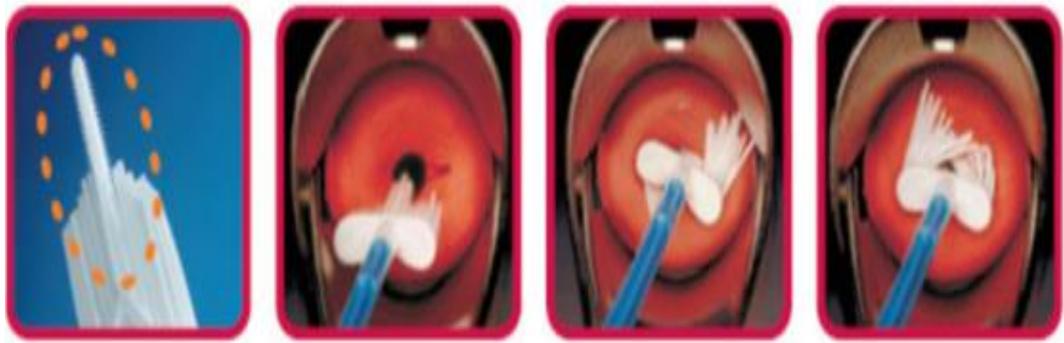


Figura 12: Coleta de amostra cervical com a escova Rovers® Cervix Brush Combi.

Fonte: <http://www.bd.com>



Figura 13: Kit de coleta de citologia em meio líquido SurePath™

Fonte: <http://www.bd.com>

4.8.8 Leitura das Lâminas

A leitura das lâminas preparadas pelo processo de semi automação por citologia líquida foi feita por um único farmacêutico-bioquímico com especialização em citologia clínica da rede de atenção oncológica do Estado do Amazonas em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Coari e de Manaus.

Os laudos emitidos foram disponibilizados a Secretaria Municipal de Saúde do Coari e as mulheres foram então direcionadas para atendimento médico ginecológico disponibilizado no município para avaliação, e quando necessário foram feitos os encaminhamentos e realização da colposcopia.

4.8.9 Colposcopia

As mulheres com Teste Cervical Onco E6™ positivo para hr-HPV, PCR positivo ou citologia alterada foram recrutadas para a realização da colposcopia na policlínica ambulatorial na área urbana do município de Coari.

A nomenclatura utilizada para a classificação foi a preconizada pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (IFCPC) aceita no Congresso Mundial do Rio de Janeiro em 5 de Julho de 2011, que os classifica os achados como : achados colposcópicos normais (epitélio escamoso original, epitélio colunar e epitélio escamoso metaplásico) e anormais (epitélio aceto-branco tênue, pontilhado, mosaico, epitélio acetobranco denso, leucoplasia, e vasos atípicos), sendo esta última subdividida em alterações menores ou maiores dependendo da intensidade da alteração (BORNSTEIN J *et al.*, 2011).

Para a realização da colposcopia foram utilizados os seguintes reagentes: solução aquosa de ácido acético glacial a 3%, solução de lugol e bissulfito de sódio. A colposcopia foi realizada por um profissional médico especializado de Manaus que gentilmente se deslocou até Coari e, que desconhecia os resultados prévios dos exames das pacientes.

4.8.10 Análise histopatológica

Nas mulheres que durante a realização do exame colposcópico apresentaram alterações maiores, foram submetidas à biópsia dirigida para exame histopatológico. Todos os procedimentos foram realizados com material apropriado, utilizando-se espéculos descartáveis acoplados com sistema de aspiração com bomba de vácuo. Os fragmentos obtidos através da biópsia foram conservados em frasco apropriado contendo formol a 10%, e transportados até Manaus. O local da biópsia foi cauterizado com instrumentos adequados e com solução de Policresuleno a 360mg/g (Albocresil®/Nycomed Pharma) imediatamente depois de terminado o procedimento para controlar o sangramento, e inserido tampão vaginal.

O processamento e leitura dos exames histopatológicos foram realizados em laboratório privado em parceria com os pesquisadores, por profissionais médicos patologistas. Os laudos foram emitidos e disponibilizados aos gestores do programa de saúde da mulher do município

de Coari. As mulheres com necessidade de continuidade de acompanhamento foram devidamente recrutadas e orientadas a seguir com os encaminhamentos devidos. Algumas delas inclusive foram atendidas na Fundação CECON em Manaus.

4.9 CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.9.1 Análise dos Dados

Os dados foram analisados descritivamente e apresentados em tabelas e gráficos sob a forma de frequência absoluta e relativa e/ou média ou mediana. A análise da significância de diferença de proporções e posterior avaliação de existência ou não de associação entre variáveis foi realizada utilizando-se o Teste Qui-Quadrado de Pearson (χ^2) e/ou o Teste Exato de Fisher, para os casos em que a frequência esperada fosse inferior a cinco ($p < 0,05$). Obtendo o valor de *Odds ratio* para análise de associação das variáveis de risco com o desfecho. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%, com um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram feitas através do software Epi Info versão 7.0.

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Caracterização dos genótipos de HPV na população de rastreamento e em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas” com âmbito regional e colaboração nacional, cujo objetivo principal é Caracterizar a infecção por Papilomavírus Humanos (HPV) mais prevalentes na população normal de rastreamento e em pacientes com câncer de colo de útero do estado do Amazonas, associando os mesmos aos achados cito e histopatológicos.

Foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas - FCECON, **CAAE128122134000004** (ANEXO I), respeitando as diretrizes para a realização de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Contou também com a anuência formal da Secretaria Municipal de Saúde de Coari, na qual o gestor maior (secretário de saúde) firmou parceria e apoio necessários para a realização do projeto.

4.11 RESULTADOS

4.11.1 Perfil sócioeconômico e demográfico das participantes

Participaram do estudo 412 mulheres ribeirinhas do município de Coari. Dentre as características sócioeconômicas, a maioria das participantes era da raça parda (89,3%), de união estável (52,4%). A idade das mulheres variou de 18 a 81 anos, com uma idade média de $36 \pm 13,2$ anos. A maioria apresentou baixo grau de escolaridade (53,4%) eram agricultoras (78%), e tinham como principal fonte de renda o programa governamental “bolsa família” (61,8%) (Tabela 02).

Tabela 2- Características socioeconômicas e demográficas das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM, 2014

Características	N (%)
Raça	
Parda	368 (89,3)
Branca	34 (8,3)
Negra	9 (2,2)
Indígena	1 (0,2)
Idade	
18-25	79 (19,2)
26-36	150 (36,4)
36-46	99 (24)
46-54	39 (9,4)
54 ou mais	45(11)
Estado civil	
Solteira	41 (10)
Casada	132 (32)
União estável	216 (52,4)
Divorciada	5 (1,2)
Separada	5 (1,2)
Viúva	13 (3,2)
Escolaridade	
Não alfabetizado	35 (8,5)
1-5 anos de estudo	220 (53,4)
5-10 anos estudo	72 (17,5)
>10 anos de estudo	85 (20,6)
Ocupação	
Agricultora	321 (78)
Dona de casa	17 (4,1)
Estudante	13 (3,2)
Funcionária Pública	43 (10,4)
Desempregada	3 (0,7)
Aposentada	13 (3,2)
Outros	2 (0,4)
Renda	
1 salário	128 (31,1)
2 a 3 salários	29 (7)
Bolsa família	255 (61,9)
Total	412 (100)

A localização geográfica das comunidades visitadas está plotada na figura 15 e demonstra os raios de distância das mesmas em relação ao município de Coari. Foram realizadas análises da relação da distância da moradia da mulher em relação a Coari (isolamento geográfico) em relação aos comportamentos de risco, resultados do teste Onco E6, PCR para HPV, citologia líquida, colposcopia e histopatológico. As mesmas estão demonstradas no ítem 4.11.9.



Figura 14: Localização geográfica das comunidades incluídas no estudo.

Fonte: Google Earth Pro, 2015. Versão 7.1.2.2041- (3°55'59.46"S, 63°03'50.46"W)

4.11.2 Características clínicas e comportamentais

A maioria dos participantes tinha iniciado atividade sexual por volta dos 15 anos (60,7%). A idade da primeira relação sexual variou de 10 a 28 anos, com uma média de idade de 15 (SD= 2,3 anos) (Tabela 03).

As participantes apresentaram uma média de 4 (SD= 3,1 filhos), e 41% delas possuíam de 2 a 5 filhos (Tabela 03).

Quando questionadas sobre o uso do preservativo com os parceiros fixos, as mulheres responderam não usar nunca (43,4%), outras às vezes (39%) e outras sempre (17,4%) (Tabela 4). Os motivos mais citados para o não uso consistente de preservativos com os parceiros fixos foram: “confiança no parceiro”, “parceiro não gosta” e “uso de outro método anticoncepcional”.

A maioria das participantes relatou ter tido mais de um parceiro sexual durante a sua vida (60,1%). Quanto ao número de abortos, 68,7% das mulheres estudadas nunca tiveram abortos. Mais da metade (60,1%) relatou nunca terem feito uso de contraceptivos. O hábito de fumar foi negado pela maioria (65,7%), enquanto apenas 15,2% das participantes eram fumantes. Ingerir bebida alcoólica mais de três vezes na semana foi negado por 98,8% das mulheres (Tabela 03).

Quanto a realização de exames preventivos, a maioria das mulheres (58,5%) informou realizar o exame uma vez ao ano, por ser uma exigência do Governo Federal para renovação do programa Bolsa família. Um percentual de 26,7% (n=110) nunca realizou o exame, dentre os motivos, a dificuldade de acesso foi o mais citado por essas mulheres (n=56,3). As pacientes do estudo também foram questionadas quanto à presença de doença sexualmente transmissível (DST) no momento da coleta ou no passado. Em relação à infecção atual, 14 mulheres (3,4%) disseram ter apresentado ou apresentarem alguma DST no momento da abordagem.

Quanto a vacinação contra o HPV, a maioria das mulheres informou que as meninas de seu convívio familiar não haviam sido vacinadas (n=298; 72,5%).

Tabela 3- Características clínicas e comportamentais das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM, 2014 (N=412)

Características	N (%)
Primeira relação sexual	
≤ 15	162 (39,3)
> 15	250(60,7)
Numero de filhos	
Nenhum	23 (5,6)
1	55 (13,4)
2 a 5	169 (41)
5 a 10	132 (32)
>10	33 (8)
Uso de preservativos	
Nunca	179 (43,4)
As vezes	161 (39)
Sempre	72 (17,4)
Número de parceiros 1 ano	
Nenhum	33 (8)
1	363 (88,1)
2 a 5	15 (3,7)
>5	1 (0,2)
Número parceiros toda vida	
1	164 (39,8)
2 a 4	180 (43,7)
5 a 10	52 (12,6)
> 10	16 (3,9)
Número de abortos	
Nenhum	283 (68,7)
≥ 1	129 (31,3)
Contraceptivos	
Sim	164 (39,8)
Não	248 (60,1)
Tabagismo	
Sim (atualmente)	63(15,2)
Sim (ex-fumante)	78(18,9)
Não	271(65,7)
Etilismo	
Sim	5 (1,2)
Não	407 (98,8)
Exame preventivo	
Nunca	110 (26,7)
1 x ano	241 (58,5)
A cada 2 anos	37 (9)
A cada 3 anos	17 (4,1)
Não lembra	7 (1,7)
História de DST	
Sim	14 (3,4)
Não	398 (96,6)

4.11.3 Aceitação da autocoleta

No presente estudo todas as 412 mulheres abordadas aceitaram a técnica por autocoleta, não havendo recusa por parte das entrevistadas. A maioria (97,8%) das mulheres que participaram do estudo gostaram da autocoleta com a escova Rovers® Evalyn®, sendo uma ferramenta considerada fácil por 95,4% das participantes e 4,6% acharam o dispositivo difícil de usar. Dentre as dificuldades encontradas, introduzir a escova no canal vaginal foi relatado por 21% das mulheres.

Para verificar a aceitação da autocoleta foi considerado apenas as mulheres que já haviam realizado o exame preventivo (302 mulheres). Destas, 76,5% preferiram a autocoleta, 18,2% consideraram indiferentes (sendo sem preferência) e 5,3% a coleta por um profissional de saúde. Sensações de dor e ardência durante a coleta foram relatados por 12,1% das mulheres. As razões para a preferência por autocoleta incluía privacidade, menor constrangimento, facilidades de coleta, acesso ao exame e menos dor (por dispensar o uso do espécuro). Já os motivos citados para a preferência da coleta feita pelo profissional de saúde foram por ser necessário para assegurar a saúde, e que ele tem conhecimento e experiência para coletar. Nenhuma das mulheres abordadas se recusou a fornecer amostras por autocoleta. Os dados relativos a aceitação do uso da autocoleta estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4- Descrição da aceitação do uso do dispositivo de autocoleta pelas mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM, 2014.

Categorias	n (%)
Gostaram	
Sim	403 (97,8)
Não	9 (2,2)
Difícil	
Sim	19 (4,6)
Não	393 (95,4)
Dificuldades	
Introduzir a escova	4 (21)
Abrir a tampa da escova	1 (5,3)
Fechar a tampa da escova	1 (5,3)
Não soube responder	13 (68,4)
Desconforto	
Sim	50 (12,1)
Não	362 (87,9)
Faria novamente	
Sim	407 (98,8)
Não	5 (1,2)
Total	412 (100)

4.11.4 Teste Cervical Onco E6™

A análise da expressão da oncoproteína E6 foi feita em todas as mulheres que participaram do estudo. Observou-se que das 412 amostras cérvico-vaginais autocoletadas 6 (1,4%) foram positivas para o Teste Cervical Onco E6™, sendo 3 positivas para o HPV do tipo 16 e 3 para o HPV 18. Todas as 6 mulheres positivas foram recrutadas, no entanto, apenas 5 compareceram para o exame citológico, colposcópico e histopatológico.

Das 5 mulheres positivas no teste Onco E6™ que compareceram ao exame citopatológico 4 (28,57%) destas apresentaram alterações citopatológicas, e 1 (2,44%) apresentou resultado normal. Das alterações, 02 apresentaram lesão intraepitelial de baixo grau e 02 apresentaram lesão intraepitelial de alto grau.

Analisando o resultado colposcópico das 5 mulheres positivas no Onco E6™, e que compareceram ao recrutamento, observou-se 03 casos alterados e dois casos foram considerados dentro da normalidade.

Das 03 amostras analisadas no histopatológico, 01 caso foi identificado neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I), 01 caso de neoplasia intraepitelial cervical de grau III (NIC III) e 01 carcinoma invasor. Os dados estão mais bem representados na tabela 5.

Tabela 5- Alterações dos exames das mulheres positivas no teste Onco E6

Onco E6™	Citologia	Colposcopia	Biópsia	PCR	Genótipos	
HPV 16	3	HSIL	Alterada	Carcinoma Invasor	REATIVO	HPV 16
		LSIL	Alterada	NIC III	REATIVO	HPV 16
		Sem seguimento	Sem seguimento	Sem seguimento	REATIVO	HPV 16
HPV 18	3	HSIL	Alterada	NIC I	REATIVO	18
		LSIL	Normal	Não realizada	REATIVO	18, 51
		Normal	Normal	Não realizada	REATIVO	HPV 18, 68

Analisando a positividade do teste Onco E6 frente a citologia em meio líquido, observou-se que das 14 alterações citopatológicas, 04 (28,6) foram positivas para o teste Onco E6 e 10 (71,4) foram negativas. É importante salientar que uma amostra no citopatológico (LSIL) revelou-se NIC III no histopatológico, e foi possível sua detecção no teste Onco E6™.

Todos os 6 casos positivos no Teste Onco E6™ apresentaram resultado positivo na PCR convencional PGMY 09/11, havendo concordância de 80% e significância estatística entre os testes ($P^* < 0,001$, * Teste exato de Fisher).

4.11.5 Infecção pelo HPV

A prevalência da infecção pelo HPV entre as 412 mulheres estudadas foi de 18,7% (n=77). Houve resultado inadequado em 0,4% (n=2), 01 amostra por não ter amplificado o DNA endógeno da beta-globina humana, e 01 por suspeita de contaminação, não sendo possível recrutar a mulher para a nova coleta (Tabela 6).

Tabela 6- Distribuição da frequência da Infecção pelo HPV nas mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014

PCR (PGMY09/11)	N(%)
Positivo	77 (18,7%)
Negativo	333 (80,9%)
Inadequada	2 (0,4%)
Total	412 (100)

Através da associação dos fatores sócios demográficos com a infecção por HPV, nosso estudo encontrou diferença, estatisticamente significativa entre a idade e o número de parceiros sexuais ao longo da vida (Tabela 08).

As mulheres positivas para o HPV apresentaram uma idade média de $34 \pm 15,3$ anos. Analisando o gráfico 01, observa-se que mulheres com idade abaixo dos 30 anos apresenta mais risco para a infecção pelo HPV.

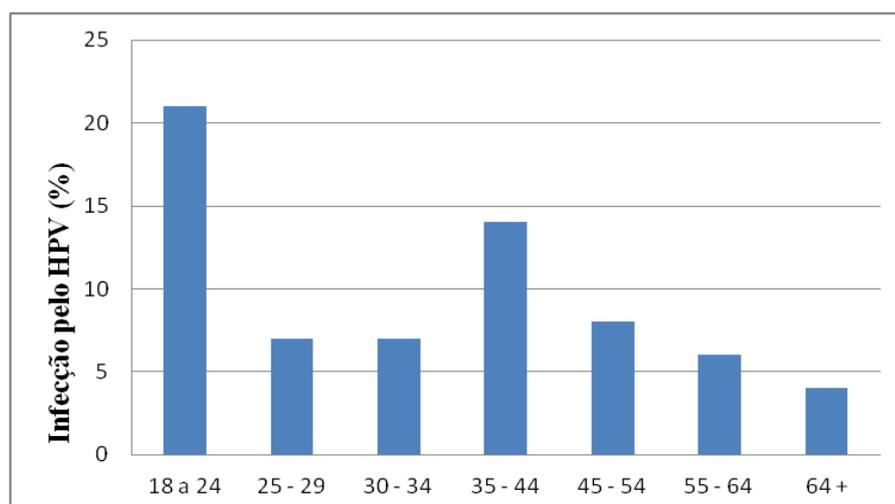


Gráfico 1: Distribuição da Frequência de idade das mulheres infectadas por HPV

De acordo com os dados da tabela 7 houve significância estatística entre a idade e a infecção por HPV ($p=0,04$).

Analisando a escolaridade das mulheres estudadas, observou-se que a maioria delas ($n=53$) apresentou baixo grau de escolaridade.

As mulheres positivas para HPV apresentaram uma média de $4 \pm 3,9$ filhos. A maioria tinha iniciado atividade sexual aos 15 anos de idade. A idade da primeira relação sexual para estas mulheres variou de 11 a 21 anos, com uma média de $15 \pm 1,8$ anos.

Ter mais de um parceiro sexual durante ao longo da vida foi relatado por ($n=59$) das mulheres com HPV. Analisando os dados da tabela 8, é possível observar que quanto maior o número de parceiros sexuais, maior o risco de ser infectada pelo HPV, o que demonstrou significância estatística ($p=0,02$).

Quanto ao número de abortos, a maioria (19,5%) relatou não ter apresentado nenhum aborto. A maioria das mulheres com HPV (67,5%) relatou ter o hábito de usar preservativos. O hábito de usar o preservativo pela maioria das mulheres foi analisado como fator de proteção para se ter infecção pelo HPV (IC: 0,3-0,9).

Em relação à infecção atual, 75 mulheres negaram ter apresentado ou estarem apresentando alguma DST no momento da abordagem. Esses dados demonstram que não houve associação e nem significância estatística entre a infecção pelo HPV e a história de DST.

