

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA - ISB**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA- PPGBIOTEC**

**RENATO DOS SANTOS REIS**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE ALTO RISCO**  
**EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES DO MUNICÍPIO DE COARI,**  
**AMAZONAS**

**COARI – AM**

**2017**

RENATO DOS SANTOS REIS

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE ALTO RISCO  
EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES DO MUNICÍPIO DE COARI,  
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos

Co-Orientadora: Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha

COARI – AM

2017

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R375d Reis, Renato dos Santos  
Detecção e genotipagem de Papilomavírus Humano de alto risco em amostras cervicais de mulheres do município de Coari, Amazonas. / Renato dos Santos Reis. 2017  
72 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cristina Maria Borborema dos Santos  
Coorientadora: Danielle Albuquerque Pires Rocha  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Papillomavirus Humano. 2. Citologia em Meio Líquido. 3. Genotipagem. 4. Coari-Amazonas. I. Santos, Cristina Maria Borborema dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## **ATA DA DE DEFESA**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, José Dobles e Ronilsi Santos, pessoas honestas e humildes, que sempre me incentivaram à busca de conhecimentos e realização de meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida e por ser minha luz em todos os momentos.

Aos meus queridos e amados irmãos Dreik, Daniele, Dobles Jr e Diego e toda minha família por todo apoio e incentivo nestes anos.

À minha amada esposa, Maria da Paz, pelo companheirismo e amizade sempre estando ao meu lado com todo apoio e encorajamento durante essa trajetória.

Às minhas filhas Nicole Vitória (*In memoriam*) e Lauren Emanuely pela felicidade e descoberta do amor verdadeiro.

À Profa. Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha pela orientação, amizade, pelos valiosos ensinamentos, sempre me estimulando a continuar mesmo nas dificuldades, contribuindo para desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação profissional e pessoal.

À orientadora Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos pela confiança, amizade e pelas valiosas contribuições e ensinamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. MSc. Josiane Marinho Montañó pela amizade, pela indicação para desenvolver este trabalho, pela dedicação nas coletas e orientações de como desenvolver o trabalho.

À Profa. Dra. Kátia Luz Torres Silva pela amizade, pela oportunidade e confiança para que eu pudesse desenvolver este trabalho, pelo acolhimento ao grupo de pesquisa e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Levi pela amizade, pelo aprendizado e pela oportunidade em vivenciar novas tecnologias na qual foi possível realizar o processamento e análise das amostras no Laboratório de Virologia do IMT/SP e no Laboratório de Biologia Molecular da FOSP.

À toda equipe (de Coari/AM, Manaus/AM e São Paulo/SP) que não mediram esforços em realizar a coleta, processamento e análise das amostras.

Aos amigos Uatyla, Ricardo, Michel, Rafael, Maria Joana e Suzana, pela amizade, pela colaboração no trabalho e pelas discussões enriquecedoras dos trabalhos desenvolvidos.

À banca examinadora deste trabalho e a todos os professores que contribuíram com seus conhecimentos durante o curso da Pós-graduação.

Às todas as pacientes que aceitaram participar do estudo.

Às instituições que colaboraram em cada etapa para o desenvolvimento deste trabalho (UFAM, FAPEAM, SEMSA/COARI, SEMSA/MANAUAS, FCECON, IMT/SP e FOSP/SP).

E a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para o desenvolvimento e conclusão deste estudo.

## RESUMO

A infecção por HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo e a persistência do HPV de alto risco (hrHPV) é o principal fator etiológico para o desenvolvimento do Câncer do Colo do Útero (CCU). O CCU é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo. No Brasil, é o terceiro tipo mais prevalente e, na Região Norte, é a primeira neoplasia entre as mulheres. O exame citopatológico tem sido o método de escolha para o rastreamento das lesões precursoras e do câncer invasivo. A citologia em meio líquido (CML) e a detecção molecular do HPV têm sido consideradas estratégias promissoras para aumentar a eficácia do rastreamento. Este trabalho teve como objetivo detectar hrHPV em mulheres com citologia alterada e num grupo com citologia normal na cidade de Coari-Amazonas. Após consentimento, foram coletadas amostras cervicais de 455 mulheres em exame ginecológico de rotina nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Coari no período de setembro a dezembro de 2014. As amostras foram coletadas utilizando-se o kit de coleta de citologia em meio líquido - CML (BD *SurePath*<sup>TM</sup>). As lâminas citológicas foram confeccionadas nos equipamentos semi-automatizados BD *Prepmate*<sup>TM</sup> e *PrepStain*<sup>TM</sup>. Uma alíquota 0,5 mL foi separada para rastrear hrHPV pelo ensaio HPV BD *Onclarity*<sup>®</sup>, através do sistema *Viper* LT, que identifica seis tipos individualmente (16/18/31/45/51/52) e oito tipos por grupos de genótipos (P1: HPV33/58; P2: HPV56/59/66 e P3: HPV35/39/68). Nossos resultados mostraram que as lâminas confeccionadas por CML foram 99,3% classificadas como satisfatória e 7,3% (33/452) apresentaram resultados alterados. Os hrHPV foram detectados em 70,9% das citologias alteradas, sendo positivo em 77,3% das citologias classificadas como LSIL, 60% das citologias com HSIL, 50% das citologias com ASCUS e os genótipos mais encontrados foram o HPV 52 e o grupo de genótipos HPV P3. Dentre as 42 citologias normais selecionadas, 11,9% apresentaram infecção por hrHPV, sendo, também, os genótipos mais comuns o HPV 52 e o grupo de genótipos HPV P3. Estes dados, além de rastrear mulheres com real risco para o desenvolvimento do CCU e confirmar a presença e a diversidade genotípica de hrHPV nesta amostra feminina amazônica, reforça os estudos na literatura que apresentam a CML e os testes moleculares como ferramentas alternativas fundamentais no rastreio e, conseqüentemente, redução do CCU, principalmente em regiões onde existe um alto índice desta patologia.