Tabela 7- Características sócio-demográficas das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014 infectadas pelo HPV

Características	positivo		negativo		Total	OR ^a	P [*]	IC ^b 95%
	fi	(%)	fi	(%)				
Idade								
< 30	36	23,8	115	76,2	151	1,6	0,04	1,0- 2,7
≥ 30	41	15,8	218	84,2	259			
Escolaridade								
< 8	53	18,5	233	81,5	286	0,9	0,84	0,5-1,6
>8	24	19,3	100	80,7	124			
Numero de filhos								
< 4	36	46,8	177	83,1	213	0,7	0,31	0,4-1,2
≥ 4	41	20,8	156	79,2	197			
Idade primeira relação								
< 15	30	18,6	131	81,4	161	0,9	0,90	0,5-1,6
≥ 15	47	19,1	199	80,9	246			
Numero de parceiros sexuais								
< 5	58	16,9	285	83,1	343	0,5	0,02	0,2-0,9
≥ 5	19	28,4	48	71,6	67			
Número de abortos								
Nenhum	55	19,5	227	80,5	282	1,1	0,57	0,6-2,0
≥ 1	22	17,2	106	82,8	128			
Preservativo								
Não	25	14	153	86	178	0,5	0,03	0,3-0,9
Sim	52	22,4	180	77,6	232			
Exame preventivo								
Sim	51	17,4	243	82,6	294	0,7	0,23	0,4-1,2
Não	26	22,4	90	77,6	116			
DST								
Sim	2	14,3	12	85,7	14			
Não	75	18,9	321	81,1	396	0,7	0,66	0,1-3,2

^aOdds Ratio; ^bIntervalo de Confiança; * Teste do χ^2

4.11.6 Resultado Citopatológico

As 77 mulheres com HPV positivo foram recrutadas. Deste total, 55 (71,4%) mulheres compareceram a Policlínica em Coari para a coleta da citologia em meio líquido por profissionais treinados. O resultado obtido das amostras foi satisfatório perfazendo um percentual de adequabilidade das amostras de 100%. Destas 55 amostras satisfatórias, 41 (74,5%) delas apresentaram achados citológicos compatíveis com normalidade, e 14 (25,5%) apresentaram achados alterados. Das 14 alterações, o DNA do HPV foi detectado em 100%

das mulheres estudadas. A distribuição da frequência das alterações encontradas está descrita na tabela 8.

Tabela 8- Resultado citopatológico das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014.

Resultado	N(%)
Normal	41 (74,5)
ASCUS	7 (50%)
LSIL	5 (35,7%)
HSIL	2 (14,3%)
Total	55 (100)

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas;
LSIL: Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL: Lesão intraepitelial de alto grau;

4.11.7 Exames colposcópico e histopatológico e seguimento

As 77 mulheres com HPV positivo foram recrutadas. Deste total, 56 (72,7%) mulheres compareceram a Policlínica em Coari para a consulta médica especializada e colposcópica, e 21 não compareceram ao atendimento médico e seguimento. O profissional desconhecia o resultado das pacientes. Destas 56 colposcopias realizadas, 47 (83,9%) apresentaram achados normais e 9 (16,1%) achados alterados (tabela 09).

Tabela 9- Resultado colposcópico

Resultado	N = 56	f (%)
Normal	47	83,9
Alterada	9	16,1

Das 14 alterações citopatológicas, 04 (28,6%) apresentaram resultados alterados tanto na colposcopia como no histopatológico e 10 (71,4%) apresentaram achados normais. A concordância entre o resultado citopatológico e o histológico foi de 70%.

Das 412 mulheres, 2,2% (n=9) apresentaram alterações histopatológicas. Dessas, 05 apresentaram neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I), 2 neoplasia intraepitelial cervical de grau III (NIC III) e 2 mulheres apresentaram carcinoma invasor. Portanto, a prevalência de NIC3+ foi de 0,97% (4/412) e de carcinoma invasor foi de 0,48% (Tabela 10).

A idade das mulheres com alterações histopatológicas variou de 19 a 54 , com uma média de idade de $32 \pm 11,1$ anos. A maioria encontrava-se na faixa etária abaixo dos 30 anos e apresentava baixo grau de escolaridade (55,6%).

Tabela 10: Resultado Histopatológico das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM

Resultado Histopatológico	n = 412	f (%)
NIC I	5	1,21
NIC III	2	0,49
CARCINOMA INVASOR	2	0,48

Nota: Das 56 mulheres que compareceram para exame colposcópico, 9 apresentaram alterações e tiveram biopsia realizada. A frequência das alterações histopatológicas foi calculada frente ao total de mulheres incluídas no estudo.

As mulheres que apresentaram NIC I foram encaminhadas para consulta ginecológica no município de Coari para acompanhamento e orientações a cerca da periodicidade de realização dos exames. As mulheres com NIC III e carcinoma invasor foram encaminhados para a Fundação centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) em Manaus para consulta médica, acompanhamento e tratamento dos casos.

Das nove mulheres com alterações no exame histopatológico, 08 apresentaram positividade para o HPV pela técnica da PCR PGMY09/11. A especificidade calculada para a PCR PGMY09/11 para NIC 3+ foi de 98,7%.

Na tabela 11 é possível observar as características sócio-demográficas dos dois casos de carcinoma invasor. Uma das mulheres apresentou idade de 54 anos e a outra de 42 anos.

Uma delas residia a menos 20 km de distância do município de Coari e outra a mais de 60 km de distância de Coari. Ambas apresentavam nenhuma ou baixa escolaridade, eram casadas, agricultoras, tinham como principal fonte de renda o Programa Governamental Bolsa Família. As duas mulheres relataram não ter o hábito de usar a camisinha nas relações e uma ter sido tabagista no passado.

Tabela 11- Perfil sócioeconômico e de risco das mulheres com Carcinoma Invasor.

Perfil socioeconômico	Caso 1	Caso 2
Idade	54	42
Distância da Comunidade	≤ 20 km	≥ 60 km
Escolaridade	Analfabeta	Fundamental incompleto
Estado civil	Casada	Casada
Ocupação	Agricultora	Agricultora
Renda	Bolsa família	Bolsa família
Idade primeira relação	13 anos	17 anos
Número de Gestações	15	10
Número de parceiros ao longo da vida	2	1
Uso da camisinha	Nunca	Nunca
Tabagismo	Sim (ex-fumante)	Não

O seguimento das mulheres que apresentaram NIC III+ (envolve neoplasias intraepitelial cervical grau III ou carcinoma invasor) está representado na tabela 12.

Tabela 12-Seguimento das mulheres com lesão para NIC III+.

	Onco E6™	PCR	Citologia	Colposcopia	Histopatológico	Genotipagem
1 (JAL)	Negativo	Positivo	Normal	Alterada	NIC III	Inconclusiva*
2 (ISA)	HPV 16	Positivo	LSIL	Alterada	NIC III	HPV 16
3 (MAPS)	HPV 16	Positivo	HSIL	Alterada	Carcinoma Invasor	HPV 16
4 (ETM)	Negativo	Positivo	Não realizada	Alterada	Carcinoma Invasor	Inconclusiva*

* O teste Papillocheck® apresentou falha no controle da amostra

Todas as pacientes com alterações NIC III+ no exame histopatológico foram encaminhadas à Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas em Manaus. Os dois casos de NICIII foram acompanhados e realizada conização.

Quanto aos casos de carcinoma invasor, até o presente momento uma das mulheres encontra-se em fase de estadiamento clínico, compreendendo exame físico e outros exames como: cistoscopia e retossigmoidoscopia, tomografia abdominal e outros exames necessários para o seguimento do protocolo terapêutico. A outra mulher já obteve o estadiamento clínico, e foi submetida ao tratamento cirúrgico.

4.11.8 Genotipagem pela técnica PapiloCheck® e PCR em tempo real

Das 79 amostras analisadas, o HPV foi detectado em 46 (58,2%). Quatorze (17,7%) amostras foram consideradas negativas e 19 (24,67%) foram consideradas inválidas.

Destas 46 mulheres cujas amostras seguiram para genotipagem do HPV, 31(39,2%) apresentaram infecção única, e 15 (19%) infecção múltipla.

O HPV de alto risco foi detectado em 37 amostras (9%) e foi negativo em 375 (91%) amostras. O de baixo risco foi detectado em 17 (4,1%) amostras e negativo em 395 (95,9%) amostras.

O HPV 51 foi o mais frequente, sendo encontrado em 8 amostras (1,94%), HPV 16 em 7 (1,7%), HPV 53 em 5 (1,2%) e HPV 18 em 4 (1%). Os demais genótipos estão representados no gráfico 2.

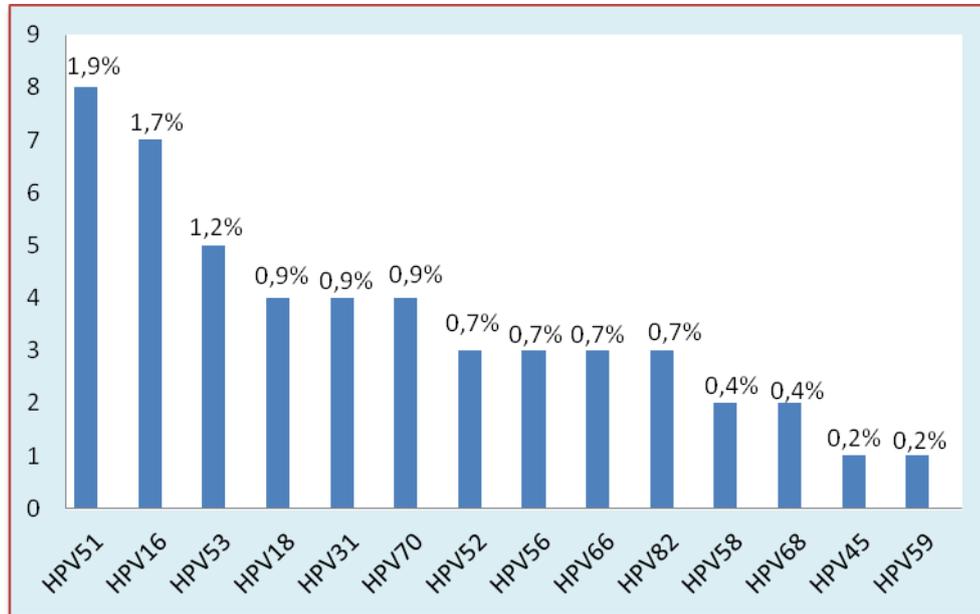


Gráfico 2: Distribuição dos genótipos do HPV de alto risco das mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM no ano de 2014.

Analisando a concordância entre o teste pela técnica do Papillocheck® e a PCR PGMY09/11, pode-se observar que dentre as 79 amostras, 46 (58,2%) foram consideradas positivas no teste Papillocheck, 14 (17,7%) foram consideradas discordantes: positiva na PCR PGMY09/11 e negativa no PapilloCheck®, 19 (22,07%) amostras insatisfatórias (falha no controle da amostra). Os testes apresentaram uma concordância de 80% para a detecção do HPV.

Das 55 amostras com citologia realizada, o genótipo do HPV foi detectado em 30 (78,9%), 08 amostras foram consideradas negativas (21,1%), e em 17 amostras o teste se apresentou inválido (falha no controle da amostra).

O genótipo do HPV foi detectado em 11 (78,6%) das 14 amostras com citologia alterada, em 1 (7,1%) amostra a genotipagem foi negativa e em 2 (14,3%) amostras o resultado foi inválido (falha no controle da amostra).

Das 14 alterações citopatológicas, o DNA do HPV foi detectado em 36,4% das mulheres com ASCUS; 45,5% das mulheres com LSIL, 18,1% das mulheres com HSIL. Os dados estão representados na tabela 13.

No nosso estudo, das 07 amostras com alterações citológicas do tipo ASCUS, 4 (36,4%) possuíam positividade para o HPV, compreendendo os genótipos 16, 31, 42 e 58. Das 5 participantes com LSIL, 5 (45,5%) apresentou positividade para HPV, sendo identificado o genótipo HPV 16, 18, 51, 31, 43, 66 e 82. Das 2 mulheres com HSIL, 2 (18,1%) apresentaram positividade para HPV, incluindo os genótipos 16 e 18.

Foi analisada a concordância entre o teste pela técnica do Papillocheck® e a citologia, e 78,6% (11/14) das amostras alteradas no citopatológico foram consideradas positivas no teste, uma (7,1%) foi considerada discordante, e duas (14,3%) amostras foram consideradas inválidas pelo Papillocheck® e apresentaram resultados alterados no exame citopatológico. Os testes apresentaram uma concordância de 47,3%.

Tabela 13: Resultado da PCR para HPV entre as mulheres com citologia alterada.

Alterações citopatológicas	PCR HPV		
	Positivo (%)	Negativo (%)	Total
ASCUS	4 (36,4)	03	07
LSIL	5 (45,5)	-	05
HSIL	2 (18,1)	-	02
Total	11 (100)	03	14

A genotipagem pela técnica do Papillocheck® foi realizada em 08 das 09 mulheres com alterações histopatológicas. A amostra que não foi feito o Papillocheck® apresentou resultado negativo no PGMY09/11. O genótipo do HPV foi detectado em 6 (75%) amostras

alteradas e foi negativo em duas (25%). Destas seis amostras, 4 (66,67%) apresentaram neoplasia intraepitelial de grau I, 1 (16,67%) neoplasia intraepitelial de grau III e 1 (16,67%) apresentou carcinoma invasor.

Na distribuição dos genótipos do HPV por classificação histológica, observou-se a seguinte prevalência: No grupo de mulheres com neoplasia intraepitelial de grau I (5 NIC I) os genótipos encontrados foram 51, 18, 31, 44 e 56. Apenas um dos casos apresentou infecção múltipla pelo HPV 44 e 56.

4.11.9 Distância das comunidades ribeirinhas em relação ao município de Coari

Das 06 mulheres teste Onco E6TM positivo, três (50%) residiam a menos que 20 km de distância do município de Coari, duas (33,3%) entre 20 e 40 km de distância, e apenas uma (16,7%) à mais de 40 km de Coari.

Das 14 mulheres com alterações citopatológicas, 10 (71,4%) estavam localizadas a ≤ 20 km de distância do município de Coari, e 04 (28,6%) à $< 20 \leq 40$.

Já em relação às mulheres alteradas no exame histopatológico, sete (77,8%) estavam localizados à ≤ 20 km de distância do município de Coari, uma (11,1%) à $< 20 \leq 40$, e uma (11,1%) à $> 40 \geq 60$.

Quanto às mulheres positivas na PCR para HPV, 32 (41,5%) estavam localizados à ≤ 20 km de distância do município de Coari, 23 (29,9%) à $< 20 \leq 40$, e 22 (28,6%) à $> 40 \geq 60$.

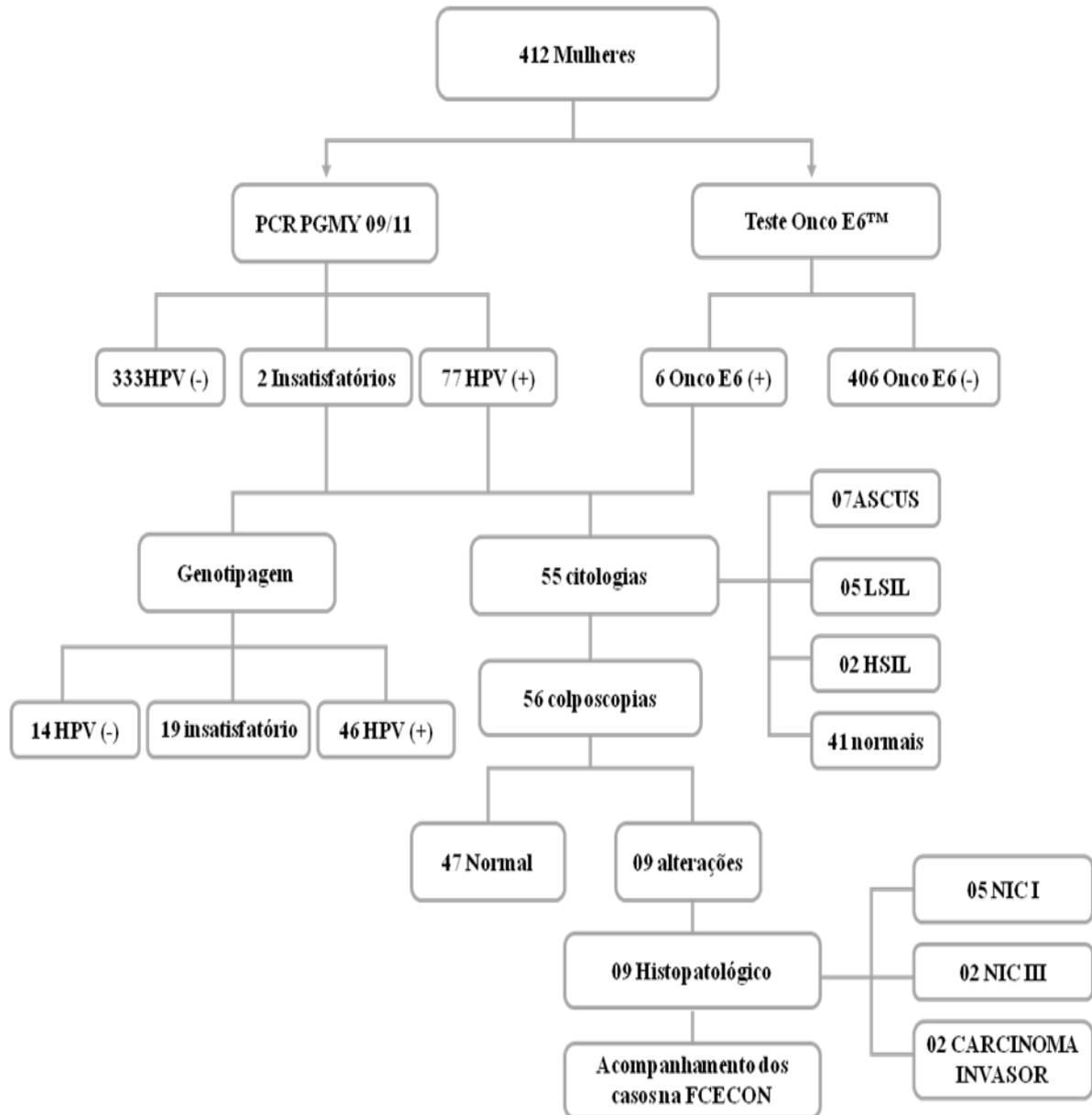


Figura 15: Fluxograma dos resultados

4.12 DISCUSSÃO

A cidade de Coari encontra-se na região central do Amazonas, sendo a quinta maior cidade do estado, com uma população de 75.965 habitantes. Localiza-se na região do Médio Solimões, cerca de 363 km distante de Manaus. É uma das cidades mais ricas da região Norte em volume de recursos financeiros, recursos esses advindos principalmente dos *royalties* devidos à exploração de petróleo e gás natural pela Petrobrás em suas terras (BRASIL, 2010).

O Estado do Amazonas apresenta uma imensa população ribeirinha, vivendo em condições bastante remotas e de difícil acesso. Historicamente, especialmente na região amazônica, os programas de rastreamento não foram capazes de superar o isolamento geográfico e as barreiras sócioeconômicas e culturais significativas existentes.

A amostra desse estudo foi composta por mulheres sexualmente ativas, moradoras de comunidades ribeirinhas da área rural do município de Coari, com predominância da raça/cor, parda, característica essa que pode ser observada com grande frequência no estado do Amazonas. A média de idade das participantes foi de $36 \pm 13,2$ anos. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Ezechi *et al.* (2014), com 515 mulheres Nigerianas, pertencentes em sua maioria (64,5%) a área rural compreendendo idades entre 18 - 81 anos e uma mediana de 37 anos.

Aproximadamente 60,4% das mulheres estudadas apresentou idade abaixo dos 36 anos. A taxa de mulheres jovens sexualmente ativas e expostas aos riscos para câncer de colo de útero chama atenção para a idade recomendada para início do rastreamento primário do câncer do colo do útero preconizado pelo Ministério da Saúde que é de 25 anos (INCA, 2014). No Brasil, essa idade para início do rastreamento toma como dados o Registro Hospitalar de Câncer (RHC) os dados da Fundação Oncocentro de São Paulo (FOSP) e da Universidade de Campinas (UNICAMP) que apontam uma taxa de aproximadamente 1% dos carcinomas invasores em mulheres com menos de 24 anos (BRASIL, 2011).

No entanto, na região norte, especificamente na população de estudo, observou-se o início da atividade sexual muito cedo, variando de 10 a 28 anos, o que leva a exposição à infecção pelo HPV muito precocemente e um risco para o câncer cervical nessas mulheres.

Os dados do estudo corroboram com os achados de Marcellusi *et al.*, (2015), num estudo realizado com 600 mulheres de seis centros de pesquisa clínica, localizadas na região central, norte e sul da Itália. Foi observado que o início da atividade sexual antes dos 18 anos aumenta o risco de até 1,62 vezes ($P = 0,034$) para a infecção pelo HPV.

Estudo realizado em um hospital universitário do Reino Unido, com 125 mulheres apresentando resultado citopatológico alterado para LSIL verificou-se que 80% das mulheres jovens não conseguiram eliminar o vírus do HPV em um ano. Dessas 23,3% progrediram para HSIL e 61,7% persistiram com LSIL (WOO *et al.*, 2010).

Quanto à situação conjugal, a maioria delas relatou viver com um companheiro em união estável, permitindo a dedução da existência de maior atividade sexual monogâmica e fixa. Este dado sugere que essas mulheres apresentam relações conjugais mais duradouras com seus parceiros, apresentando menor risco para a infecção pelo HPV e outras DST's.

Pinto, Fuzii e Quaresma (2011) realizaram um estudo com 444 mulheres da área urbana e rural da Amazônia Oriental brasileira. Observou-se que mulheres solteiras, separadas ou viúvas apresentaram maior risco de 4,3 ($p = 0,0097$) para a infecção pelo HPV comparada às que moravam com um companheiro ou eram casadas.

A população estudada apresentou baixo nível sócio-econômico representado pela baixa escolaridade, baixa renda e por residirem em áreas rurais com isolamento geográfico. Quanto à escolaridade, observou-se que grande parte apresentou menos que oito anos de estudo, o que representa em condições padrões no Brasil à no máximo ao ensino fundamental completo.

De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílio –PNAD, a educação é um bem coletivo imprescindível para a inserção social apresentando um visível impacto nas condições gerais de vida da população. Melhorias relativas no acesso à educação de qualidade

devem ser almeçadas pelo poder público, pois sem avanço nas condições de vida da população e redução das desigualdades sociais, a educação dificilmente cumprirá seu papel de promotora de igualdade de oportunidades (BRASIL., 2012).

A falta de acesso a informação por morarem em áreas rurais e de isolamento geográfico aumenta as chances dessas mulheres adquirirem as DSTs. Por serem de áreas rurais, a agricultura foi predominantemente relatada como ocupação principal pela maioria delas.

Na população estudada, o programa Governamental Bolsa Família foi a principal fonte de renda citada por elas. Quando perguntadas sobre a frequência da realização do exame preventivo, a maioria (58,5%) informou fazer anualmente o exame por ser uma exigência do programa. Dentre os motivos de não realização, a dificuldade de acesso foi o mais citado.

Relatos como “só faço porque é o jeito, não gosto de fazer o exame, mas preciso do Bolsa Família para sobreviver” foram observados. Essa informação se justifica pelo maior percentual de mulheres do estudo que realizaram o exame uma vez ao ano.

De acordo com os dados, é possível observar que o programa de rastreamento vigente não tem controle sobre quem está fazendo os exames e tampouco sobre o intervalo em que os exames têm sido realizados. Esse cenário tem contribuído para que as mulheres sejam condicionadas a realizar o exame preventivo a cada 12 meses e isso induz a um caminho oposto ao recomendado pelas próprias diretrizes do Ministério da Saúde que orienta que as mulheres após dois exames citológicos normais passem a realizar o mesmo com intervalo de três anos. A consequência óbvia é que há um contingente de mulheres super-rastreadas e outras em falta com os controles (BRASIL, 2011).

Um desdobramento importante desta tendência é que o cálculo da taxa de cobertura aplicado leva em conta 1/3 da população de mulheres na faixa etária de rastreio como se a mesma mulher só voltasse a repetir o teste a cada 3 anos, o que leva a um possível equívoco do cálculo deste indicador.

Uma minoria das mulheres estudadas informou: “faço o exame porque é bom pra minha saúde e previne o câncer”. Percebe-se o baixo grau de informação dessas mulheres referentes ao exame preventivo e da importância de se realizar o exame.

A alta paridade foi uma característica observada na população de estudo, onde a maioria das mulheres apresentava de 2 a 5 filhos. Esses dados sugerem que esse grupo de mulheres possui pouca informação sobre os métodos contraceptivos e sobre a sexualidade, o que é evidenciado também pelo baixo nível de escolaridade e o acesso aos serviços médicos limitados. Algumas mulheres informaram não apresentar recursos financeiros para ir ao município de Coari para adquirir os métodos contraceptivos nos programas de planejamento familiar. Além disso, algumas vezes os métodos contraceptivos não são disponibilizados por estarem em falta na unidade de saúde.

Vale ressaltar o fator cultural, onde algumas mulheres são influenciadas pela religião à procriação, não fazendo uso de nenhum método de barreira. A renda obtida pelo programa Governamental Bolsa Família é de acordo com o número de filhos, quanto maior o número de filhos, maior é o benefício recebido. A alta paridade Para Bosch *et al.* (2002), é um fator consistente para o câncer cervical em mulheres que possuem DNA do HPV. Segundo os autores, o fator de risco dobra nas que tiveram 4 filhos, quando comparado com as que tiveram 1 ou nenhum.

Quando perguntadas a respeito do número de parceiros sexuais ao longo da vida, a grande maioria das mulheres deste estudo (43,7%) relatou ter tido de 2 a 4 parceiros. As mulheres que informaram ter mais de um parceiro sexual ao longo da vida ficam mais expostas a infecção do HPV e ao desenvolvimento de neoplasias cervicais.

Num estudo feito por Liu *et al.*, (2015), numa metanálise recente de estudos epidemiológicos para associar a multiplicidade de parceiros à infecção por HPV e ao câncer cervical. Observaram que a multiplicidade de parceiros, com ou sem infecção por HPV, representa um potencial fator de risco para o câncer cervical.

Marcellusi *et al.*, (2015), encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo com 600 mulheres de seis centros de pesquisa clínica, localizadas na região central, norte e sul

da Itália. Foi observado que ter mais de cinco parceiros sexuais aumentou o risco em 2,52 vezes ($P = 0,004$) para adquirir infecções induzidas pelo HPV.

Os dados encontrados convergem com o estudo feito por Imai *et al.*, (2015), num estudo de prevalência e genotipagem de HPV de alto risco em estudantes de universidades na cidade de Miyazaki, Japão. Observou-se que mulheres que relataram ter mais de cinco parceiros sexuais, apresentaram maior risco de infecção para HPV de alto risco, sugerindo que a maioria das relações dessas mulheres com seus parceiros sexuais teria sido relativamente curto.

Um dos fatores de risco mais consistentes para algumas infecções sexualmente transmissíveis é o alto número de parceiros sexuais, sejam eles fixos ou eventuais (ALMONTE *et al.*, 2008).

Das mulheres incluídas neste estudo, encontramos um alto número (31,3%) de mulheres que já tinham passado pela experiência de pelo menos um aborto. Sem desconsiderar outras causas relacionadas à ocorrência de abortos sabemos que alguns patógenos sexualmente transmissíveis como a *Chlamydia Trachomatis* e gonococo estão relacionados a estes eventos (VALLADÃO *et al.*, 2011).

Quando perguntadas a respeito do uso do preservativo com os parceiros fixos, a grande maioria (43,4%) afirmou não usar “nunca”. Dentre os motivos mais citados para o não uso frequente do preservativo com os parceiros fixos foram: “confiança no parceiro”, “parceiro não gosta” e “uso de outro método anticoncepcional”. A “confiança no parceiro” está diretamente relacionada com a concepção cultural de que no relacionamento fixo está implicado um relacionamento afetivo, duradouro e exclusivo, sendo difícil que o preservativo seja negociado como meio de prevenção às DST.

O “parceiro não gosta” tem suas raízes nas relações de gênero (isto é, de poder entre os sexos). Esse poder diferenciador entre homens e mulheres amplia a vulnerabilidade feminina, pois prioriza o prazer sexual masculino em detrimento dos cuidados com o corpo e com a saúde da mulher (BRASIL, 2007).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), os contraceptivos orais estão associados como um fator de risco para o câncer cervical. Mais da metade (60,1%) das mulheres presente estudo relatou nunca terem feito uso de contraceptivos.

Num estudo de metanálise feito por Appleby *et al.* (2007), com 24 estudos reunidos de todo o mundo, observou-se que o risco relativo do câncer do colo uterino do útero é maior em usuárias de contraceptivos orais em comparação às que não usam, sendo que esse risco diminui ao cessar o uso.

Uma consistente associação entre tabagismo e câncer cervical tem sido demonstrada por diversos estudos (APPLEBY *et al.*, 2006; CAMBOU *et al.*, 2015; ROURA *et al.*, 2014; ZHEN, HU e BIAN, 2013). No presente estudo, o tabagismo foi negado pela maioria (65,7%) das mulheres. Dados de uma metanálise recente mostrou que o tabagismo aumenta significativamente o risco para o câncer do colo do útero, e seus efeitos são reforçadas quando há interação com a infecção pelo HPV (ZHEN, HU e BIAN, 2013).

As mulheres arroladas no estudo também foram questionadas quanto à presença de DST prévia. Observou-se que 14 mulheres (3,4%) disseram ter apresentado ou apresentarem alguma DST no momento da coleta. A história de infecção prévia por algum patógeno sexualmente transmissível constitui um fator de risco muito bem estabelecido para o câncer do colo do útero (BRASIL, 2008; EZECHI *et al.*, 2014).

Quanto a vacinação contra o HPV, a maioria das mulheres informou que as meninas de seu convívio familiar não haviam sido vacinadas (72,5%). As vacinas profiláticas contra o HPV têm potencial para reduzir substancialmente a incidência do câncer do colo do útero e outras doenças (KAHN e BERNSTEIN, 2013).

Analisando as informações referidas pelas mulheres, observa-se que a cobertura vacinal no estado do Amazonas não conseguiu alcançar toda a população alvo, e que as barreiras geográficas existentes ainda são um desafio para os programas de rastreio do câncer do colo do útero e os programas vacinais existentes.

Com a implementação generalizada de vacinas contra o HPV, as infecções por HPV e as lesões relacionadas com o HPV diminuirá substancialmente, o que poderia aumentar as taxas de resultados falso-negativos em citologia, além de reduzida especificidade. A combinação de testes de HPV e vacinação contra o HPV com triagem citológica é sugerido como uma ferramenta otimista para proteger as mulheres contra o câncer cervical (LORENZI, SYRJANEN e LONGATTO-FILHO, 2015).

Estratégias de rastreamento alternativo por meio da autocoleta têm sido desenvolvidas e avaliadas. A autocoleta é uma opção de coleta atrativa para detecção do DNA do HPV, pois dispensa o uso do espécuro vaginal. A amostra é coletada pela própria paciente com a escova, podendo ser feita em casa (BHATLA *et al.*, 2009; CROFTS *et al.*, 2015; LORENZI *et al.*, 2013; LORENZI, SYRJANEN e LONGATTO-FILHO, 2015; PAUDYAL *et al.*, 2015; ROSENBAUM *et al.*, 2014; VIRTANEN *et al.*, 2014; ZEHBE *et al.*, 2011).

A incidência do câncer cervical e a mortalidade têm diminuído significativamente nos lugares onde o teste do Papanicolaou com base no rastreamento tem sido efetivamente implementado. No entanto, a incidência do câncer cervical e a mortalidade são aproximadamente 10 vezes maiores em países de média e baixa renda, onde os programas de rastreamento baseados no teste do Papanicolaou tem apresentado limitações (CATARINO *et al.*, 2015; CROFTS *et al.*, 2015; DA FONSECA *et al.*, 2014; GLOBOCAN, 2012; IARC, 2014; QIAO *et al.*, 2013).

Para um país de dimensões continentais, como o Brasil, com grande disparidade socioeconômica e cultural entre as regiões, a possibilidade de se coletar amostra através da autocoleta pode vir a ser uma alternativa bem-vinda. Além disso, possibilitaria que parte da população que não tem acesso aos programas de prevenção ou até foge deles pelo temor ou constrangimento quanto ao atendimento médico viesse a ele se incorporar, aumentando assim os índices de cobertura no estado do Amazonas.

A autocoleta com a escova Rovers® Evalyn® foi uma ferramenta aceita em 97,8% das mulheres entrevistadas e considerada fácil por 95,4% das participantes. Isto é encorajador no sentido de que quanto mais a autocoleta se torna familiar ao público, mais mulheres

poderiam estar dispostas a utilizar esta opção de coleta no futuro. Da mesma forma foi encontrado no estudo realizado por Bhatla et al. (2009), na Índia com 546 mulheres que procuraram o serviço ambulatorial de ginecologia, onde a técnica por autocoleta foi bem aceita pelas mulheres e 98,1% das mulheres foram capazes de fornecer uma amostra satisfatória.

Num estudo realizado em Toronto/Canadá com mulheres de idades entre 29-59 anos, a maioria 77,1% (37/48) achou fácil a autocoleta. Da mesma forma, 61,7% (29/47) participantes disseram que a técnica era confortável, e 87,2% das participantes aceitavam a triagem do HPV por autocoleta no futuro (ZEHBE *et al.*, 2011).

Das 412 mulheres participantes, apenas 4,6% (19 mulheres) acharam o dispositivo de autocoleta difícil de usar. Dentre as dificuldades encontradas, introduzir a escova no canal vaginal foi relatado por 4 mulheres (21%). Num estudo multicêntrico realizado na França com 722 mulheres de 20 a 65 anos, um total de 104 mulheres (14,4%) relatou apresentar dificuldades de executar a autocoleta vaginal. Elas tinham dificuldade para estimar a profundidade necessária para a autocoleta ou onde e como introduzir o cotonete e 64 mulheres (8,9%) relataram dor ou desconforto durante o procedimento de autocoleta (HAGUENOER *et al.*, 2014).

No estudo observou-se uma maior preferência pela autocoleta (76,5%) quando comparada a coleta feita por um profissional de saúde (5,3%). Sensações de dor e ardência durante a coleta foram relatados por 12,1% das mulheres. As mulheres informaram que gostaram da autocoleta por razões práticas, “porque é mais fácil e mais conveniente, não preciso ir até ao posto de saúde”. Os resultados de uma revisão sistemática feita por Paudyal et al. (2015), mostraram que a autocoleta é um método altamente aceitável por 85% das mulheres, sendo considerada fácil pela maioria (88%) das participantes e uma técnica de maior preferência quando comparada ao exame feito pelo profissional.

As mulheres ao referirem “não preciso ir ao posto de saúde”, citaram vários motivos. Dentre eles o mais citado por elas foi o número de fichas limitadas para o atendimento com o profissional e o difícil acesso ao serviço de saúde. Além disso, citaram dificuldades

financeiras para se deslocarem até ao município, e isso acabava desmotivando-as a não fazer o exame preventivo.

Uma dos maiores desafios encontrados durante o estudo foi chegar a essa população ribeirinha. A população estudada mora nas proximidades dos rios e algumas sobrevivem da pesca, da caça, da roça e do programa Governamental bolsa família. As casas eram na sua maioria de madeira, não possuíam energia elétrica, água encanada e saneamento básico. O rio possui um papel fundamental na vida desta população, pois é através dele que são estabelecidas as ligações entre as comunidades e o município.

A situação geográfica dessas comunidades é um dos principais fatores limitantes de acesso aos serviços básicos de saúde e educação. As mulheres estudadas convivem com o isolamento econômico e social, ficando à margem de uma série de políticas públicas e mecanismos de controle da qualidade de vida. Isso justifica a baixa participação das mulheres nos programas de detecção do câncer cervical encontrada no estudo. Existe uma grande diferença na cobertura de rastreio quando se estratifica por área de residência, sendo muito menor nas áreas rurais do que nas urbanas. Isso aumenta o risco de morrer pelo câncer do colo do útero até três vezes mais em populações rurais e dispersas (HERNANDEZ-MARQUEZ *et al.*, 2014; STROHL *et al.*, 2015).

Entre as mulheres estudadas, os motivos citados pela preferência da autocoleta incluía privacidade, ausência de constrangimento, facilidades de coleta, acesso e menos dor (por dispensar o uso do espécúlo). Já os motivos citados para a preferência da coleta feita pelo profissional de saúde foram por ser necessário para assegurar a saúde, e que ele tem conhecimento e experiência para coletar. Nenhuma das mulheres abordadas se recusou a fornecer amostras por autocoleta.

Razões semelhantes como privacidade, experimentar menos dor e ausência de constrangimento do durante o exame com o profissional de saúde foram encontradas no estudo de Virtanem *et al.* (2014), Crofts *et al.* (2015), Rosenbaum *et al.* (2014) e Paudyal *et al.* (2015). Más experiências, incluindo desconforto e insegurança durante a autocoleta também foram relatadas.

A autocoleta no estudo de Silva *et al.* (2011), com 435 adolescentes de oito escolas do ensino médio e duas instituições universitárias da região norte de Portugal com idades de 14 a 30 anos, foi considerado um método menos dispendioso e não invasivo que reduz o desconforto e mal-estar das mulheres quando este é comparado ao exame com o profissional de saúde nos programas de rastreio.

Para Darlin *et al.* (2013), mulheres que não participam do exame preventivo a longo prazo, aceitam três vezes mais o teste para HPV por autocoleta quando oferecido a elas do que quando foram convidadas para o exame por um profissional na unidade de saúde.

Em países com programas de rastreio existentes e funcionantes, o papel atual da autocoleta seria para oferecer uma alternativa para as mulheres relutantes em participar do rastreio baseado na coleta por um profissional de saúde. Alguns estudos têm mostrado informações sobre a não preferência das mulheres na coleta por um profissional comparado a autocoleta, e as suas razões para a preferência (CROFTS *et al.*, 2015; DARLIN *et al.*, 2013; LORENZI *et al.*, 2013; ROSENBAUM *et al.*, 2014; VIRTANEN *et al.*, 2014; ZEHBE *et al.*, 2011).

Num estudo piloto realizado no Canadá, a maioria das participantes (87,2%) era favorável no futuro da triagem do HPV por autocoleta. Este achado foi independente da idade, nível educacional e história prévia de testes de Papanicolaou anormais. A autocoleta e os testes para HPV foram bem recebidos e a qualidade da amostra foi excelente (ZEHBE *et al.*, 2011).

Vários estudos têm mostrado que a autocoleta tem sensibilidade para a detecção de lesões de baixo e alto grau e até mesmo câncer invasivo, e que é equivalente ou mesmo superior ao exame de Papanicolaou (ARBYN *et al.*, 2014; BELINSON *et al.*, 2012; PETIGNAT *et al.*, 2007).