**Palavras-chave:** Papilomavirus Humano, Citologia em Meio Líquido, Genotipagem, Coari-Amazonas

## ABSTRACT

HPV infection is the most common sexually transmitted infection worldwide and the persistence of high-risk HPV (hrHPV) is the major etiologic factor for the development of Uterine Cervical Cancer (UCC). CCU is the fourth most common type of cancer in women in the world. In Brazil, it is the third most prevalent type and, in the North, it is the first neoplasm among women. Cytological examination has been the method of choice for the screening of precursor lesions and invasive cancer. Liquid cytology (CML) and molecular detection of HPV have been considered as promising strategies to increase the effectiveness of screening. This study aimed to detect hrHPV in women with altered cytology and in a group with normal cytology in the city of Coari-Amazonas. After consent, cervical samples were collected from 455 women under routine gynecological examination at the Basic Health Units of the city of Coari from September to December 2014. The samples were collected using the cytology collection kit in liquid medium - CML (BD SurePath™). The cytopathological slides were prepared in the semi-automated BD PrepMate™ and PrepStain™ equipment. A 0.5 mL aliquot was separated to screen hrHPV by the HPV BD Onclarity® assay using the Viper LT system, which identifies six types individually (16/18/31/45/51/52) and eight types per group of genotypes ( P1: HPV33/58; P2: HPV56/59/66 and P3: HPV35/39/68). Our results showed that the blades made by CML were 99.3% classified as satisfactory and 7,3% (33/452) presented altered results. The hrHPV were detected in 70,9% of the cytologies altered, being positive in 77,3% of the cytologies classified as LSIL, 60% of the HSIL cytologies, 50% of the ASCUS cytologies and the most found genotypes were HPV 52 and group of HPV P3 genotypes. Among the 42 normal cytologies selected, 11,9% presented hrHPV infection, being also the most common genotypes HPV 52 and group of HPVP3 genotypes. These data, in addition to tracking women with a real risk for CCU development and confirming the presence and genotypic diversity of hrHPV in this Amazon female sample, reinforce studies in the literature that present CML and molecular tests as fundamental alternative tools in screening and, consequently, CCU reduction, especially in regions where there is a high index of this pathology.

Keywords: Human Papillomavirus, Liquid Cytology, Genotyping, Coari-Amazon

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional Vigilância Sanitária

ASC-H – Células Atípicas Escamosas, não podendo excluir lesão de alto grau, do inglês *Atypical Squamous Cells, cannot exclude HSIL*

ASCUS – Células Atípicas Escamosas de Significado Indeterminado, do inglês *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CC – Câncer Cervical

CCU – Câncer do Colo do Útero

CML – Citologia em Meio Líquido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DST – Doença Sexualmente Transmissível

EUA – Estados Unidos da América

FCECON – Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas

FDA – *Food and Drug Administration*

FOSP – Fundação Oncocentro de São Paulo

HPV – Papillomavírus Humano, do inglês *Human Papillomavirus*

hrHPV – Papillomavírus Humano de Alto Risco, do inglês *High Risk Human Papillomavirus*

HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau, do inglês *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Reseach on Cancer*

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IMT-SP – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

ISB – Instituto de Saúde e Biotecnologia

JEC – Junção Escamo-Celular

LCR – Região Longa de Controle, do inglês *Long Control Region*

LSIL – Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau, do inglês *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*

MS – Ministério da Saúde

NIC – Neoplasia Intra-epitelial Cervical

ORF – Regiões de Leitura Aberta, do inglês *Open Reading Frame*

pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RT – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, do inglês *Polymerase Chain Reaction Real Time*

PPGBIOTEC – Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

pRb – Proteína do Retinoblastoma

p53 – Proteína 53

PV – Papillomavírus

SEMSA – Secretaria Municipal de Saúde

SISCOLO – Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UBS – Unidade Básica de Saúde

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

USP – Universidade de São Paulo

VLP – Partícula Semelhante a Vírus, do inglês *Virus-like particles*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das diferentes regiões genômicas do HPV: 1 LCR e 8 ORFs (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2).....	18
<b>Figura 2:</b> Papilomavirus Humanos distribuídos em 5 gêneros.....	21
<b>Figura 3:</b> Representação ilustrativa do colo do útero e da Junção Escamo-Colunar.....	25
<b>Figura 4:</b> Infecção do Papillomavirus Humano.....	26
<b>Figura 5:</b> Ilustração esquemática de uma célula não infectada e uma célula infectada por hrHPV.....	27
<b>Figura 6:</b> Localização Geográfica do município de Coari, Amazonas – Brasil.....	35
<b>Figura 7:</b> Fluxograma dos Procedimentos Realizados no Estudo.....	37
<b>Figura 8:</b> Coleta de amostra cervical com a escova Rovers® Cervix Brush Combi.....	38
<b>Figura 9:</b> Kit de coleta de citologia em meio líquido SurePath™.....	38
<b>Figura 10:</b> Equipamentos semi-automatizados <i>PrepMate™</i> e <i>Prepstain™</i> .....	39
<b>Figura 11:</b> Equipamento automatizado BD <i>Viper LT™</i> .....	41
<b>Figura 12:</b> Processamento da amostra no equipamento <i>Viper LT</i> .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição segundo os dados sociodemográficos das mulheres amostradas no município de Coari, Amazonas, Brasil, 2014.....	45
<b>Tabela 2:</b> Distribuição segundo os dados relativos ao comportamento sexual das mulheres amostradas no município de Coari, Amazonas, Brasil, 2014.....	46
<b>Tabela 3:</b> Distribuição segundo os dados relativos à adequabilidade do material cervical coletado, epitélios representados nas lâminas e resultados da Citologia em Meio Líquido. Manaus, Amazonas, Brasil, 2015. ....	47
<b>Tabela 4:</b> Distribuição segundo os dados relativos às variáveis socioeconômicas e do comportamento sexual das participantes com citologia normal e com citologia alterada. Coari, Amazonas, Brasil, 2015.....	48
<b>Tabela 5:</b> Resultados relativos à infecção por HPV de alto risco nas mulheres com citologia normal e alterada detectados pelo BD Viper LT®. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017. ....	49
<b>Tabela 6:</b> Resultados relativos à infecção por HPV de alto risco nas mulheres com citologia alterada detectados pelo BD Viper LT®, de acordo com a categoria de alteração citológica. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017. ....	50
<b>Tabela 7:</b> Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do Papilomavírus Humano nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.....	51
<b>Tabela 8:</b> Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do Papilomavírus Humano nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.....	52