Um estudo recente de metanálise demonstrou que para pesquisa de infecção por HPV de amostras obtidas por profissional médico é exigido exame ginecológico, e que se forem autocoletadas pode prevenir o câncer de colo em áreas remotas. E que apesar do valor

preditivo positivo do teste de HPV ser mais baixo em amostras vaginais autocoletadas comparadas com a citologia, tais testes podem ser preferíveis para detectar NIC 2 ou lesões mais graves em ambientes de baixos recursos, onde a infraestrutura precária prejudica a eficácia dos programas de triagem citológica (ADLER *et al.*, 2012; ARBYN *et al.*, 2014).

No México foi feito um ensaio randomizado com mulheres de comunidades rurais mexicanas com idades entre 25-65 anos. Foram selecionadas 9.202 mulheres aleatoriamente no grupo de triagem do HPV para a realização da autocoleta, assim como 11.054 para realização da citologia cervical. Neste estudo, a Prevalência de DNA do HPV foi de 9,8% (IC 95% 9,1 -10 · 4). A sensibilidade relativa do teste de HPV foi de 3,4 vezes maior (2,4 -4 · 9) que a citologia. O valor preditivo positivo do teste de HPV para lesões NIC 2 ou maior foi de 12,2% (9,9 -14 · 5), em comparação com 90,5% (61,7 -100) da citologia. Vale ressaltar que 100% das mulheres selecionadas aceitaram a realização da autocoleta nesse estudo (LAZCANO-PONCE *et al.*, 2011).

Num estudo para verificar o predomínio de genótipos de HPV em amostras cervicais vaginais autocoletadas e coletada pelo médico, observou-se que a maioria das participantes (91%) descreveu a escova como fácil de usar, e muitas destas mulheres referiram o aspecto da autocoleta ser menos demorado e ter um maior benefício. Cerca de um terço das participantes estava preocupada com a realização do teste corretamente, e disse preferir um "especialista" para coletar a amostra. No entanto, a maioria das mulheres entrevistadas (70%) favoreceu a autocoleta de amostras como uma opção de escolha durante a coleta com o médico, por razões de conforto e conveniência (DIIJKSTRA *et al.*, 2012).

Quanto ao teste Onco E6™, a expressão da oncoproteína E6 foi observada em 06 (1,4%) casos das amostras cérvico-vaginais autocoletadas. No estudo feito por Zhao *et al.* (2013) com 7.543 mulheres com idades de 25-65 anos, da área rural da China 1,8% das amostras apresentaram positividade para o teste Onco E6™.

Das 14 alterações encontradas no citopatológico, 04 (28,6%) foram positivas para o teste Onco E6 e 10 (71,4%) foram negativas. A concordância entre o teste Onco E6™ e o exame citopatológico foi de 80% ($p = 0,01$). É importante salientar que uma amostra no

citopatológico (LSIL) revelou-se NIC III no histopatológico, e foi possível sua detecção no teste Onco E6TM. Talvez uma das limitações encontradas no estudo foi a não realização da citologia em todas as mulheres, uma vez que só realizava o exame a mulher que apresentasse positividade para o teste Onco E6 ou para a PCR. Apesar da boa concordância entre o teste e o exame citopatológico, a maioria das mulheres deixou de ser rastreada pelo citopatológico.

Por outro lado, um caso de LSIL no citopatológico se apresentou como NIC III no histopatológico. Este dado demonstra que a detecção da oncoproteína E6 do HPV pelo teste é útil para identificar mulheres que apresentam lesões pré-cancerígenas e até mesmo o câncer cervical. É importante salientar que o exame citopatológico também apresenta limitações que vão desde a técnica de coleta até o preparo e leitura da lâmina. Estes fatores podem ter interferido na qualidade da amostra para um diagnóstico citopatológico preciso.

O resultado histopatológico das mulheres positivas no teste identificou 01 caso de neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I), 01 caso de neoplasia intraepitelial cervical de grau III (NIC III) e 01 carcinoma invasor. A sensibilidade do onco E6TM para NIC3+ foi de 50% (2/4) e para qualquer NIC foi 60% (3/5). A especificidade para NIC3+ foi de 99%.

A alta especificidade do teste Onco E6 foi significativa para a detecção de lesões pré-cancerosas e em especial para o câncer cervical no nosso estudo, o que levanta a possibilidade de sua aplicação na triagem de populações com alta prevalência do HPV, e em populações de alto risco para o câncer cervical, como as da Amazônia brasileira. Da mesma forma, acredita-se que haveria uma redução significativa de colposcopias desnecessárias para estas mulheres, recurso este que encontra-se ausente na maioria dos municípios do estado do Amazonas.

No entanto, o teste apresentou sensibilidade razoável. Em um dos casos de carcinoma invasor o teste Onco E6TM não testou positivo, uma das possíveis explicações seria o caso de estar associado a outro tipo de HPV que não seja o 16 ou 18. O teste Cervical Onco E6TM tem como alvo apenas HPV16 e 18. Outros tipos adicionais de HPV são esperados para um aumento da sensibilidade, sem impacto significativo na especificidade, uma vez que se espera que a alta expressão de E6 seja uma característica de lesões pré-cancerígenas de qualquer tipo viral, em vez de apenas infecção.

Um dos pontos negativos do estudo, foi que apenas as mulheres positivas para o DNA do HPV é que foram recrutadas para o exame citopatológico. Isso impediu que fosse calculada a sensibilidade da PCR para a detecção do câncer cervical.

Zhao *et al.* (2013), ao realizar um estudo com 7.543 mulheres com idades de 25-65 anos, de áreas predominantemente rurais da China, observou-se que o percentual da Oncoproteína E6 positivo aumentou de forma constante com o aumento da gravidade do diagnóstico: 0,8% para negativa ou nenhuma alteração histológica, 8,5% para NIC I, 17,8% para NIC II, 48,8% para CIN3, e 84,6% para câncer cervical.

Um estudo-piloto realizado por Schweizer *et al.* (2010) com amostra de esfregaços cervicais usando o teste AV Advantage HPV E6 para o HPV tipo 16,18, e / ou 45, demonstrou que a detecção da oncoproteína E6 nos esfregaços cervicais é viável e potencialmente mais específico para NIC3+ do que a detecção do DNA do HPV para os mesmos genótipos de HPV.

Sellers *et al.* (2011), realizaram um estudo com 2.530 mulheres rastreadas na faixa etária de 30 a 54 anos em Shanxi, na China. Os resultados deste estudo demonstraram que a expressão da oncoproteína E6 está associada com o grau de mudança neoplásica visto na histologia do colo do útero da mulher. A prevalência de detecção da Oncoproteína E6 aumenta de forma significativa de 12,5%, 36,4% e 42,9% entre as mulheres com NIC I, II e III respectivamente.

Um estudo de base populacional com mulheres que vivem na China, o teste Onco E6 para detecção do HPV16/18/45 apresentou uma sensibilidade de 50% para NIC3+, e as mulheres que testaram positivo apresentam alto risco de ter NIC2, NIC3 ou câncer. (QIAO *et al.*, 2013).

Quanto a infecção pelo HPV, a prevalência da positividade do DNA HPV na população estudada foi de 18,7% (n=77) para qualquer tipo de genótipo, semelhante ao encontrado por Pinto, Fuzii e Quaresma (2011) num estudo feito com 444 mulheres do estado do Pará, onde 14,6% das participantes apresentavam infecção genital pelo HPV.

A prevalência da infecção pelo HPV encontrada no estudo corroboram com o estudo de Oliveria *et al.*, (2013) com amostras de células cervicais de 302 mulheres gestantes atendidas nos Ambulatórios de Ginecologia e Obstetrícia e em Unidades Básicas de Saúde do Rio Grande do Sul. Foi observada uma prevalência do HPV de 18,2% (55 pacientes) do total de mulheres que participaram no estudo.

A prevalência mundial da infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) em mulheres sem anormalidade cervical é de 11-12%. As variações nas taxas de infecção variam de acordo com região, se mostrando com taxas mais elevadas na África Subsaariana (24%), Europa Oriental (21%) e na América Latina (16%) (AYRES e SILVA, 2010; FORMAN *et al.*, 2012).

Foi encontrado resultado semelhante com mulheres da área rural da China, uma prevalência de 14% a 18% (ZHAO *et al.*, 2013). Estudo realizado com amostras de 49 mulheres nativas do noroeste de Ontário/Canadá, utilizando como técnica a autocoleta, a prevalência geral da infecção pelo HPV foi de 28,6% (ZEHBE *et al.*, 2011).

Esta prevalência pode ser considerada elevada quando comparada ao estudo de Ayres e Silva (2010), para analisar a prevalência de infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) em mulheres no Brasil, onde a prevalência da infecção pelo HPV variou de 13,7% a 54,3%.

Num estudo realizado no ambulatório de Ginecologia de um Hospital Universitário de Santa Catarina (UFSC) foram avaliadas amostras cervicais 100 mulheres que procuraram atendimento médico. O DNA do HPV foi encontrado em 21% das mulheres (RAMA *et al.*, 2008).

Um estudo feito por Sales (2015), na cidade de Manaus, com 643 mulheres que procuraram o serviço de saúde para rastreamento do câncer do colo do útero, a prevalência da infecção pelo HPV encontrada pelo método de PCR em tempo real foi de 16%, abaixo do percentual encontrado nesse estudo.

Comparando-se a prevalência de infecção por HPV em mulheres moradoras da área rural de Coari (18,7%) com as prevalências encontradas em outros estudos brasileiros cuja amostra se assemelha ainda mais à deste estudo, encontramos alguns números aproximados aos do atual estudo ou inferiores: 29,1% em mulheres da área urbana de Coari (ROCHA *et al.*,

2013), 21 % em São Paulo (RAMA *et al.*, 2008), de 19.2% a 34.1% em mulheres de dois distritos indígenas do estado de Roraima (FONSECA *et al.*, 2015).

Quanto às características sócioeconômicas e comportamentais de risco para o HPV das mulheres estudadas, observou-se que a idade das mulheres variou de 18 a 81 anos, com uma média de $34 \pm 15,3$ anos. De acordo com os dados houve significância estatística entre a idade e a infecção por HPV ($p=0,02$), o que está em acordo com a literatura sobre o assunto, e corresponde à faixa etária de maior prevalência da infecção genital pelo HPV. Observou-se que mulheres abaixo dos 34 anos de idade apresentam maior risco de apresentarem infecção pelo HPV do que mulheres acima dessa faixa.

Alguns estudos de prevalência da infecção pelo HPV realizados no Brasil em amostras semelhantes ao atual estudo incluíram mulheres numa ampla faixa etária, como o estudo de Rocha *et al.* (2013), que incluiu mulheres da área urbana de Coari/AM, que procuraram o serviço de saúde para rastreamento do câncer do colo do útero, compreendendo idades entre 18 a 78 anos, e uma média de $36,4 \pm 13,4$ anos. Observa-se características semelhantes ao estudo de Fonseca *et al.* (2015) com 664 mulheres de 13 aldeias indígenas, pertencentes ao estado de Roraima, cuja abrangência foi de idades entre 12 a 92 anos com uma média de $35,8 (\pm 14,5)$ anos.

Um estudo feito por Sales (2015) na cidade de Manaus com mulheres que procuraram o serviço de saúde para o rastreamento do câncer do colo do útero, observou-se que mulheres com idade abaixo de 30 anos apresentam 3,6 vezes mais chance de estarem infectadas pelo HPV, entretanto esse risco de infecção por HPV vai diminuindo entre as mulheres com idade mais avançada.

Um estudo feito por Oliveria *et al.*, (2013) com amostras de células cervicais de 302 mulheres gestantes atendidas nos Ambulatórios de Ginecologia e Obstetrícia e em Unidades Básicas de Saúde do Rio Grande do Sul, observaram que pacientes com idades iguais ou inferiores a 20 anos apresentaram maior prevalência da infecção pelo HPV quando comparadas aquelas de maior idade ($p=0,002$).

Apesar da população de adolescentes ser considerada de maior risco para portar o HPV, os exames de rastreio neste grupo são menos frequentes do que entre as mulheres adultas. Por isto, sugere-se direcionar projetos de educação em saúde neste grupo para se divulgar não só a importância e a finalidade do exame citopatológico, mas também o uso de preservativos e o controle dos parceiros sexuais, relacionando tais condutas a prevenção do câncer do colo uterino.

A maioria (53,4%) das mulheres apresentava escolaridade inferior a 8 anos. A escolaridade pode ser um indicador da classe socioeconômica dessas mulheres, o que sugeriria que elas pertencessem a classes menos favorecidas, por morarem em lugares de difícil acesso ao serviço de saúde e a educação. No entanto, neste estudo não houve associação e significância estatísticas entre a escolaridade e a infecção pelo HPV. As mulheres que diziam ter estudado até o ensino primário, observou-se que sabiam apenas assinar seu nome, e com dificuldades.

Quando perguntadas sobre o conhecimento a cerca do HPV, muitas responderam que nunca ouviram falar do assunto, e outras se confundindo até com o vírus do HIV (“Já ouvi falar sim, já até tiraram o meu sangue quando eu tava grávida pra vê se eu tinha, mas não deu nada”).

Isto é um fator preocupante, pois mostra pouca ou nenhuma informação destas mulheres em relação a associação do HPV com o câncer do colo do útero. O baixo nível de escolaridade está associado ao pouco acesso aos serviços de educação, fator esse evidenciado pela falta de conhecimento em relação à infecção pelo HPV e outras DST's.

A baixa escolaridade é uma característica encontrada com maior frequência nos países subdesenvolvidos e associada as elevadas taxas de infecções pelo HPV. Na Itália, num estudo feito por Marcellusi *et al.*, (2015) foi encontrado resultado divergente, pois o alto nível de escolaridade foi associado com um efeito estatisticamente significativo de protecção para a infecção pelo HPV ($P = 0,001$).

Apesar do vínculo indissolúvel entre a atividade sexual e o câncer cervical, o rastreio do colo do útero e a promoção da saúde sexual ainda parecem estar desarticuladas, e o papel de uma infecção sexualmente transmissível levando ao desenvolvimento do câncer cervical

não está sendo suficientemente enfatizada nas campanhas de promoção a saúde a estas mulheres.

Quanto ao número de filhos, as participantes apresentaram uma média de $4 \pm 3,9$ filhos. Porém, a paridade no presente estudo não mostrou associação e nem significância estatística com a infecção pelo HPV. No entanto, no estudo caso-controle feito por Zhang *et al.* (2013) com mulheres da área rural da China, ter mais de três ou três filhos apresentou associação e diferença significativa ($p=0,05$) para se ter câncer do colo do útero. Para Bosch *et al.* (2002), a alta paridade é um fator consistente para o câncer cervical em mulheres que possuem DNA do HPV. O fator de risco dobra nas que tiveram 4 filhos, quando comparado com as que tiveram 1 ou nenhum.

Um estudo feito por Oliveria *et al.*, (2013) com amostras de células cervicais de 302 mulheres gestantes atendidas nos Ambulatórios de Ginecologia e Obstetrícia e em Unidades Básicas de Saúde do Rio Grande do Sul, a multiparidade constitui-se fator de proteção para a infecção pelo HPV ($p=0,01$).

A maioria dos participantes tinha iniciado atividade sexual antes dos 16 anos (75%). A idade da primeira relação sexual variou de 11 a 21 anos, com uma média de $15 \pm 1,8$ anos. As mulheres que tiveram o início da atividade sexual aos quinze anos ou mais, apresentaram maior prevalência de infecção pelo HPV, no entanto, tais associações não apresentaram significância estatística para o estudo.

No estudo de Oliveria *et al.*, (2013) observou-se associação significativa entre o início precoce da vida sexual (idade ≤ 17 anos) com a infecção pelo HPV ($p=0,04$).

Para Widdice e Moscicki (2008), a infecção pelo HPV ocorre logo após a iniciação sexual, enfatizando a importância da relação sexual na transmissão. Mulheres que começam a ter relações sexuais antes dos 16 anos são mais vulneráveis à infecção pelo HPV, porque durante a puberdade o colo do útero sofre alterações celulares na zona de transformação que são conhecidas como ectopia, ficando mais propensas a infecção persistente pelo HPV e para outras infecções (CASTLE *et al.*, 2006).

Estudo feito com 198 mulheres de uma clínica especializada em Goiânia com um esfregaço cervical anormal, observou-se que ter relações sexuais com idade precoce antes dos 16 anos aumenta o risco de ter HPV de alto risco (RIBEIRO *et al.*, 2015)

Em relação ao comportamento sexual das mulheres participantes do estudo, 66,2% relatou apresentar mais de um parceiro sexual ao longo da vida. Evidências significativas entre a associação do número de parceiros sexuais e a infecção pelo HPV foram apontadas na análise realizada ($p=0,02$). Esses dados demonstram que quanto maior o número de parceiros sexuais, maior o risco de ser infectada pelo HPV. Semelhante a estes dados foi encontrado no estudo de Ezechi *et al.* (2014) em mulheres nigerianas. De acordo com Widdice & Moscicki (2008), o risco de infecção também aumenta com cada novo parceiro sexual, destacando a facilidade da via de transmissão durante o ato sexual.

Estudos têm mostrado consistentemente um risco aumentado da positividade do HPV genital masculino com o comportamento sexual, o que poderia levar a um risco aumentado de câncer cervical em suas parceiras (ALMONTE *et al.*, 2008).

Das mulheres infectadas pelo HPV, 67,5% relataram ter o hábito de usar preservativos com o seu parceiro. O hábito de usar o preservativo pela maioria das mulheres foi analisado também como fator de proteção e não de risco para se ter infecção pelo HPV (IC: 0,3-0,9). Também no estudo realizado por Tran *et al.* (2015) com 1550 mulheres do Vietnã que realizaram rastreio para o câncer do colo do útero, não fazer uso do preservativo mostrou associação e significância com a infecção pelo HPV.

Em relação à infecção atual, 75 mulheres (97,4%) negaram ter apresentado ou apresentarem alguma DST no momento da abordagem. Esses dados mostraram que não houve associação e nem significância estatística entre a infecção pelo HPV e DST prévia. Já no estudo de Castellsague *et al.* (2014), ao analisarem os fatores de risco de 982 mulheres de uma multinacional, apenas a história de DST foi associada como maior risco para a infecção por HPV.

Um estudo realizado com 515 mulheres da Nigéria positivas para HIV com objetivo de verificar a prevalência do HPV de alto risco (HPVhr), observou-se que a prevalência de

HPVhr foi maior em mulheres HIV positivo (24,5%) do que em mulheres HIV negativas (15,9%) (OR = 1,7; IC 95%: 1,1-2,7), e que ter uma DST aumenta o risco para a persistência viral no colo do útero levando a possíveis transformações das células infectadas em lesões pré-cancerosas ou até mesmo o próprio câncer (EZECHI *et al.*, 2014).

O perfil sociodemográfico observado da população incluída no estudo atual é típico das populações africanas e de outros países subdesenvolvidos atendidos pelos serviços de saúde, onde a cobertura do câncer do colo do útero ainda se encontra com limitações (CATARINO *et al.*, 2015; EZECHI *et al.*, 2014).

Quanto ao exame citopatológico, observou-se que as 77 mulheres com HPV positivo foram recrutadas. Porém, cerca de 55 (71,4%) mulheres compareceram a Policlínica em Coari para a coleta da citologia em meio líquido por profissionais treinados. O resultado obtido das amostras foi satisfatório perfazendo um percentual de adequabilidade das amostras de 100%. O percentual aceito de lâminas insatisfatórias de acordo com o Ministério da Saúde é de até 5% (BRASIL, 2014a).