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Descrição e atuação das proteínas do Papillomavirus Humano.....	19
<b>Quadro 2:</b> Estudos sobre HPV realizados no Amazonas utilizando testes moleculares. ....	24
<b>Quadro 3:</b> Classificações Citológicas e Histológicas. ....	29
<b>Quadro 4:</b> Principais métodos utilizados na detecção do DNA de HPV. ....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Distribuição dos genótipos do hrHPV das mulheres com citologia normal e citologia alterada. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.....	50
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) .....	18
2.1.1 Estrutura e genoma do vírus .....	18
2.1.2 Classificação Taxonômica .....	20
2.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO – CCU .....	22
2.2.1 Epidemiologia do Câncer .....	22
2.2.2 Epidemiologia da Infecção pelo HPV .....	23
2.2.3 Infecção pelo HPV .....	25
2.2.4 Manifestações Clínicas do HPV .....	27
2.3 DIAGNÓSTICO .....	28
2.3.1 Métodos de rastreio das lesões precursoras do CCU .....	28
2.3.2 Detecção do DNA do HPV .....	31
2.3.3 Vacinas contra o HPV .....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivo Geral .....	34
3.2 Objetivos Específicos .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 População do Estudo .....	35
4.2 Caracterização do Estudo e Aspectos Éticos .....	36
4.3 Cálculo Amostral .....	36
4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão .....	36
4.5 Coleta de Dados, de Amostras e Procedimentos de Análise das amostras .....	37
4.6 Análise Estatística .....	43
<b>5 RESULTADOS</b> .....	44
5.1 Características Gerais da Amostra .....	44
5.2 Resultados Citológicos .....	47
5.3 Resultados do Teste Molecular .....	49
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
<b>ANEXO A</b> – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON .....	70
<b>ANEXO B</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	71
<b>ANEXO C</b> – Questionário .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção por Papilomavirus Humano (HPV – do inglês *Human Papillomavirus*) é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum em todo o mundo e a maioria das pessoas sexualmente ativas, homens e mulheres, terá contato com o vírus durante algum momento da vida (SERRANO et al., 2018). No entanto, a maioria das infecções por HPV são transitórias e não progridem ao câncer (DOORBAR, 2016a).

A infecção persistente pelo Papilomavirus Humano de alto risco (hrHPV – do inglês *high risk Human Papillomavirus*) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do Câncer do Colo do Útero (CCU), dentre outros tipos de câncer (WHEELER et al., 2013; DOORBAR et al., 2016). Devido a esse fator, o hrHPV pode desenvolver transformações intraepiteliais progressivas no colo do útero que podem evoluir para lesões precursoras do câncer, as quais, se não diagnosticadas precocemente e tratadas adequadamente, evoluem para neoplasia maligna (BRASIL, 2016b; DOORBAR, 2016a).

O principal método para o diagnóstico precoce das lesões intraepiteliais cervicais é através da citologia oncótica, também conhecida como exame Papanicolau ou citologia convencional, o qual permite que seja efetuada a detecção das lesões precursoras e da doença em estágios iniciais em mulheres assintomáticas, impedindo a progressão do câncer (ARAÚJO et al., 2014). Por isso, tem sido largamente utilizada no rastreamento do CCU em todo mundo (PATEL; PANDYA; MODI, 2011).

Apesar do sucesso na prevenção do CCU, a citologia convencional apresenta limitações na técnica, tais como má qualidade das amostras e erros de interpretação das lâminas resultando em diagnósticos falso-negativos, que levam a implicações médicas e legais. Na busca de maior sensibilidade para o método, novas técnicas de coleta e preparo do material foram desenvolvidas e, assim, a Citologia em Meio Líquido (CML) foi introduzida diminuindo as falhas da citologia convencional por meio de equipamentos semi-automatizados, resultando em uma citologia em camada fina (STABILE et al., 2012; PRIMO; CORRÊA; BRASILEIRO, 2017). O método diminui os fatores que costumam limitar a qualidade da amostra, como por exemplo, a presença de hemácias, exsudato inflamatório e muco. Permite ainda a utilização do material residual para o preparo de lâminas adicionais e/ou colorações especiais a partir do mesmo material, sem necessidade de se convocar a paciente para nova coleta, além da preservação de moléculas proteicas e ácidos nucléicos no frasco de coleta da amostra que poderão ser utilizados posteriormente em testes biomoleculares (COLONELLI, 2014; PRIMO; CORRÊA; BRASILEIRO, 2017).

Os testes moleculares para HPV também têm sido propostos como método de triagem para identificar mulheres com risco aumentado para o desenvolvimento do CCU, os quais permitem a detecção do DNA do HPV nessas lesões, possibilitando identificar e classificar o HPV em seus tipos e subtipos (CASTRO, 2004; WOLSCHICK et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2013; BOSCH et al., 2013; EGAWA et al., 2015; SERRAVALLE et al., 2015).

A prevenção do CCU 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 (BRASIL, 2015a). Diante disso, o rastreamento das lesões precursoras por CML e do HPV por teste molecular constituem alternativas promissoras e de enorme valor regional, visto que a CML consiste numa ferramenta que aumenta o diagnóstico de lesões graves e que para os testes moleculares há uma menor exigência quanto à qualidade da amostra para o teste molecular. Assim, ambas tecnologias se tornam ferramentas valiosas para aumentar a taxa de cobertura do rastreamento e contribuir na redução da incidência desta neoplasia, que é passível de detecção precoce e tratamento adequado (GAGE et al., 2011; QUEIROZ et al., 2015).

Nesse contexto, este estudo propôs-se a investigar os genótipos de HPV de alto risco em citologias alteradas e citologias normais de mulheres da cidade de Coari - Amazonas, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de rastreamento das lesões precursoras e do câncer de colo de útero em nossa região.

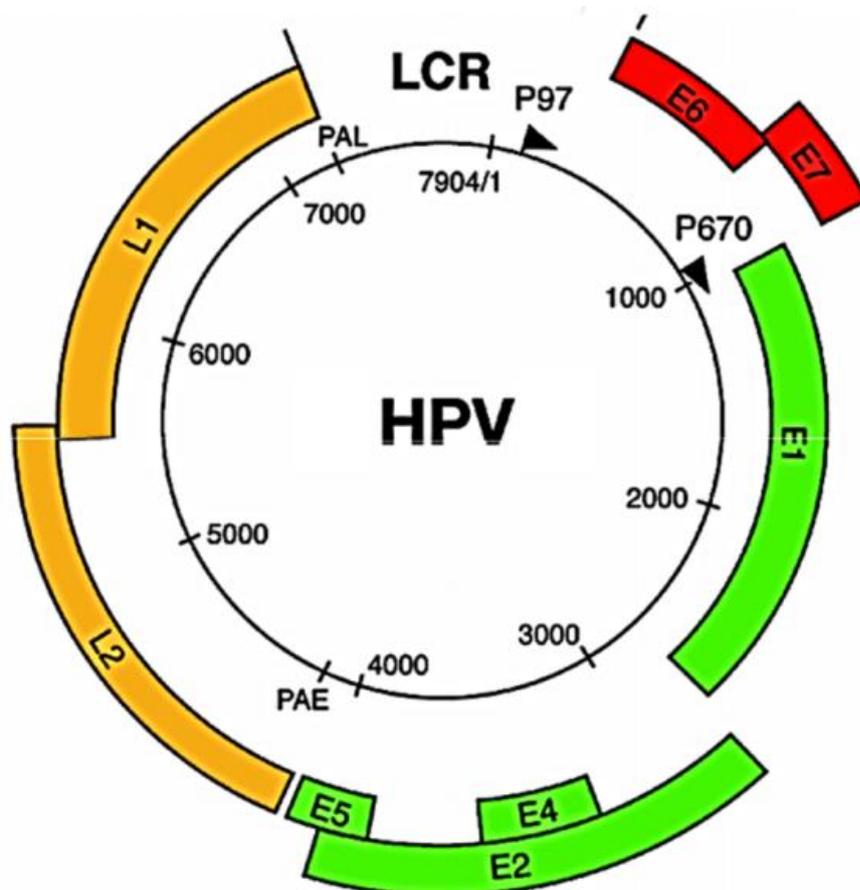
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

#### 2.1.1 Estrutura e genoma do vírus

O HPV é um pequeno vírus epiteliotrópico que mede, aproximadamente, 55 nm de diâmetro, não revestido por envelope lipídico e que possui capsídeo icosaédrico, formado por 72 pentâmeros da principal proteína estrutural, L1, e de quantidades variáveis (até 72 cópias) da proteína estrutural menor, L2. Seu genoma (Figura 1) é constituído por um DNA circular de dupla-fita, de aproximadamente 8.000 pares de bases (pb), composto por 8 ou 9 regiões abertas de leitura (*ORF – Open Reading Frame*) e uma região reguladora (*LCR – Long Control Region*) (DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR et al., 2016a).

**Figura 1:** Representação esquemática das diferentes regiões genômicas do HPV: 1 LCR e 8 ORFs (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2)



Fonte: Doorbar, 2012.

O genoma do HPV está organizado em três regiões: a região precoce (E - *early*) que codifica as proteínas que atuam na replicação viral (E1, E2 e E4) e na transformação oncogênica (E5, E6 e E7), a região tardia (L - *late*) que codifica as proteínas estruturais do capsídeo, L1 e L2, e a região reguladora (*LCR – Long Control Region*) que controla a replicação e expressão genética do vírus (quadro 1). Apesar da variação no tamanho e no número de ORFs, os PVs possuem genes bem conservados (E1, E2, L1 e L2) e genes com maior diversidade (E6, E7, E5, E E4) (LAJER E BUCHWALD, 2010; MORSHED et al., 2014).