A qualidade do exame citopatológico (Papanicolaou) é condição fundamental para a garantia do programa de rastreamento. O indicador de percentual de amostras insatisfatórias é utilizado para avaliar a qualidade da coleta e do preparo das lâminas, tanto na unidade de coleta como no laboratório (BRASIL, 2014a). Os dados do estudo sugerem que tanto a coleta quanto o preparo e a leitura das lâminas foram de boa qualidade.

Destas 55 amostras satisfatórias, 41 (74,5%) delas apresentaram achados citológicos compatíveis com normalidade, e 14 (25,5%) apresentaram achados alterados. O percentual de casos alterados no presente estudo encontra-se dentro do percentual de positividade de exames citopatológicos estipulado pelo Ministério da Saúde, que seria maior ou igual a 3% (BRASIL, 2014a).

O percentual de alterações citopatológicas encontradas foi de 50% para ASCUS (7/14), 35,7% LSIL (5/14) e 14,3% HSIL (2/14). Os dados do nosso estudo convergem com os dados do relatório técnico do INCA, onde a proporção de exames compatíveis com atípias

de significado indeterminado em células escamosas (ASCUS) entre exames citopatológicos alterados, deve ser menor que 60% (BRASIL, 2014a).

Num estudo feito por (VIEIRA *et al.*, 2015), com 265 amostras de estudantes universitárias de Belém no Pará, um alto grau de lesões intraepiteliais escamosas (HSIL) foram encontradas em seis amostras (2,3%), e lesões de baixo grau (LSIL) em 17 (6,4%), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) em 14 (5,3%), e células escamosas atípicas, não se pode excluir HSIL (ASC-H) em um (0,4%). As outras 227 amostras analisadas neste estudo apresentaram citologia normal (85,7%).

Quanto ao total de exames citopatológicos realizados das 412 mulheres, obteve-se os seguintes percentuais: 1,6% ASCUS, 1,2% para LSIL, 0,48% HSIL. De acordo com o relatório técnico do INCA, a proporção de exames compatíveis com atipias de significado indeterminado em células escamosas (ASC) entre exames citopatológicos do colo do útero deve ser menor que 5%, o que se mostra em concordância com os dados do nosso estudo. No entanto, a proporção de resultados de Lesão intra-epitelial escamosa de algo grau (HSIL) entre exames citopatológicos do colo do útero, deve ser menor ou igual a 0,4%. No nosso estudo, os dados se encontram acima do que é preconizado pelo INCA, pois detectou-se 0,48% de HSIL (BRASIL, 2014a).

A proporção de exames alterados se assemelham ao estudo realizado por Fonseca *et al.* (2015), com mulheres indígenas do Distrito Yanomami e Distrito Oeste do estado de Roraima, onde os 10 casos considerados alterados observou-se as seguintes proporções: ASCUS (1.6%), 7 casos de LSIL (1.15%), 2 casos de HSIL (0.33%) e 1 case de carcinoma invasor (0.17%).

Entre as mulheres arroladas no estudo quando perguntadas sobre a frequência da realização do exame preventivo, a grande maioria relatou realizar o exame uma vez ao ano. Esta frequência foi observada na maioria das mulheres do estudo que recebem o “Bolsa Família”, um programa governamental para famílias que vivem em condições de miséria no Brasil, que condiciona o benefício às exigências impostas como: calendário de vacina dos

filhos em dias, manter seus filhos na escola, realização do exame preventivo anualmente, e outras condicionantes.

No Brasil, os programas de rastreio da população com base no câncer cervical não foram implementados de forma organizada, e não apresentam um sistema universal para alcançar todas as mulheres (LORENZI, SYRJANEN e LONGATTO-FILHO, 2015). Os programas de rastreio predominantemente oportunistas (ao contrário de programas sistemáticos e organizados) que fornecem uma cobertura limitada geram vários exames para a mesma mulher, e tendem a negligenciar as mulheres que não se beneficiariam ainda com o exame (NAVARRO *et al.*, 2015).

Ainda no presente estudo, das 412 mulheres abordadas observou-se que um percentual de 26,7% (110) mulheres nunca haviam realizado o exame preventivo. Dentre os motivos mais citados foi o difícil acesso aos serviços de saúde. O difícil acesso aos serviços de saúde é uma característica de regiões com baixo nível de escolaridade e de baixa renda, características estas observadas nas mulheres arroladas no estudo.

Oliveria *et al.*, (2013) realizaram um estudo com 302 mulheres gestantes atendidas nos Ambulatórios de Ginecologia e Obstetrícia e em Unidades Básicas de Saúde do Rio Grande do Sul. Observou-se que a infecção pelo HPV foi significativamente mais frequente em mulheres que relataram não terem feito o exame citopatológico. Apesar dos benefícios do exame citopatológico ser conhecido, a cobertura deste exame ainda é baixa no estado do Amazonas. A sua realização periódica seria a melhor estratégia para o rastreamento do câncer cervical.

O estado do Amazonas apresenta cerca de 725.181 mulheres pertencentes a área rural. Extrapolando o mesmo percentual de mulheres não atingidas no rastreio encontrado neste estudo à população de mulheres de áreas rurais do Estado do Amazonas, este número equivaleria a cerca de 188.547,06 (26%) mulheres desta população nunca realizaram o exame preventivo por viverem em situações de difícil acesso, e apresentando características semelhantes ou iguais as observadas no nosso estudo como: baixa escolaridade, renda inferior a menos de um salário mínimo, pouca ou nenhuma informação a respeito da importância da

realização do exame preventivo, da associação do HPV oncogênico com o desenvolvimento de neoplasias cervicais.

Considerando que a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma cobertura populacional de aproximadamente 80% para controlar a morbidade e a mortalidade por câncer do colo do útero em uma região, as evidências sugerem que falhas em outras etapas da estratégia preventiva estejam implicadas no sucesso parcial do programa preventivo no estado do Amazonas e em outras regiões do país (BRASIL, 2014c; LORENZI, SYRJANEN e LONGATTO-FILHO, 2015).

No último censo do IBGE feito em 2010, a população feminina do Amazonas dos 25 aos 64 anos era de 737.428 mulheres. O número de exames realizados no ano de 2014 segundo os dados do SISCOLO foi de 161.496 exames citopatológicos. Ao utilizar esses dados para se calcular a razão de exames nesse ano obtêm-se 0,21% de cobertura, ou seja, a cobertura realizada neste ano de 2014 em relação a população de rastreamento foi de 21%, mostrando que a cobertura do nosso Estado ainda está muito abaixo do preconizado pelo Ministério da Saúde, que é de 80% (BRASIL, 2014c)

Um estudo com base em inquérito domiciliar realizado por Navarro *et al.* (2015), com mulheres entre 25 a 59 anos do município de Boa Vista-RR, mais de 20,0% das mulheres que aderiram à estratégia de rastreamento, foram submetidas a testes por razões oportunistas (gravidez, consulta médica ou reclamações particularmente, ginecológicas), e quando elas apresentavam queixas, como coceira e leucorréia, procuram atendimento médico e eram aconselhadas a realizar o exame.

Nesse estudo, todas as 55 mulheres foram recrutadas para a realização da colposcopia, e quando necessário biópsia dirigida, porém apenas 47 compareceram. A recomendação do Ministério da Saúde, é que sejam encaminhadas ao exame colposcópico apenas as mulheres que apresentarem alterações no exame citopatológico do tipo ASC-H e HSIL.

Das 14 alterações presentes, 11 foram positivas no teste molecular Papillocheck®. É importante ressaltar, que somente eram recrutadas para a citologia as mulheres que fosse HPV positivo na PCR PGMV. Das 07 alterações citológicas do tipo ASCUS, 4 (36,4%) possuíam

positividade para o HPV, compreendendo os genótipos 16, 31, 42 e 58. O fato de nem todas as pacientes com ASCUS exibirem infecção pelo HPV é plausível, devido a esta classificação estar mais relacionada à presença de alterações morfológicas do tipo reparativas, e não neoplásicas, sendo a maioria reversível.

Todos os 5 (45,5%) casos de LSIL apresentaram positividade para HPV, sendo identificados os genótipos HPV 16, 18, 51, 31, 43, 66 e 82. Das 2 mulheres com HSIL, 2 (18,1%) apresentaram positividade para HPV, incluindo os genótipos 16 e 18. Analisando o HPV 16 observa-se uma maior prevalência e uma forte associação com amostras alteradas do exame citopatológico.

Os dados do estudo se aproximam dos encontrados por Dickson *et al.*, (2014), em mulheres compreendendo idades entre 31-65 anos, dos Estados Unidos. Mulheres que apresentaram a infecção múltipla pelo HPV incluindo o HPV 16, foram mais propensas a ter citologia anormal, com um maior risco associado a alteração citopatológica do tipo HSIL (OR 2,98; IC:1,57-5,64).

Bruno *et al* (2014) realizaram um estudo retrospectivo com 351 prontuários de mulheres com genotipagem positiva pelo teste PapilloCheck® na cidade de Salvador, Bahia. Foi observado que a proporção do HPV 16 aumentou com a severidade das anormalidades cito-histopatológicas associadas: de 13,8% (12/87) nas lesões de baixo grau para 42,4% (14/33) nas lesões de alto grau. Entre as mulheres com HSIL, o HPV 16 foi o mais frequente, 42,4% (IC95% 25,5–60,8), seguido do HPV 56 em 18,2% (IC 95% 6,9–35,5).

Rocha *et al.*, (2013), realizaram um estudo com mulheres da área urbana do município de Coari que procuraram o serviço de saúde para realização do exame preventivo. Observou-se que dentre os 7 casos de mulheres com alterações citológicas, foram encontrados 5 casos (70%) de infecção pelo HPV, sendo 3 casos de HPV 16 (2 em pacientes com ASCUS e 1 em uma paciente com HSIL), 1 caso de HPV 58 em pacientes com ASCUS e 1 caso de HPV 33 em paciente com LSIL, sendo encontrado uma prevalência de 31,8% de infecção pelo HPV 16.

Os dados referentes às mulheres com resultado colposcópico, das 56 colposcopias realizadas no estudo, 47 (83,9%) delas apresentaram achados normais e 9 (16,1%) achados alterados. Todos os casos alterados foram submetidos à biópsia dirigida para exame histopatológico. A colposcopia subsequente ao resultado citopatológico é a melhor forma de identificar as atipias que correspondem a neoplasias de alto grau e as separar daquelas que não apresentam alterações intraepiteliais (BRASIL, 2014b).

Entre os nove achados histopatológicos houve 5 casos de NIC I, 2 NICIII, 2 Carcinoma invasor. Os dois casos de carcinoma invasor foram acompanhados e tratados na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas. Para a efetividade do programa de controle do câncer do colo do útero, faz-se necessário garantir a organização, a integralidade e a qualidade dos serviços e ações da linha de cuidado, bem como o tratamento e o seguimento das pacientes (BRASIL, 2014b).

Neste estudo, utilizando-se da proporcionalidade, a taxa bruta de incidência do carcinoma invasor na população de estudo foi de aproximadamente 486/100.000 mulheres. Este dado apresenta um impacto social e humano para o estado do Amazonas, quando comparado aos dados do INCA (2014). Configurando-se como um importante problema de saúde pública, segundo as últimas estimativas mundiais para o ano de 2012, o câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com 527 mil casos novos. Sua incidência é maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos.

Ainda neste estudo, observou-se que, das 14 mulheres com resultados citopatológicos classificados como ASCUS/LSIL e HSIL, apenas 04 (28,6%) foram submetidas à biópsia dirigida por um profissional médico treinado. Das 04 (2=LSIL, 2=HSIL) biópsias, 01 dos casos de LSIL (HPV 51) apresentou diagnóstico de NIC I e o outro caso (HPV 16) confirmou NIC III. Já para os dois casos de HSIL, 01 caso (HPV 18) apresentou diagnóstico de NIC I e o outro caso (HPV 16) confirmou carcinoma invasor.

Os dados do estudo sugerem que, entre as mulheres que não realizaram a colposcopia, algumas poderiam apresentar um diagnóstico alterado no exame histopatológico, destacando

assim um possível atraso no diagnóstico. Para Brito-Silva *et al.* (2014), o diagnóstico tardio dificulta o acesso aos serviços e revela, sobretudo, carência na quantidade e qualidade de serviços oncológicos.

Fonseca *et al.* (2014) realizaram um estudo com 100 amostras de mulheres do estado de Roraima para avaliar a acurácia da citologia cervicovaginal. Os resultados deste estudo sugerem que uma elevada proporção de mulheres portadoras de lesão intraepitelial cervical, rastreadas na rede SUS do Estado de Roraima para o CCU, recebem resultados citológicos falsos negativos, privando-as de acompanhamento especializado quando ainda assintomáticas e/ou com doença inicial.

No presente estudo, mulheres que apresentaram diagnóstico de LSIL na citologia e que são positivas para o HPV de alto risco apresentam o mesmo risco de apresentar NIC3+ no histopatológico. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Guido (2014), onde mulheres que têm um diagnóstico de LSIL apresentam o mesmo risco de desenvolver CIN2 + como as mulheres que apresentaram resultado citopatológico de ASCUS e que são HPV positivos.

Das nove alterações encontradas no histopatológico, 6 (75%) apresentaram positividade para o genótipo do HPV pela técnica do Papillocheck®, e em 2 (25%) amostras o resultado foi negativo (25%). Em uma das amostras não foi realizado o teste, pois apresentou resultado anterior negativo na PCR PGMY09/11. Este dado nos permite sugerir que talvez fatores como hipocelularidade, problemas no processamento e análise da amostra podem ter implicado na detecção deste caso de NIC III na PCR PGMY09/11.

Houve associação significativa entre a presença de lesão cito-histopatológica de baixo ou alto grau e os genótipos de alto risco, HPV 16, HPV 18 e HPV 51. Observa-se no estudo que a proporção do HPV de alto risco aumentou com a severidade das anormalidades cito-histopatológicas associadas.

Vieira e Almeida *et al.*, (2013) realizaram um estudo com 994 mulheres que participaram do rastreio para o câncer cervical em Portugal. A maioria (28%) das lesões encontradas na citologia apresentou infecção para o HPV.

Num estudo realizado na cidade de Manaus, na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) com 122 mulheres diagnosticadas com lesão pré-malignas ou malignas do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor ou Adenocarcinoma, foi encontrado 100% de positividade para o HPV nos casos de adenocarcinoma, carcinoma invasor e LSIL e 93% nos casos de HSIL . Os dados do estudo mostraram forte associação da infecção pelo HPV com o câncer cervical (FERREIRA, 2007).

Num estudo feito por Entiauspe *et al.* (2014), com 251 mulheres que procuram atendimento ginecológico na clínica ginecológica ambulatorial da Universidade Federal de Pelotas, a infecção por qualquer tipo de HPV se mostrou presente em 2,1% dos casos de NIC I e 0,4% nos casos de NIC II, com uma alta prevalência (29,9%) de genótipos de HPV oncogênicos.

Alguns fatores de risco relacionados às alterações histopatológicas foram analisados (idade, escolaridade, número de filhos, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, número de abortos, uso do preservativo, frequência da realização do exame preventivo e infecção prévia por DST's). Porém, nenhuma das variáveis mostrou diferença estatisticamente significativa para as alterações histopatológicas.

Quanto a genotipagem pela técnica do PapiloCheck®, das 79 amostras analisadas, o HPV foi detectado em 46 (58,2%). Quatorze (17,7%) amostras foram consideradas negativas e 19 (24,67%) foram consideradas inválidas devido à ausência da amplificação do gene ADAT1. O percentual encontrado de positividade para o HPV está acima do encontrado no estudo feito por Vieira e Almeida *et al.* (2013) com 994 mulheres que participaram do rastreio para o câncer cervical em Portugal, onde a positividade para o HPV foi de 28% das amostras utilizando a técnica pelo Papillocheck®.

Serravalle *et al.*, (2015), realizaram um estudo utilizando a mesma técnica com 88 mulheres da cidade de Salvador-Bahia com diagnóstico citopatológico de LIAG. Das 41 amostras analisadas, o HPV foi detectado em 35 (85,4%). Cinco amostras (12,2%) foram consideradas inválidas devido à ausência da amplificação do gene ADAT1 e 1 (2,4%) foi negativa para HPV.

O teste apresentou uma taxa de 19% de detecção para os genótipos oncogênicos do HPV em infecções múltiplas e 39,2% para infecções únicas. Os dados corroboram com os achados no estudo feito por Sales (2015), na cidade de Manaus, com 643 mulheres que procuraram o serviço de saúde para rastreamento do câncer do colo do útero. Dentre as 103 amostras positivas para HPV foi encontrado 76,7% de infecções únicas por HPV e 23,3% de infecções múltiplas.

Para Dickson *et al.*, (2014), num estudo feito com mulheres de várias regiões do Estados Unidos para determinar as taxas de infecção única e múltipla pelo HPV, 329 (4,0%) mulheres foram positivas para dois ou mais tipos de HPV. Foi observado no estudo que mulheres com infecções múltiplas pelo HPV eram mais propensas a ter citologia anormal, com uma maior associação da infecção com HSIL.

Mendonça *et al.*, (2010), realizaram um estudo caso-controle com mulheres apresentando positividade para o HPV atendidas em serviço de Ginecologia de referência vinculado ao SUS, em Recife, Nordeste do Brasil. Foi observado taxas semelhantes de infecções únicas (35,2%) e múltiplas (36,9%) pelo HPV respectivamente.

Os genótipos mais prevalentes detectados pela técnica PapilloCheck foram: O HPV 51(1,94%), HPV 16 (1,7%), HPV 53 (1,2%) e HPV 18 (1%). Neste estudo, o HPV 18 aparece entre os menos frequentes, discordando da literatura, que o descreve como o segundo genótipo mais encontrado. Diversos autores demonstram que os tipos mais comuns de HPVs oncogênicos que infectam o colo uterino são: HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31, 33 e HPV 35 (BERTHET *et al.*, 2014; BRUNI *et al.*, 2010; HEARD *et al.*, 2013; SERRAVALLE *et al.*, 2015).

Em estudo recente de metanálise com amostras de mulheres apresentando citologias normais, provenientes de cinco continentes, o HPV 16 foi detectado em 22,5% das mulheres HPV positivas. O segundo genótipo mais comum na prevalência mundial foi o HPV 18, porém com algumas variações geográficas. O HPV 31 foi mais comum na Europa, enquanto o HPV 52 foi mais frequente na América do Norte, África e Ásia, e o HPV 58 foi o mais encontrado na América Latina (BRUNI *et al.*, 2010) .

A identificação do HPV 51 e de outros genótipos oncogênicos associados ao câncer cervical em diferentes regiões, pode sugerir uma necessidade de cobertura de um determinado tipo de HPV que não está presente nas vacinas e também nos testes de rastreio para o DNA do HPV. Uma das vantagens da técnica é a identificação do HPV de alto risco, bem como a detecção de múltiplas infecções.

Argyri *et al.*, (2013) realizaram um estudo transversal em Atenas, compreendendo 3.177 mulheres brancas entre 14 e 70 anos de idade que procuraram o Ambulatório de Oncologia Ginecológica para realização do exame preventivo, o HPV 16 foi o tipo mais comum de HPV de alto risco presente com uma prevalência de 6,7%, seguido do HPV 51 (5,7%), HPV 53 (3,8%), HPV 56 (3,4%) e HPV 31 (2,5%).

Bruno *et al.*, (2014) realizaram um estudo retrospectivo com 351 prontuários de mulheres com genotipagem positiva pelo teste PapilloCheck® na cidade de Salvador, Bahia. O genótipo de alto risco mais frequente foi o HPV 16 (18,5%), HPV 56 (14%) e o HPV 39 (13,4%). O HPV 18 (5,4%) esteve entre os tipos menos frequentes.

Rocha *et al.*, (2013), ao realizar um estudo com 361 mulheres sexualmente ativas da área urbana do município de Coari-AM, os genótipos mais frequentes foram HPV 16 (58,1%) e HPV 58 (20%).