**Quadro 1:** Descrição e atuação das proteínas do Papilomavirus Humano.

Proteínas Precoces	
E1	Helicase dependente de ATP. Atua na replicação do genoma do papillomavírus.
E2	Co-ativador da replicação do genoma viral através do recrutamento de E1 para a origem da replicação viral. Fator de transcrição de E6 e E7, também importante para a segregação do genoma viral.
E4	E4 é incorporado dentro do gene E2 e é expresso abundantemente como uma proteína de fusão E1 <sup>E4</sup> durante os últimos estádios do ciclo de vida viral. Liga-se a filamentos de citoqueratina e rompe a sua estrutura. E4 também contribui para a liberação e transmissão do vírus.
E5	Pequena proteína transmembranar. Em Alfa-PVs, E5 interage com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e ativa a via de sinalização mitogênica. Tem um papel na evasão da resposta imune e apoptose. Os gêneros Beta-, Gamma- e Mu-PVs não possuem o gene E5.
E6	Conduz o acesso ao ciclo celular para permitir a amplificação do genoma nas camadas basais do epitélio. E6 de tipos Alfa-PV de alto risco liga e degrada a p53 e também pode ativar a telomerase e contribui para a transformação. Também está envolvido na evasão imune. Alguns Gamma-PVs não possuem o gene E6.
E7	Conduz o acesso ao ciclo celular para permitir a amplificação do genoma nas camadas basais do epitélio. E7 dos tipos Alfa-PV de alto risco se liga e degrada a pRb e pode induzir instabilidade cromossômica. E7 é necessário para a transformação de células. Tanto E6 como E7 têm um grande número de substratos celulares, com a identidade destes substratos diferindo entre os tipos de HPV.
Proteínas Tardias	
L1	Proteína principal do capsídeo. Reúne-se em capsômeros pentoméricos, que são os componentes primários do revestimento icosaédrico do virião.
L2	Proteína menor do capsídeo. Envolvido na encapsulação do DNA viral. Facilita a entrada e o tráfego do vírus ao núcleo.

**Fonte:** EGAWA et al., 2015.

### 2.1.2 Classificação Taxonômica

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), a família *Papillomaviridae* contém 16 gêneros e os Papilomavírus Humanos estão distribuídos entre os gêneros *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Mu-papillomavirus* e *Nu-papillomavirus* (BERNARD, 2005; DOORBAR et al., 2016b).

Além da classificação taxonômica em família, gênero e espécie, os Papilomavírus (PV) são classificados em genótipos, subtipos e variantes, baseando-se em análises da sequência de DNA da região L1 do genoma do vírus. Esse gene corresponde ao gene mais conservado do genoma dos PVs e tem sido utilizado para identificação de novos tipos virais nas últimas décadas (DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR et al., 2016a). Os gêneros da família *Papillomaviridae* apresentam entre si uma diferença maior que 40% na sequência nucleotídica do gene L1, enquanto as espécies apresentam diferença entre 30% e 40% e são classificados conforme a espécie de hospedeiro natural. São considerados tipos, os PV que apresentam diferença do outro em pelo menos 10% na sequência de nucleotídeos do gene L1 e considerado subtipo quando diferem entre 2-10% daquela do genótipo mais próximo. As variantes de genótipos de PV são aquelas que diferem em menos de 2% na sequência de nucleotídeos de L1 e em 5% na LCR (BURD, 2003; DE VILLIERS et al., 2004; CAMARA, 2008; EGAWA et al., 2015).

A figura 2 mostra a relação evolutiva entre os HPV, os quais estão distribuídos em cinco gêneros, com o *Alpha*, *Beta* (azul) e *Gamma-papillomavirus* (verde) representando os maiores grupos. Os HPV do gênero *Alpha-papillomavirus* são classificados como de baixo risco cutâneo (castanho), baixo risco mucosotrófico (amarelo) ou de alto risco (rosa) de acordo com sua associação com o desenvolvimento de câncer. Os tipos de alto risco destacados com texto vermelho são confirmados como "carcinogêneos humanos" com base em dados epidemiológicos. A árvore evolutiva é baseada no alinhamento dos genes E1, E2, L1, e L2 (EGAWA et al., 2015).

Atualmente, mais de 300 papilomavírus foram identificados e completamente sequenciados, incluindo mais de 200 papilomavírus humanos (EGAWA, 2015; CHEN, WALLIN, DUAN, 2015). Destes, cerca de 40 tipos infectam o trato anogenital feminino e, de acordo com seu potencial de transformação neoplásica, são classificados em HPV de baixo risco ou de alto risco. Os HPV de baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81) estão envolvidos em neoplasias benignas, como verrugas genitais e lesões intraepiteliais de baixo grau de improvável progressão para malignidade, e os HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35,



## 2.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO – CCU

### 2.2.1 Epidemiologia do Câncer

O câncer do colo do útero (CCU) ainda representa um grande problema de saúde pública. Mundialmente, é o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina e corresponde a 7,5% de todas as mortes por câncer entre as mulheres (GLOBOCAN, 2012; DE MARTEL et al., 2017; BRASIL, 2018). Em 2012, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer - *International Agency Research on Cancer* (IARC), a estimativa foi de 528.000 novos casos/ano e 266 mil mortes/ano em todo o mundo (GLOBOCAN, 2012; BRUNI et al., 2017). Em 2013, foram diagnosticadas 485.000 mulheres com câncer cervical em todo o mundo e que causou 236.000 óbitos (FITZMAURICE, 2015).

Quase nove (87%) em cada dez mortes por câncer cervical ocorrem nas regiões menos desenvolvidas do planeta, provavelmente devido ao menor acesso aos cuidados de saúde para detecção e tratamento precoce de lesões. A mortalidade varia entre as diferentes regiões do mundo, como por exemplo em regiões desenvolvidas, Ásia Ocidental, Europa Ocidental e Austrália/Nova Zelândia, onde as taxas variam de menos de 2 casos a cada 100.000 mulheres e nas regiões em desenvolvimento ocorre para mais de 20/100.000 mulheres, como na África Central (22,2/100.000) e África Oriental (27,6/100.000) (GLOBOCAN, 2012; DE MARTEL et al., 2017).

A estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) aponta que o CCU é a terceira neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres brasileiras. Para o biênio 2018-2019, estimam-se 16.370 novos casos/ano, com um risco de 15,43 casos a cada 100.000 mulheres. Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, estima-se que o CCU é o mais incidente na Região Norte (25,62/100 mil). Nas Regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil), ocupa a segunda posição; enquanto, nas Regiões Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil), ocupa a quarta posição. No Amazonas os números são mais preocupantes, pois a incidência projetada para o Estado é de 41/100.000 e de 58/100.000 para Manaus (BRASIL, 2018).

Segundo o INCA, em 2015 ocorreram 5.727 óbitos por CCU em todo o Brasil e, de acordo com o banco de dados Fundação de Vigilância Sanitária do Amazonas, foram registradas 290 mortes por CCU no estado em 2017 (BRASIL, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é possível reduzir, em média, de 60% a 90% a incidência do CCU com uma cobertura da população-alvo de, no mínimo, 80% e com a garantia de diagnóstico e tratamento adequados dos casos alterados. A experiência de alguns países desenvolvidos, tais

como Estados Unidos, Canadá, Austrália, França e Holanda, mostra que a incidência desta neoplasia foi reduzida em torno de 80% onde o rastreamento citológico foi implantado com qualidade, cobertura, tratamento e seguimento das mulheres (BRASIL, 2016a; FORMAN et al., 2012).

### **2.2.2 Epidemiologia da Infecção pelo HPV**

A prevalência da infecção pelo HPV ocorre geralmente em jovens abaixo dos 25 anos (BOSCH et al., 2013). Aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo apresentam infecção por HPV em algum período da vida, correspondendo a uma prevalência de 10,4%. Entretanto, mais de 90% dessas novas infecções por HPV é transitória, ou seja, regridem espontaneamente em aproximadamente 24 meses e numa pequena parte dessas pessoas contaminadas, de 5 a 10%, as infecções progridem devido à infecção persistente de hrHPV, podendo desenvolver as lesões pré-cancerosas, das quais, se não houver um diagnóstico precoce, as lesões podem evoluir para o CCU (BRASIL, 2015a; DOOBAR et al., 2012).

Em 2010, um estudo de metanálise realizado no Brasil registrou um perfil de prevalência da infecção por hrHPV entre 11-15% na população feminina citologicamente normal (AYRES; SILVA, 2010). No entanto, alguns estudos, utilizando testes moleculares para a detecção do HPV, mostram um percentual de 14,6% até 37,1% da infecção por HPV em mulheres em exame ginecológico de rotina (PINTO; FUZII; QUARESMA, 2011; SANTOS et al., 2013; ENTIAUSPE et al., 2014; CECCATO JUNIOR et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016).

Alguns estudos realizados no Estado do Amazonas, utilizando testes biomoleculares, mostram uma prevalência da infecção variando de 15 a 39,7% em amostras de mulheres citologicamente normais e de até 100% em amostras de mulheres com citologias alteradas (quadro 2).

**Quadro 2:** Estudos sobre HPV realizados no Amazonas utilizando testes moleculares.

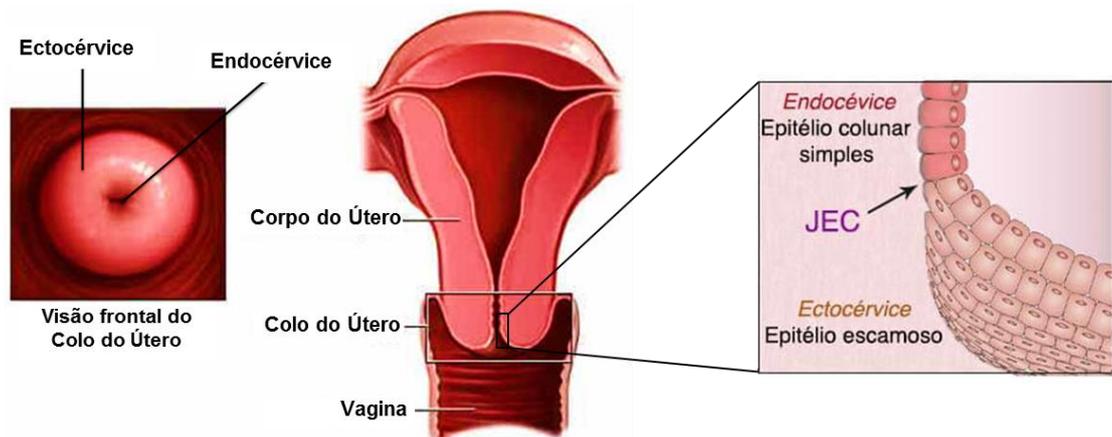
<b>Autores</b>	<b>Local</b>	<b>Amostra</b>	<b>População</b>	<b>Prevalência (n)</b>	<b>Técnica</b>
CORRÊA, 2005	Manaus/AM	Cervical	Mulheres portadoras de HSIL e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino	100% (42*)	Nested-PCR (MY09/11 GP5+/GP6+)
BRASIL, 2008	Manaus/AM	Cervico-Vaginal	Mulheres atendidas em clínica de IST	64,2% (301/469)	Captura híbrida
LIRA, 2010	Manaus/AM	Cervical	Mulheres com resultado citopatológico inflamatório	48,78% (80/164)	Nested-PCR (MY09/11 GP5+/GP6+)
			Mulheres com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero	94,74% (144/152*)	
CASTRO et al., 2011	Manaus/AM	Cervical	Mulheres sem diagnóstico de alterações citológicas	6,5% (4/61)	PCR - MY09/11
			Mulheres com lesões citológicas pré-malignas e malignas	38,5%* (32/83)	
ROCHA et al., 2013	Coari/AM	Cervical	Mulheres em exame ginecológico de rotina	29,1% (105/361)	Nested-PCR (MY09/11 GP5+/GP6+)
MARIÑO, 2015	Coari/AM	Cervico-Vaginal	Mulheres ribeirinhas	19,1% (79/412)	PCR PGMY09/11
TEIXEIRA, 2015	Manaus/AM	Esfregaço Cervical	Mulheres HIV positiva	31,1% (93/299**)	PCR - BD Onclarity®
QUEIROZ et al., 2015	Manaus/AM	Cervical	Mulheres com lesão intraepitelial	28,6% (20/70*)	Nested-PCR (MY09/11 GP5+/GP6+)
FONSECA et al., 2015	Região Norte do Amazonas	Cervical	Mulheres indígenas	39,7% (255/643)	PCR NGS
SILVA et al., 2015	Manaus/AM	Cervical	Mulheres HIV positiva	61,6% (191/310**)	HC2 DIGENE®
COSTA-LIRA et al., 2017	Manaus/AM	Cervical	Mulheres em exame ginecológico de rotina	36,56 (48/133)	Nested-PCR (MY09/11 GP5+/GP6+)
			Mulheres com alterações cervicais	93,88% (44/47*)	
NUNES, 2018	Coari/AM	Cervico-Vaginal e Urina	Mulheres gestantes	24,6% (27/110)	PCR - PGMY09/11
TORRES et al., 2018	Coari/AM	Cervico-Vaginal	Mulheres ribeirinhas	19,1% (79/412)	PCR - PGMY09/11