Das 9 alterações histopatológicas foi encontrado uma maior frequência do HPV 16 (22,2%). Um estudo realizado por Serravalle *et al.* (2015) foi encontrada uma frequência do HPV 16 de 45% pelo PapilloCheck®, taxas bem acima das encontradas no presente estudo. De acordo com estudos realizados em todo o mundo, inclusive no Brasil, o HPV 16 é o genótipo mais frequentemente encontrado, embora haja uma variação importante em relação à frequência de infecção por outros tipos (BRUNO *et al.*, 2014; DICKSON *et al.*, 2014; HEARD *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2013; SERRAVALLE *et al.*, 2015).

Heard *et al.*, (2013), realizaram um estudo utilizando a mesma técnica com amostras residuais de citologia cervical (N = 6.538) provenientes de 16 locais que participaram de programas organizados de rastreio do cancro do colo do útero na França. Foi observado que o HPV16 foi fortemente associado com lesões pré-cancerosas e com o câncer do colo do útero

e, que as altas taxas de prevalência de infecção pelo HPV16/18 foi encontrada entre as mulheres com HSIL e abaixo dos 30 anos de idade.

Analisando a concordância entre o teste pela técnica do Papillocheck® e a PCR PGMY09/11 observou-se que das 79 amostras, 46 (58,2%) foram positivas, 14 (17,7%) foram discordantes: positiva na PCR PGMY09/11 e negativa no PapilloCheck® e 19 (22,07%) amostras foram inválidas. Os testes apresentaram uma concordância de 80% para a detecção do HPV. As amostras inválidas por falha no controle justifica-se pela ausência do gene humano DAT1 (adenosina deaminase 1). O gene humano ADAT₁ (adenosina deaminase 1) é amplificado simultaneamente como controle interno com a finalidade de verificar a qualidade do DNA e a presença de inibidores de PCR (DALSTEIN *et al.*, 2009; SERRAVALLE *et al.*, 2015).

A detecção do HPV pelas técnicas de genotipagem é importante para o prognóstico das lesões epiteliais no colo uterino e são cruciais para avaliar os fatores associados à regressão, progressão e persistência da infecção pelo HPV cervical, bem como identificar os grupos de alto risco e a susceptibilidade de infecção para o desenvolvimento da prevenção e estratégias de controle (BERTHET *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

A estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta seguido de teste rápido para HPV (Onco E6™) mostrou-se como um algoritmo aplicável e possível de ser utilizado em áreas remotas e de difícil acesso como em mulheres ribeirinhas. A sensibilidade do Onco E6™ realizado a partir de amostras autocoletadas para detecção de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 ou lesão mais severa (NIC3+) foi de 50%. A especificidade para NIC3+ foi de 40% e para qualquer NIC 60%. A concordância entre o teste Onco E6™ e o exame citopatológico foi de 80%. A detecção da Oncoproteína E6 é útil para identificar mulheres que possuem lesões pré cancerosas assim como as que possuem câncer invasor causado por HPV's do tipo 16 ou 18.

As mulheres de comunidades ribeirinhas estudadas apresentaram uma média de idade de $34 \pm 15,3$ anos, baixa escolaridade, renda inferior a um salário mínimo. A maioria vive em união estável, com média de $4 \pm 3,9$ filhos, média de idade da primeira relação $15 \pm 1,8$ anos. Apresentam mais de um parceiro sexual ao longo da vida, a maioria (67,5%) usa preservativo com o seu parceiro e 97,4% negou ter apresentado ou estarem apresentando alguma DST. As variáveis idade e o número de parceiros sexuais ao longo da vida mostraram associação estatisticamente significativa com a infecção pelo HPV.

A autocoleta com a escova Rovers® Evalyn® foi uma ferramenta aceita em 97,8% das mulheres entrevistadas e considerada fácil por 95,4% das participantes. Das mulheres estudadas, 79,3% preferiram a autocoleta, 15,6% consideraram indiferentes (sem preferência) e 5,1% preferiram a coleta por um profissional de saúde.

A expressão da oncoproteína E6 foi observada em 06 (1,4%) casos das amostras cérvico-vaginais autocoletadas.

A prevalência da positividade do DNA HPV na população estudada foi de 18,7% (n=77) para qualquer tipo de genótipo.

Os genótipos mais prevalentes detectados pelas técnicas de PCR em tempo Real e PapilloCheck® foram: O HPV 51(1,94%), HPV 16 (1,7%), HPV 53 (1,2%) e HPV 18 (1%).

Das 5 mulheres positivas no teste Onco E6™ que compareceram ao exame citopatológico, 4 (28,57%) apresentaram alterações citopatológicas (02 LSIL e 02 HSIL). O resultado colposcópico dos 5 casos positivos no Onco E6™, 03 apresentaram alterações. Das 03 amostras analisadas no histopatológico, 01 apresentou NIC I, 01 NIC III e 01 carcinoma invasor.

PERSPECTIVAS E DESDOBRAMENTOS DO ESTUDO

A possibilidade do uso da autocoleta em conjunto com o teste rápido Onco E6™, em áreas remotas e de difícil acesso apresenta-se como uma alternativa aplicável, possibilitando que parte da população que não tem acesso aos programas de prevenção ou até foge deles pelo temor ou constrangimento viesse a ele se incorporar, podendo proporcionar aumento das taxas de cobertura no estado do Amazonas.

Neste estudo, demonstramos que a autocoleta obteve boa aceitação por parte das mulheres estudadas, podendo ser utilizada como uma ferramenta auxiliar futura na estratégia de prevenção do rastreamento em lugares de baixos recursos, como o estado do Amazonas.

No presente estudo, a autocoleta foi uma ferramenta de enorme valor para a detecção de dois casos de carcinoma cervical, bem como para a detecção do HPV em 18,7% da população estudada.

Desta forma os resultados obtidos neste estudo irão subsidiar discussões entre a Secretaria de Estado da Saúde (SUSAM) gestores do grupo condutor de Rede de Atenção à Saúde de pessoas com doenças crônicas vinculadas a SUSAM, Gestores do programa de saúde da mulher no Município de Manaus a fim de que sejam repensadas melhores estratégias e o melhor algoritmo para o rastreamento do câncer de colo de útero em populações isoladas e de difícil acesso.

O grupo de pesquisa irá iniciar estudos de viabilidade econômica destas novas estratégias associando-se a pesquisadores de grupos de pesquisa em economia em saúde, a fim de responder a esta questão de importância estratégica para o estado do Amazonas e para o país, principalmente a médio e em longo prazo quando se deseja de fato reduzir as taxas de incidência e mortalidade pela doença o estado do Amazonas.

Referências

ADLER, D. H., *et al.* High level of agreement between clinician-collected and self-collected samples for HPV detection among South African adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, v.25, n.4, Aug, p.280-281. 2012.

ALBERTS, B., *et al.* Molecular biology of the cell. New York : Garland. 1994

ALBRING, L.; BRENTANO, J. E. e VARGAS, V. R. A. O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão. v.38 n.2, p.87-90. 2006.

ALMONTE, M., *et al.* Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*, v.26 Suppl 11, Aug 19, p.L16-36. 2008.

AMARAL, J. C., *et al.* Associação de lesões anorretais em portadoras de infecção genital por HPV e neoplasia cérvico-uterina. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v.29, p.203-208. 2009.

AMARO-FILHO, S. M., *et al.* A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort. *PLoS One*, v.8, n.3, p.e57810. 2013.

APPLEBY, P., *et al.* Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*, v.370, n.9599, Nov 10, p.1609-1621. 2007.

_____. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*, v.118, n.6, Mar 15, p.1481-1495. 2006.

ARBYN, M., *et al.* Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*, v.111, n.1, Jan, p.167-177. 2008.

_____. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol*, v.15, n.2, p.172-183. 2014.

ARGYRI, E., *et al.* A cross sectional study of HPV type prevalence according to age and cytology. *BMC Infect Dis*, v.13, p.53. 2013.

AYRES, A. R. e SILVA, G. A. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Revista de saude publica*, v.44, n.5, p.963-974. 2010.

BEERMAN, H., *et al.* Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol Oncol*, v.112, n.3, Mar, p.572-576. 2009.

BELINSON, J. L., *et al.* Improved sensitivity of vaginal self-collection and high-risk human papillomavirus testing. *Int J Cancer*, v.130, n.8, Apr 15, p.1855-1860. 2012.

BERNARD, H. U., *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*, v.170, n.5, Nov, p.1077-1085. 1994.

BERTHET, N., *et al.* Resequencing microarray technology for genotyping human papillomavirus in cervical smears. *PLoS One*, v.9, n.11, p.e109301. 2014.

BHATLA, N., *et al.* Can human papillomavirus DNA testing of self-collected vaginal samples compare with physician-collected cervical samples and cytology for cervical cancer screening in developing countries? *Cancer Epidemiol*, v.33, n.6, p.446-450. 2009.

BORNSTEIN J, *et al.* Nomenclatura colposcópica IFCCP. 2011.

BOSCH, F. X., *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, v.55, n.4, Apr, p.244-265. 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano integrado de enfrentamento da feminização da epidemia de AIDS e outras DST. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. . BRASÍLIA: Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_feminizacao_final.pdf> Acesso em 03 de março de 2014. 2007.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras. AIDS., S. D. V. E. S. P. N. D. D. E. Brasília: 2005 2008.

_____. Ministério do Planejamento. Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem Populacional. Rio de Janeiro: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/frm_pm_urb_rur.php?codigo=130120> 2010.

_____. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer. .
 . CÂNCER, M. D. S. I. C. G. D. A. E. D. D. A. À. R. D. A. O. I. N. D. e Rio de Janeiro 2011.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais. Rio de Janeiro: (<http://www.inca.gov.br>) 2012.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Controle do Câncer do colo do Útero (SISCOLO). Relatório do Departamento de Prevenção e Controle do Câncer da Fundação Centro de Controle do Câncer. Brasília, DF: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?siscolo/ver4/DEF/Brasil/BRCCOLO4.def>> 2013.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ficha técnica de indicadores das ações de controle do câncer do colo do útero. Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância; Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Rio de Janeiro: (<http://www.inca.gov.br>) 2014a.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação geral de ações estratégicas. Coordenação Geral de Ações estratégicas. Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2014. 2014b.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Controle do Câncer do colo do Útero (SISCOLO). Relatório do Departamento de Prevenção e Controle do Câncer da Fundação Centro de Controle do Câncer. Brasília, DF. : <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?siscolo/ver4/DEF/Brasil/BRCCOLO4.def>>. 2015 2014c.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação geral de ações estratégicas. Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2016.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais. Uma análise das condições de vida da população brasileira. . SOCIAIS, C. D. P. E. I. Rio de Janeiro: 293 p. 2012.

BRAY, F., *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*, v.13, n.8, Aug, p.790-801. 2012.

BRENDLE, S. A.; BYWATERS, S. M. e CHRISTENSEN, N. D. Pathogenesis of infection by human papillomavirus. *Curr Probl Dermatol*, v.45, p.47-57. 2014.

BRINK, A. A., *et al.* High concordance of results of testing for human papillomavirus in cervicovaginal samples collected by two methods, with comparison of a novel self-sampling device to a conventional endocervical brush. *J Clin Microbiol*, v.44, n.7, Jul, p.2518-2523. 2006.

BRITO-SILVA, K., *et al.* Integralidade no cuidado ao câncer do colo do útero: avaliação do acesso. *Revista de Saúde Pública*, v.48, p.240-248. 2014.

BRUNI, L., *et al.* Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, v.202, n.12, Dec 15, p.1789-1799. 2010.

BRUNO, A., *et al.* [Genotype distribution of human papillomavirus in women from the state of Bahia, Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.36, n.9, Sep, p.416-422. 2014.

BURK, R. D.; HARARI, A. e CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, v.445, n.1-2, Oct, p.232-243. 2013.

CAMBOU, M. C., *et al.* Anal human papillomavirus (HPV) prevalences and factors associated with abnormal anal cytology in HIV-infected women in an urban cohort from Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Patient Care STDS*, v.29, n.1, Jan, p.4-12. 2015.

CANEPA, P., *et al.* HPV related diseases in males: a heavy vaccine-preventable burden. *J Prev Med Hyg*, v.54, n.2, Jun, p.61-70. 2013.

CASTELLSAGUE, X., *et al.* Risk of first cervical HPV infection and pre-cancerous lesions after onset of sexual activity: analysis of women in the control arm of the randomized, controlled PATRICIA trial. *BMC Infect Dis*, v.14, p.551. 2014.

CASTLE, P. E. Invited commentary: is monitoring of human papillomavirus infection for viral persistence ready for use in cervical cancer screening? *Am J Epidemiol*, v.168, n.2, Jul 15, p.138-144; discussion 145-138. 2008.

CASTLE, P. E., *et al.* Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res*, v.66, n.2, Jan 15, p.1218-1224. 2006.

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

CATARINO, R., *et al.* Smartphone Use for Cervical Cancer Screening in Low-Resource Countries: A Pilot Study Conducted in Madagascar. *PLoS One*, v.10, n.7, p.e0134309. 2015.

CORNALL, A. M., *et al.* Evaluation of an automated SPF10-LiPA25 assay for detection and typing of human papillomavirus in archival samples. *Journal of virological methods*, v.199, Apr, p.116-118. 2014.

CROFTS, V., *et al.* Education efforts may contribute to wider acceptance of human papillomavirus self-sampling. *Int J Womens Health*, v.7, p.149-154. 2015.

CROWE, E., *et al.* Effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccine for the prevention of cervical abnormalities: case-control study nested within a population based screening programme in Australia. *Bmj*, v.348, p.g1458. 2014.

DA FONSECA, A. J., *et al.* [Validity of cervicovaginal cytology in a Brazilian State with high incidence rate of cervical cancer]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.36, n.8, Aug, p.347-352. 2014.

DALSTEIN, V., *et al.* Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods*, v.156, n.1-2, Mar, p.77-83. 2009.

DARLIN, L., *et al.* Vaginal self-sampling without preservative for human papillomavirus testing shows good sensitivity. *J Clin Virol*, v.56, n.1, p.52-56. 2013.

DE ALBA, I., *et al.* Self-sampling for human papillomavirus in a community setting: feasibility in Hispanic women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.17, n.8, Aug, p.2163-2168. 2008.

DE VILLIERS, E. M., *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology*, v.324, n.1, Jun 20, p.17-27. 2004.

DICKSON, E. L., *et al.* Cervical cytology and multiple type HPV infection: a study of 8182 women ages 31-65. *Gynecol Oncol*, v.133, n.3, Jun, p.405-408. 2014.

DIIJKSTRA, M. G., *et al.* Brush-based self-sampling in combination with GP5+/6+-PCR-based hrHPV testing: high concordance with physician-taken cervical scrapes for HPV genotyping and detection of high-grade CIN. *J Clin Virol*, v.54, n.2, Jun, p.147-151. 2012.

DOCHEZ, C., *et al.* HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine*, v.32, n.14, Mar 20, p.1595-1601. 2014.

DOOBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, v.110, n.5, May, p.525-541. 2006.

ENTIAUSPE, L. G., *et al.* High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. *Braz J Microbiol*, v.45, n.2, p.689-694. 2014.

EZECHI, O. C., *et al.* The burden, distribution and risk factors for cervical oncogenic human papilloma virus infection in HIV positive Nigerian women. *Virol J*, v.11, n.5, p.11-15. 2014.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R. e DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *J Health Sci Inst.*, v. 30 (2), p.107-111. 2012.

FERREIRA, J. R. D. *Detecção da infecção pelo HPV e do polimorfismo da proteína p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas.* (Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical)). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007. 112 p.

FIGLIUOLO, G. *Estudo clínico laboratorial da infecção pelo papilomavírus humano em homens HIV+/AIDS atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.* Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical Mestrado em doenças tropicais e infecciosas, Universidade do Estado do Amazonas fundação de medicina tropical dr. heitor vieira dourado Manaus-AM, 2011.

FONSECA, A. J.; FERREIRA, L. C. e NETO, G. B. Cost-effectiveness of the vaccine against human papillomavirus in the Brazilian Amazon region. *Rev Assoc Med Bras*, v.59, n.5, Sep-Oct, p.442-451. 2013.

FONSECA, A. J., *et al.* HPV Infection and Cervical Screening in Socially Isolated Indigenous Women Inhabitants of the Amazonian Rainforest. *PLoS One*, v.10, n.7, p.e0133635. 2015.

FONSECA, A. J. D., *et al.* Acurácia dos exames citológicos cervicovaginais em Estado de elevada incidência de câncer de colo de útero. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.36, p.347-352. 2014.

FORMAN, D., *et al.* Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, v.30 Suppl 5, Nov 20, p.F12-23. 2012.

FREGNANI, J. H., *et al.* A school-based human papillomavirus vaccination program in barretos, Brazil: final results of a demonstrative study. *PLoS One*, v.8, n.4, p.e62647. 2013.

GENTHER WILLIAMS, S. M., *et al.* Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res*, v.65, n.15, Aug 1, p.6534-6542. 2005.

GIRIANELLI, V. R. e SANTOS THULER, L. C. Evaluation of agreement between conventional and liquid-based cytology in cervical cancer early detection based on analysis of 2,091 smears: experience at the Brazilian National Cancer Institute. *Diagn Cytopathol*, v.35, n.9, Sep, p.545-549. 2007.

GIULIANO, A. R., *et al.* EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer*, v.136, n.12, Jun 15, p.2752-2760. 2015.

_____. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males. *N Engl J Med*, v.364, n.5, Feb 3, p.401-411. 2011.

GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer (IARC): World Health Organization GLOBOCAN. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. 2012.

GRAVITT, P. E., *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, v.38, n.1, Jan, p.357-361. 2000.

GROSS, G. Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. *Curr Probl Dermatol*, v.45, p.98-122. 2014.

GUETTITI, H., *et al.* Pre-vaccination prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among women from urban Tunis: a cross-sectional study. *Asian Pac J Cancer Prev*, v.15, n.21, p.9361-9365. 2014.

GUIDO, R. Secondary prevention of cervical cancer part 2: initial management of abnormal cervical cancer screening test. *Clin Obstet Gynecol*, v.57, n.2, Jun, p.292-301. 2014.

GUO, J., *et al.* Evaluation of a low-cost liquid-based pap test in rural el salvador: a split-sample study. *J Low Genit Tract Dis*, v.18, n.2, Apr, p.151-155. 2014.

HAGUENOER, K., *et al.* Accuracy of dry vaginal self-sampling for detecting high-risk human papillomavirus infection in cervical cancer screening: a cross-sectional study. *Gynecol Oncol*, v.134, n.2, Aug, p.302-308. 2014.

HEARD, I., *et al.* Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in France. *PLoS One*, v.8, n.11, p.e79372. 2013.

HERNANDEZ-MARQUEZ, C. I., *et al.* [Knowledge of human papilloma virus (HPV) and acceptance of vaginal self-sampling among Mexican woman]. *Rev Salud Publica (Bogota)*, v.16, n.5, Oct, p.697-708. 2014.

HOORY, T., *et al.* Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc*, v.107, n.3, Mar, p.198-217. 2008.

HOSTE, G.; VOSSAERT, K. e POPPE, W. A. The Clinical Role of HPV Testing in Primary and Secondary Cervical Cancer Screening. *Obstet Gynecol Int*, v.2013, p.610373. 2013.

HULL, P. C., *et al.* HPV vaccine use among African American girls: Qualitative formative research using a participatory social marketing approach. *Gynecol Oncol*, v.132 Suppl 1, Mar, p.S13-20. 2014.

IARC. International Agency for Research on Cancer: <http://www.iacr.com.fr/> 2011.

_____. International Agency for Research on Cancer: World Health Organization GLOBOCAN. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. 2014.

IMAI, H., *et al.* Prevalence, Potential Predictors, and Genotype-Specific Prevalence of Human Papillomavirus Infection among Sexually Active Students in Japan. *PLoS One*, v.10, n.7, p.e0132462. 2015.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO. Painel de Indicadores do Câncer do Colo de Útero. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: <<http://www2.inca.gov.br/>> 2013.

_____. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). COORDENAÇÃO GERAL DE AÇÕES ESTRATÉGICAS. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. ESTIMATIVA 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro <<http://www2.inca.gov.br/>> 2014.

JABBAR, S. F., *et al.* Cervical cancers require the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein even in the presence of the viral E6 oncoprotein. *Cancer Res*, v.72, n.16, Aug 15, p.4008-4016. 2012.

JENAB, A., *et al.* Comparison of three methods of DNA extraction in endocervical specimens for Chlamydia trachomatis infection by spectrophotometry, agarose gel, and PCR. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v.58, n.3, Jun, p.227-234. 2010.

JENTSCHKE, M.; SOERGEL, P. e HILLEMANN, P. Evaluation of a multiplex real time PCR assay for the detection of human papillomavirus infections on self-collected cervicovaginal lavage samples. *Journal of virological methods*, v.193, n.1, p.131-134. 2013.

KAHN, J. A. e BERNSTEIN, D. I. HPV vaccination: too soon for 2 doses? *JAMA*, v.309, n.17, May 1, p.1832-1834. 2013.

KJAER, S. K., *et al.* A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*, v.2, n.10, Oct, p.868-878. 2009.

LAZCANO-PONCE, E., *et al.* Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial. *Lancet*, v.378, n.9806, Nov 26, p.1868-1873. 2011.

LEGOOD, R.; WOLSTENHOLME, J. e GRAY, A. From cost-effectiveness information to decision-making on liquid-based cytology: Mind the gap. *Health Policy*, v.89, n.2, Feb, p.193-200. 2009.

LENSELINK, C. H., *et al.* Detection and genotyping of human papillomavirus in self-obtained cervicovaginal samples by using the FTA cartridge: new possibilities for cervical cancer screening. *Journal of clinical microbiology*, v.47, n.8, p.2564-2570. 2009.

LEUNG, C. O., *et al.* miR-135a leads to cervical cancer cell transformation through regulation of beta-catenin via a SIAH1-dependent ubiquitin proteosomal pathway. *Carcinogenesis*, v.25, p.25. 2014.

LIMA JÚNIOR, S. F. D., *et al.* Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.33, p.315-320. 2011.

LIU, Z. C., *et al.* Multiple Sexual Partners as a Potential Independent Risk Factor for Cervical Cancer: a Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Asian Pac J Cancer Prev*, v.16, n.9, p.3893-3900. 2015.

LONGATO FILHO, A. e SCHMITT, F. C. Cytology education in the 21st century: living in the past or crossing the Rubicon? *Acta Cytol*, v.54, n.4, Jul-Aug, p.654-656. 2010.

LONGATTO-FILHO, A., *et al.* Performance characteristics of Pap test, VIA, VILI, HR-HPV testing, cervicography, and colposcopy in diagnosis of significant cervical pathology. *Virchows Arch*, v.460, n.6, p.577-585. 2012.

LONGATTO FILHO, A., *et al.* DCS liquid-based system is more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesions: study in high-risk population with biopsy-based confirmation. *Gynecol Oncol*, v.97, n.2, May, p.497-500. 2005.

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

LORENZI, A. T., *et al.* Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV test. *Gynecol Oncol*, v.131, n.1, Oct, p.131-134. 2013.

LORENZI, A. T.; SYRJANEN, K. J. e LONGATTO-FILHO, A. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. *Virology*, v.12, p.112. 2015.

MARCELLUSI, A., *et al.* Health utilities lost and risk factors associated with HPV-induced diseases in men and women: the HPV Italian collaborative study group. *Clin Ther*, v.37, n.1, Jan 1, p.156-167 e154. 2015.

MARKOWITZ, L. E., *et al.* Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, v.56, n.Rr-2, Mar 23, p.1-24. 2007.

MOLIJN, A., *et al.* Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*, v.32 Suppl 1, Mar, p.S43-51. 2005.

MUNOZ, N., *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, v.348, n.6, Feb 6, p.518-527. 2003.

_____. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, v.24 Suppl 3, Aug 31, p.S3/1-10. 2006.

NANDINI, N. M., *et al.* Manual liquid based cytology in primary screening for cervical cancer--a cost effective proposition for scarce resource settings. *Asian Pac J Cancer Prev*, v.13, n.8, p.3645-3651. 2012.

NASCIMENTO, L. M. S. *Diagnóstico Citológico e Molecular da Infecção pelo HPV em Mulheres do Município de Barcarena*. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, 2010.

NAVARRO, C., *et al.* Cervical cancer screening coverage in a high-incidence region. *Rev Saude Publica*, v.49, p.17. 2015.

NOVAIS, C. M. e ALVES, M. P. PCR em tempo real. *Rev Biotec Ciência & Desenvolvimento*, n.33, p.10-13. 2004.

OLIVEIRA, C. M. *Existe Câncer Cervical Negativo?* . Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, G. R. D., *et al.* Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.35, p.226-232. 2013.

ORTIZ, A. P., *et al.* Cross-sectional study of HPV-16 infection in a population-based subsample of Hispanic adults. *BMJ Open*, v.4, n.2, p.2013-004203. 2014.

PAUDYAL, P., *et al.* Obtaining self-samples to diagnose curable sexually transmitted infections: a systematic review of patients' experiences. *PLoS One*, v.10, n.4, p.e0124310. 2015.

PETIGNAT, P., *et al.* Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, v.105, n.2, May, p.530-535. 2007.

PIERCE CAMPBELL, C. M., *et al.* Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: a case series within the HPV Infection in Men Study. *J Clin Virol*, v.58, n.4, Dec, p.652-659. 2013.

PINTO, D. D. S.; FUZII, H. T. e QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v.27, p.769-778. 2011.

PINTO, D. S.; FUZII, H. T. e QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v.27, p.769-778. 2011.

QIAO, Y. L., *et al.* Lower cost strategies for triage of human papillomavirus DNA-positive women. *Int J Cancer*, Nov 18. 2013.

QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T. e ZAIA, J. E. O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG *RBAC*, v.39, n.2, p. 151-157,. 2007.

RAMA, C. H., *et al.* [Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer]. *Rev Saude Publica*, v.42, n.1, Feb, p.123-130. 2008.

RAMOS, K. S. *Estudo do HPV e variáveis sócio-comportamentais em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau.* (Tese de Doutorado). Departamento de moléstias Infecciosas e parasitárias, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RIBEIRO, A. A., *et al.* HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer*, v.10, p.16. 2015.

RICKERT, V. I., *et al.* School-based vaccination of young US males: Impact of health beliefs on intent and first dose acceptance. *Vaccine*, v.32, n.17, Apr 7, p.1982-1987. 2014.

ROCHA, D. A., *et al.* High prevalence and genotypic diversity of the human papillomavirus in Amazonian women, Brazil. *Infect Dis Obstet Gynecol*, v.514859, n.10, p.13. 2013.

RODRIGUES, A. D., *et al.* Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.45, p.457-462. 2009.

RONCO, G., *et al.* [Health technology assessment report. Use of liquid-based cytology for cervical cancer precursors screening]. *Epidemiol Prev*, v.36, n.5 Suppl 2, Sep-Oct, p.e1-e33. 2012.

ROSA, M. I. D., *et al.* PAPILOMAVÍRUS HUMANO E NEOPLASIA CERVICAL. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v.25, n.5, p.953-964. 2009.

ROSENBAUM, A. J., *et al.* Acceptability of self-collected versus provider-collected sampling for HPV DNA testing among women in rural El Salvador. *Int J Gynaecol Obstet*, v.126, n.2, Aug, p.156-160. 2014.

ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D. e RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Rio de Janeiro. 2006

ROURA, E., *et al.* Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*, v.135, n.2, Jul 15, p.453-466. 2014.

SALES, L. R. *Caracterização da infecção por HPV em mulheres que realizam p exame de rastreamento do câncer de colo de útero do município de Manaus.* (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal de Manaus, Manaus, 2015.

SCHIFFMAN, M. e CASTLE, P. E. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med*, v.353, n.20, Nov 17, p.2101-2104. 2005.

SCHIFFMAN, M., *et al.* Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, v.103, n.5, Mar 2, p.368-383. 2011.

SCHWEIZER, J., *et al.* Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*, v.48, n.12, Dec, p.4646-4648. 2010.

SELLORS, J. W., *et al.* Association of elevated E6 oncoprotein with grade of cervical neoplasia using PDZ interaction-mediated precipitation of E6. *J Low Genit Tract Dis*, v.15, n.2, Apr, p.169-176. 2011.

SERRANO, B., *et al.* Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). *Cancer Epidemiol*, v.38, n.6, Dec, p.748-756. 2014.

SERRAVALLE, K., *et al.* [Comparison of two techniques for HPV genotyping in women with high-grade squamous intraepithelial lesion]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.37, n.2, Feb, p.94-99. 2015.

SILVA, J., *et al.* Oncogenic HPV Types Infection in Adolescents and University Women from North Portugal: From Self-Sampling to Cancer Prevention. *J Oncol*, v.953469, n.10, p.28. 2011.

SIMONATO, L. E. e MIYAHARA, G. I. O Papel do Papilomavírus Humano na Carcinogênese Bucal *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.53, n.4, p.471-476. 2007.

STROHL, A. E., *et al.* Barriers to prevention: knowledge of HPV, cervical cancer, and HPV vaccinations among African American women. *Am J Obstet Gynecol*, v.212, n.1, Jan, p.65 e61-65. 2015.

TRAN, L. T., *et al.* Risk factors for high-risk and multi-type Human Papillomavirus infections among women in Ho Chi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study. *BMC Womens Health*, v.15, p.16. 2015.

VALLADÃO, A. S., *et al.* Chlamydia trachomatis e suas implicações na reprodução humana. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v.70, p.457-462. 2011.

VAN DER MAREL, J., *et al.* Oncogenic Human Papillomavirus-infected Immature Metaplastic Cells and Cervical Neoplasia. *Am J Surg Pathol*, v.38, n.4, Apr, p.470-479. 2014.

VARNAI, A. D., *et al.* Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep*, v.19, n.2, Feb, p.457-465. 2008.

VEO, C. A., *et al.* Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumour Biol*, v.36, n.7, Jul, p.5399-5405. 2015.

VIEIRA, L. e ALMEIDA, A. The cytology and DNA detection by the PapilloCheck((R)) test in the diagnosis of human papillomavirus infection. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, v.3, n.1, Mar, p.61-67. 2013.

VIEIRA, R. C., *et al.* Prevalence of type-specific HPV among female university students from northern Brazil. *Infect Agent Cancer*, v.10, p.21. 2015.

VIRTANEN, A., *et al.* Self-sampling experiences among non-attendees to cervical screening. *Gynecol Oncol*, v.135, n.3, Dec, p.487-494. 2014.

WHO. ICO; Information Centre on HPV and Cervical Cancer/ Latin America/ Brazil.

http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf 2011.

WIDDICE, L. E. e MOSCICKI, A. B. Updated guidelines for papanicolaou tests, colposcopy, and human papillomavirus testing in adolescents. *J Adolesc Health*, v.43, n.4 Suppl, Oct, p.S41-51. 2008.

WOO, Y. L., *et al.* A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer*, v.126, n.1, Jan 1, p.133-141. 2010.

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

ZEHBE, I., *et al.* Feasibility of self-sampling and human papillomavirus testing for cervical cancer screening in First Nation women from Northwest Ontario, Canada: a pilot study. *BMJ Open*, v.1, n.1, Jan 1, p.e000030. 2011.

ZHANG, B., *et al.* Risk factors for cervical cancer in rural areas of Wuhan China: a matched case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*, v.14, n.12, p.7595-7600. 2013.

ZHAO, F. H., *et al.* An evaluation of novel, lower-cost molecular screening tests for human papillomavirus in rural China. *Cancer Prev Res*, v.6, n.9, p.938-948. 2013.

_____. Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J Natl Cancer Inst*, v.104, n.3, p.178-188. 2012.

ZHEN, S.; HU, C. M. e BIAN, L. H. Glutathione S-transferase polymorphism interactions with smoking status and HPV infection in cervical cancer risk: an evidence-based meta-analysis. *PLoS One*, v.8, n.12, p.e83497. 2013.

ZONTA, M. A., *et al.* Oral infection by the Human Papilloma Virus in women with cervical lesions at a prison in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol*, v.78, n.2, p.66-72. 2012.

APÊNDICES



FUNDAÇÃO CENTRO DE CONTROLE DE ONCOLOGIA DO ESTADO DO AMAZONAS



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

APÊNDICE A -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a Senhora para participar da Pesquisa intitulada: “**Caracterização dos genótipos de HPV na população de rastreo e em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dra. Kátia Luz Torres Silva, Dra. Valquiria do Carmo Alves Martins, Danielle A. Pires Rocha e Dr. José Eduardo Levi, a qual pretende identificar as infecções pelo Papilomavírus Humanos (HPV) mais frequentes na população de mulheres do Amazonas e também em mulheres que apresentam lesão de colo de útero.

Sua participação é voluntária e se dará respondendo a um questionário que será aplicado por um técnico de saúde além de coleta de material do colo do útero (o mesmo utilizado na rotina do exame preventivo de câncer de colo de útero ou da biopsia para exame citopatológico – quando houver indicação do seu médico). Caso a senhora seja selecionada para a avaliação do desempenho e aceitação de dispositivo de autocoleta receberá instruções para o uso do material de autocoleta.

O material coletado será utilizado unicamente para os objetivos da pesquisa e serão encaminhados para realização de exames especializados para pesquisa da infecção por HPV e dos tipos virais encontrados, e se houver alguma alteração no seu exame a senhora será comunicada através do agente de saúde local. Preciso de sua autorização para coletar, realizar análises laboratoriais, guardar e usar este material coletado para pesquisas futuras de modo a tornar possível estudos das variações quanto aos tipos de HPV, assim como para compreender melhor a infecção pelo vírus e suas diferentes formas de apresentação (variabilidade genética), respondendo assim a novas perguntas científicas. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador responsável por um período de dez anos, com possível renovação. Caso o material coletado não se encontre em condições de armazenagem, necessito de sua autorização para o descarte dos mesmos. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos sendo apenas um pequeno incômodo no momento da coleta do material para o exame preventivo do câncer de colo de útero. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o benefício de ganhos no conhecimento sobre a infecção pelo HPV, sua caracterização e relação com o câncer de colo de útero no Estado do Amazonas.

Se depois de autorizar sua participação a senhora desistir de continuar no projeto, tem o direito e a liberdade de retirar sua autorização em qualquer fase da pesquisa, bem como retirar o consentimento de guarda e utilização de sua amostra biológica independente do motivo e sem nenhum

prejuízo a sua pessoa, nem do seu tratamento ou atendimento no serviço de saúde. A Sra. não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados em artigos científicos, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer acesso aos resultados da pesquisa ou outra informação, a senhora poderá entrar em contato com os pesquisadores no endereço Rua Francisco Orellana, 215 – Planalto – Diretoria de Ensino e Pesquisa, pelo telefone (92) 36554774.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____(Nome legível), fui informada sobre o que os pesquisadores pretendem realizar e porque precisam da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Aceito conceder o material biológico humano, bem como seu depósito, armazenamento e utilização na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas:

() SIM () NÃO

Declaro ainda que (assinale apenas uma das alternativas abaixo):

() A cada nova pesquisa realizada com o material biológico concedido e armazenado na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas: **quero ser contatada para assinar** um consentimento de que meu material seja utilizado na pesquisa;

() A cada nova pesquisa realizada com o material biológico concedido e armazenado na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas **podem ser realizadas sem a necessidade** de minha nova aprovação para uso em cada uma delas.

Manaus, ___/___/___

Assinatura da participante - Paciente

Assinatura do pesquisador responsável



Impressão do dedo polegar caso não saiba assinar

APÊNDICE B - Questionário

Ficha n° _____

Análise da estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM.**IDENTIFICAÇÃO**

1. Código no projeto _____ 2. Data da abordagem: ____/____/_____
 3. Código de identificação da UBS _____ 4. Iniciais da Paciente: _____
 5. Data de nascimento: ____/____/_____
 6. Idade: _____
 7. Naturalidade: _____ 8. Telefones: _____
 9. Endereço: _____
 10. Raça/Cor: () parda () branca () negra () indígena () oriental

ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS

11. Qual é o seu grau de escolaridade?
 Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo ()
 Ensino médio incompleto () Ensino médio completo () Ensino superior completo ()
 12. Ocupação: _____
 13. Qual a renda total da sua família?
 () bolsa família () 1 salário mínimo () 2-3 salários mínimos () ≥ 4 salários mínimos

ASPECTOS DE HISTÓRIA CLÍNICA/DST

14. Qual é o seu estado conjugal?
 Solteira () Casada () união estável () Divorciada () Separada () Viúva ()
 15. Quantas gestações a senhora já teve? _____
 16. Número de abortos _____
 17. Qual idade do primeiro parto? _____
 18. Número de filhos? _____
 19. Com que idade teve sua primeira relação sexual? _____
 20. Nestes últimos 12 meses a senhora teve relação sexual com quantos parceiros? _____