### 2.2.3 Infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV se inicia na camada basal da pele ou mucosa – onde estão presentes as células menos diferenciadas do epitélio escamoso e que ainda possuem atividade mitótica – em decorrência da interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da superfície celular (ROSA et al., 2009; BOSCH et al., 2013; KRANJEC, DOORBAR, 2016).

No colo uterino, o HPV infecta as células da junção escamo-colunar (JEC) ou em regiões com microlesões que podem ocorrer durante a prática sexual (DOORBAR, 2005; DOORBAR, 2016b). O colo do útero, que corresponde à extensão inferior do útero, apresenta uma parte interna, denominada canal cervical ou endocérvice, o qual é revestido por uma camada única de células cilíndricas produtoras de muco – epitélio colunar simples – e uma parte externa, que mantém contato com a vagina, chamada de ectocérvice e é revestida por um tecido de várias camadas de células planas – epitélio escamoso e estratificado. Entre esses dois epitélios, encontra-se a JEC, que é uma linha que pode estar tanto na ecto como na endocérvice, dependendo da situação hormonal da mulher (figura 3) (KIERSZENBAUM, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BRASIL, 2013).

**Figura 3:** Representação ilustrativa do colo do útero e da Junção Escamo-Colunar.

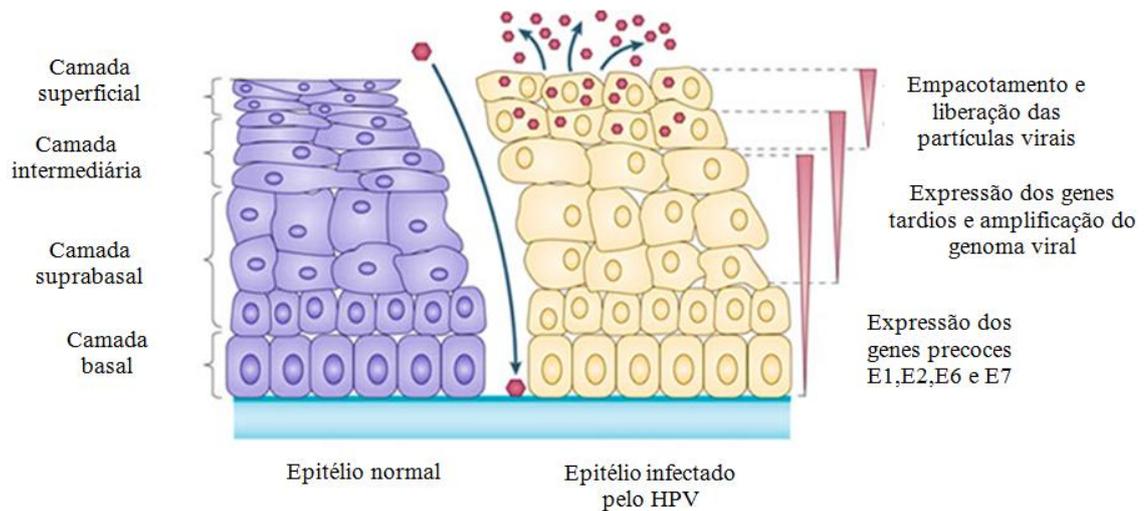


**Fonte:** Anatomia do Útero (2018) - Adaptado

Depois de entrar na célula, o vírion perde seu capsídeo, expondo seu DNA (na forma episomal) à ação de enzimas nucleares da célula hospedeira, o que favorece a expressão dos genes virais. Após divisão celular, uma das células filhas permanece na camada basal fornecendo um reservatório de DNA, enquanto a outra célula migra para a camada suprabasal iniciando a diferenciação com subsequente amplificação do DNA viral e expressão dos genes

tardios. Nas camadas superiores do epitélio ocorre o empacotamento e liberação das partículas virais (figura 4) (FRAZER, 2004; DOORBAR et al., 2012).