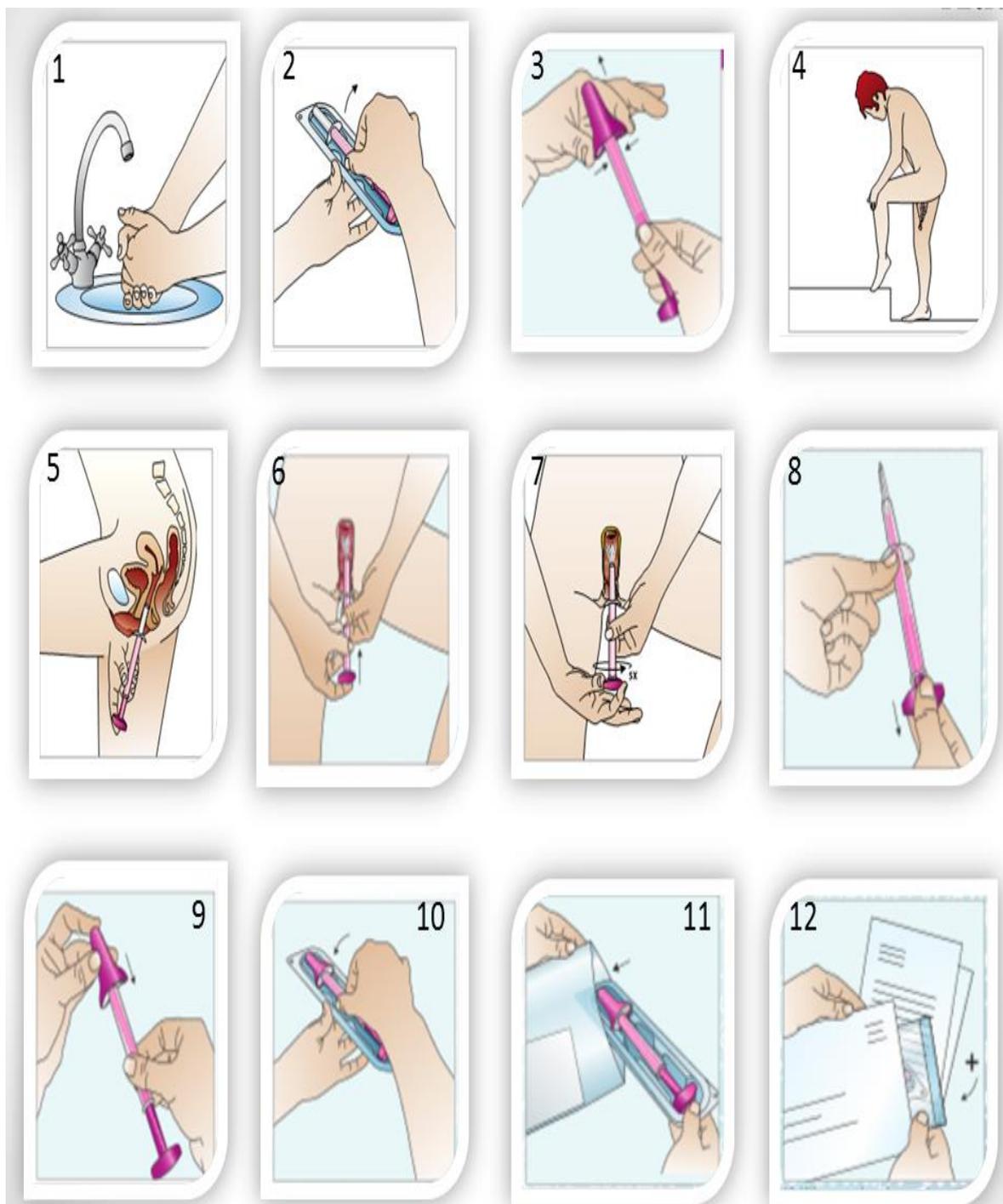
21. Quantos parceiros sexuais a senhora já teve ao longo da sua vida? _____
22. Com que frequência a senhora usa(va) preservativo com este(s) parceiro(s) ?
Sempre () às vezes () nunca ()
23. Se não usava, qual o motivo? _____
24. A senhora usa algum método anticoncepcional (exceto camisinha)?
Pílula (anticoncepcional oral) () Anticoncepcional injetável () Dispositivo intra-uterino (DIU)
() Outro () Especificar: _____
25. A senhora já teve alguma doença sexualmente transmissível? Sim () Não ()
26. Se sim, qual é esta doença? _____
27. A senhora já ouviu falar do HPV? Sim () Não ()
28. Na sua casa alguém já foi vacinado contra o HPV? Sim () Não ()
29. Está apresentando alguma queixa clínica no momento? Sim () Não ()
30. Se sim, quais ?
Úlceras genitais () Dificuldade de urinar () Corrimento vaginal () Coceira ()
Dor pélvica () Sangramento após relação sexual () Outras () Especificar: _____
31. A senhora fuma? Sim () Não () **Se não, pular para a questão 35**
32. Se sim, com que frequência? Ocasionalmente (às vezes) () diariamente ()
33. Por quanto tempo? _____ 34. Número de cigarros por dia? _____
35. A senhora já fumou? Sim () Não ()
36. Se sim, por quanto tempo? _____ 37. Número de cigarros por dia? _____
38. A senhora ingere bebida alcoólica mais de três vezes na semana? Sim () Não ()
39. A senhora toma algum medicamento diariamente? Sim () Não ()
40. Se sim, qual foi o tipo? Anti-hipertensivo () Para controle do diabetes () Antibiótico ()
Antifúngico () Antiinflamatório () Analgésico () Outro () Especificar: _____
41. Qual foi a data da sua última menstruação? ____/____/____
42. Quando realizou seu último exame preventivo?
Nunca realizou () há 6 meses () há 1 ano () há 2 anos () há mais de 3 anos () não lembra
43. Se nunca realizou, quais motivos ou dificuldades apresentadas para a não realização do exame?
Acesso difícil () falta de tempo () nunca ouviu falar do exame () vergonha () medo ()

AVALIAÇÃO DA ACEITAÇÃO DA AUTOCOLETA

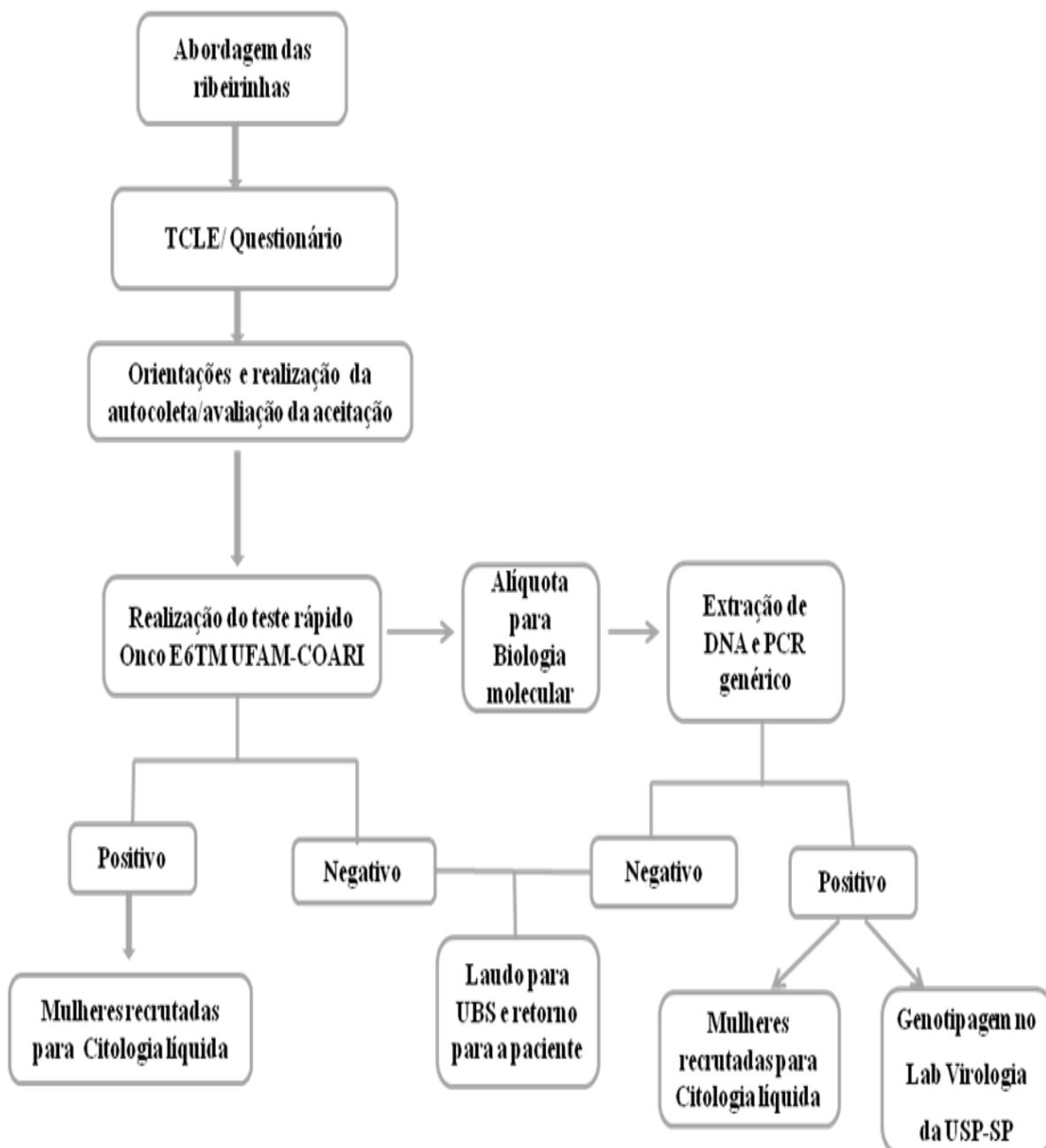
44. A senhora gostou da autocolleta? Sim () Não ()
45. Se não gostou, por quê? _____
46. Achou difícil o manuseio do dispositivo de autocolleta? Sim () Não ()
47. Se sim, quais dificuldades foram encontradas? _____
48. A senhora sentiu algum desconforto durante a realização da autocolleta? Sim () Não ()
49. Se sim, qual o tipo de desconforto? _____
50. você faria novamente? Sim () Não ()
51. Você prefere a autocolleta ou a coleta com um profissional de saúde?
() autocolleta () profissional de saúde
52. Por quê? _____

ANÁLISE DA AMOSTRA

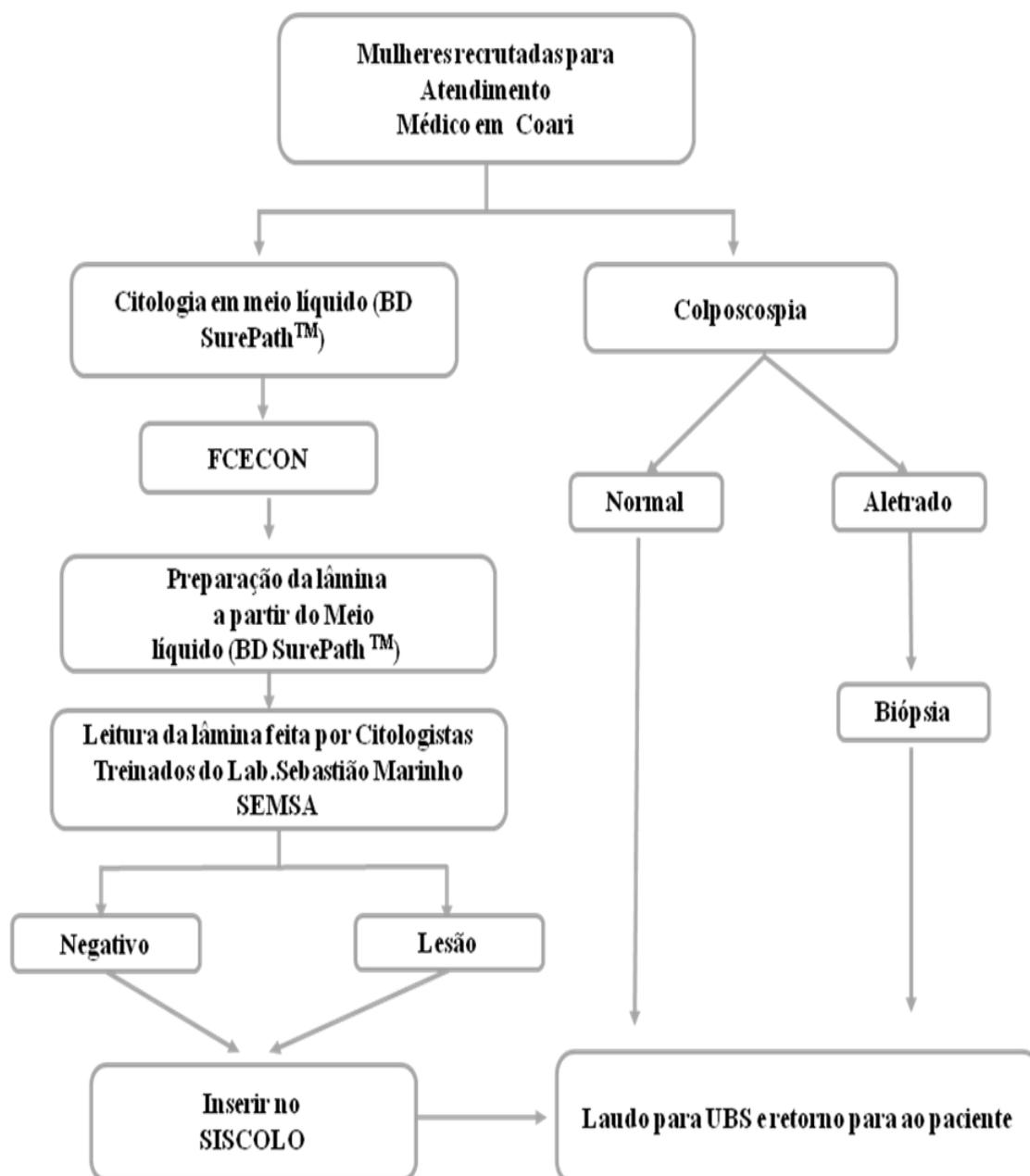
53. As cerdas da escova estavam recolhidas? Sim () Não ()
54. Presença de sangue? Sim () Não ()
55. Observações importantes: _____

APÊNDICE C - Folder ilustrativo da técnica de autocoleta

APÊNDICE D - Fluxograma Metodológico da Primeira etapa do Estudo



Mulheres recrutadas para atendimento médico em Coari seguirão para a segunda etapa do estudo

APÊNDICE D - Fluxograma Metodológico da segunda etapa do estudo

ANEXOS

ANEXO I

FUNDAÇÃO CENTRO DE
CONTROLE DE ONCOLOGIA
DO ESTADO AMAZONAS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização dos genótipos de HPV na população de rastreamento e em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas.

Pesquisador: Kátia Luz Torres Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12812213.4.0000.0004

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 661.338

Data da Relatoria: 05/05/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, transversal descritivo que visa caracterizar os genótipos de HPV mais prevalentes na população normal de rastreamento e em casos de câncer de colo de útero do estado do Amazonas, associando os mesmos aos achados cito e histopatológicos. Será um estudo de rastreamento, detecção de casos e genotipagem de HPV em mulheres do Estado do Amazonas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a infecção por Papilomavírus Humanos (HPV) mais prevalentes na população normal de rastreamento e em pacientes com câncer de colo de útero do estado do Amazonas, associando os mesmos aos achados cito e histopatológicos.

Objetivo Secundário:

1- Descrever o perfil epidemiológico, sociodemográfico e de risco para a infecção pelo HPV entre as mulheres estudadas. 2- Descrever a frequência de HPV na população de mulheres atendidas nas Unidades básicas de Saúde do Estado do Amazonas; 3- Descrever a frequência de HPV na população de mulheres com câncer de colo de útero atendidas na Fundação CECON; 4- Associar a presença de infecção pelo HPV com os achados cito e histopatológicos; 5- Caracterizar os genótipos do HPV identificados na população de mulheres atendidas nas Unidades básicas de

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar
Bairro: S/N **CEP:** 69.040-010
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-4774 **E-mail:** com/le.etica.pesquisa@foccon.am.gov.br

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Justificativa: Este estudo foi submetido em 15/02/2013 ao CEP da Fundação CECON. No entanto, naquele momento o sistema da Plataforma Brasil considerou como bloqueio ético uma vez que a pesquisadora principal é também coordenadora do CEP. Obviamente, se tinha conhecimento disso, mas entendíamos que a secretaria do CEP poderia prosseguir com a indicação de relatoria on line no sistema. No entanto, o sistema só permite esta ação pelo coordenador ou pela figura de um subcoordenador. A CONEP não atendeu o pedido de cadastramento de subcoordenador naquele momento. Assim sendo, na época o projeto foi recebido no CEP de forma Off-line". Foi avaliado em reuniões ordinárias, entrou em pendência em 15/03/2013. Depois das pendências resolvidas o projeto foi aprovado e foi emitido parecer em 15/06/2013 (parecer já apreciado por este CEP). Neste momento, o sistema já reconhece a figura do subcoordenador e permitiu a submissão na categoria de projeto já avaliado e aprovado. Desta forma esta submissão é apenas para efeito de regularização junto a Plataforma Brasil. O projeto foi aprovado pela Comissão de ética da Secretaria Municipal de Saúde de Manaus. O projeto foi apresentado para o então secretário de saúde do Município de Coari que assinou uma carta de anuência. Assim sendo, considerando que o projeto iniciou as atividades tão logo foi aprovado (em 15/06/2013) relatório parcial em anexo a esta notificação, este CEP reconhece a aprovação prévia, bem como a autorização para a execução do estudo logo após a reunião do dia 15/06/2013.

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar

Bairro: S/N CEP: 69.040-010

UF: AM Município: MANAUS

Telefone: (92)3855-4774 E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br

ANEXO II



PREFETURA DE
MANAUS
SEMPRE AO SEU LADO

Saúde



Comissão de
Ética em
Pesquisa COEP

Manaus, 09 de setembro de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins de direito que a pesquisa intitulada **“Caracterização dos genótipos de HPV na população de rastreamento e em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas”** de responsabilidade da pesquisadora **Kátia Luz Torres** foi autorizada pela Comissão de Ética em Pesquisa dessa Secretaria - COEP/SEMSA.

Esse procedimento busca orientar-se com o item VII. 14, da Res. CNS n.º 196/96, em que:

“a revisão ética de toda e qualquer pesquisa envolvendo seres humanos não poderá ser dissociada de sua análise científica. Não se justifica submeter seres humanos a riscos inútilmente e toda a pesquisa envolvendo seres humanos envolve riscos”.

Contudo, considerando que a Comissão de Ética em Pesquisa COEP/SEMSA ainda está em fase de estruturação para dar início à validação junto ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP informamos que essa anuência deve ser encaminhada junto com o Projeto a um Comitê de Ética em Pesquisa devidamente cadastrado no COEP.


Nora Ney Rodrigues
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
COEP/SEMSA

Av. Mário Ypiranga Monteiro, Nº 1695 CEP - 69057-002
Telefone/Fax: 3236-8987 | e-mail: coep@pmm.am.gov.br

ANEXO III



**LAUDO DO TESTE RÁPIDO ONCO E6™
PARA DIAGNÓSTICO DO HPV**



Prezada Senhora, recentemente a senhora aceitou participar do estudo “Análise da estratégia de rastreamento do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM.”

Este estudo envolve a autocoleta seguida de um teste que indica a presença do vírus que pode causar o câncer do colo do útero. Em retorno à sua participação estamos enviando o resultado do seu teste. É importante que independente dos resultados deste exame a senhora continue fazendo os exames preventivos regulares, pois ainda estamos na fase de pesquisa deste teste.

MÉTODO: teste rápido Onco E6™. Referência: Schweitzer J, Lu OS, Mahoney CW, Berard-Bergoy M, Ho M, Ramasamy V, Silver JE, Bishit A, Labiad Y, Peck RB, Lim J, Jeronimo J, Howard R, Gravitt PE, Castle PE. Feasibility Study of a Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Test for Diagnosis of Cervical Precancer and Cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48:4646-8.

Nome da paciente:

Data de nascimento:

Local da coleta:

Data da coleta:

Data do exame:

RESULTADO DO TESTE ONCO E6™

- Negativo
 Positivo para HPV 16 E6
 Positivo para HPV 18 E6
 Inconclusivo

Dr. José Eduardo Levi
CRBio 23407-01/D

Dra Kátia Luz Torres Silva
CRF 930/AM

Qualquer dúvida sobre este resultado, entre em contato por telefone com Enfermeira Josiane Montanho (93610706) ou Dra. Danielle Rocha (81539191) ou Dra. Kátia Torres (81381098 ou 36554774-FCECON).

ANEXO III



FUNDAÇÃO CENTRO DE CONTROLE DE ONCOLOGIA
DO ESTADO DO AMAZONAS-FCECON



PCR PARA PAPILOMAVÍRUS HUMANO

PACIENTE:
DATA NASCIMENTO:
LOCAL DE COLETA:
DATA DA COLETA:
DATA DO EXAME:
MATERIAL: CÉLULAS VAGINAIS

MÉTODO DE COLETA:

- AUTOCOLETA**
 CITOLOGIA LÍQUIDA
 CITOLOGIA CONVENCIONAL

MÉTODO: Amplificação de fragmento de 450 pares de bases do gene L1 (capsídeo) por técnica de PCR. Referência: Gravitt, P. E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38:357-361.

RESULTADO : NÃO REATIVO

DR. JOSÉ EDUARDO LEVI

CRBio : 23.407/01-B

DR. KÁTIA LUZ TORRES SILVA

CRF AM 930

Qualquer dúvida sobre este resultado, entre em contato por telefone com a Enfermeira Josiane Montanho ((92) 9361-0706) ou Dra. Danielle Rocha (8153-9191) ou Dra. Kátia Torres (8138-1098 ou 3655-4774-FCECON).