**Figura 4:** Infecção do Papillomavirus Humano.

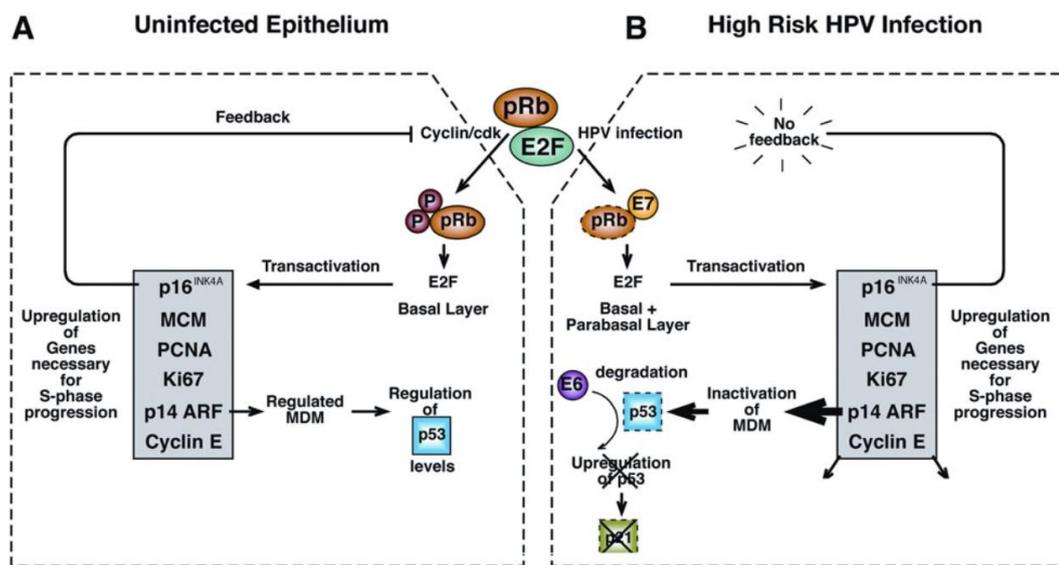


**Fonte:** Moody; Laimins (2010).

O desenvolvimento das lesões precursoras e do CCU causadas por HPV está relacionada às proteínas E6 e E7, que interrompem as vias moleculares que regulam a diferenciação epitelial e a proliferação celular. Na figura 5, podemos observar que a progressão do ciclo celular é regulada nas diferentes camadas epiteliais por membros da família de proteínas pRb (retinoblastoma). As proteínas E7 de tipos de hrHPV podem ter como alvo membros dessa família de proteínas para degradação (mostrada em B). Isso libera os membros da família dos fatores de transcrição E2F, que permite que as células basais e parabasais entrem na fase S. No epitélio não infectado (mostrado em A), a liberação de E2F é dependente de fatores de crescimento externos, que estimulam a atividade da ciclinaD/cdk para permitir a fosforilação da pRb e a liberação de E2F. A expressão de proteínas celulares envolvidas na progressão do ciclo celular é regulada pelo p16INK4A, que está envolvido em um loop de feedback negativo, suprimindo a atividade do ciclinaD/cdk. Acredita-se que a incapacidade de tipos de HPV de baixo risco conduzirem à proliferação celular basal robusta, deve-se ao fato de que esses tipos podem atingir apenas eficientemente o membro da família de retinoblastoma p130, que controla a entrada suprabasal, mas não a do ciclo celular basal. Acredita-se que as proteínas E7 de alto risco tenham como alvo todos os membros da família pRb. Além do E7, os hrHPVs codificam uma segunda proteína envolvida na entrada no ciclo celular. Esta é a proteína E6, que atua para suprimir o aumento da p53 que, de outra forma,

ocorreria após elevação mediada por E7 nos níveis de p14. (mostrado em B) A p14 elevada leva à inativação da proteína MDM que normalmente está envolvida na degradação da p53. As proteínas E6 de alto risco regulam diretamente os níveis de p53 na célula, mediando sua ubiquitinação e degradação através da via proteossômica. Em células não infectadas (mostradas em A), os níveis de p53 são mantidos em um nível baixo, em parte como resultado da atividade normal da MDM (GRIFFIN et al., 2015; DOOBAR et al., 2016; KRANJEC; DOORBAR, 2016).

**Figura 5:** Ilustração esquemática de uma célula não infectada e uma célula infectada por hrHPV.



Fonte: DOOBAR et al. (2016).

## 2.2.4 Manifestações Clínicas do HPV

A infecção pelo HPV pode ocorrer em três formas distintas: clínica, subclínica e latente. As formas clínicas correspondem às lesões benignas causadas pelos HPV de baixo risco na região vulvo-vaginal, como exemplo o condiloma acuminado e as verrugas e papilomas genitais. O condiloma acuminado apresenta-se como lesões solitárias ou múltiplas, que às vezes coalescem; afetam a região perineal, vulvar e perianal, assim como a vagina, e menos frequentemente, o colo. As verrugas e papilomas genitais também podem se apresentar únicas ou múltiplas e têm aspecto clínico característico de lesões em “couve-flor”, brancas ou rosa pálido, dependendo do grau de ceratinização. (QUEIROZ, CANO, ZAIA, 2007; ROCHA, 2012). Na forma latente não existem evidências clínicas, citológicas, colposcópicas ou histológicas desta infecção. A infecção é detectada através de técnicas de biologia

molecular que tenham como alvo o DNA ou proteínas virais, pois não há lesões. A infecção pelo HPV depois de instalada pode estacionar, regredir ou progredir, dando origem às displasias e/ou carcinomas (FERRAZ, SANTOS, DISCACCIATI, 2012; SCHIFFMAN, 2016).

A forma subclínica é o diagnóstico a partir de alterações visualizadas no exame citológico, colposcópico ou no resultado histopatológico de uma biópsia. As alterações celulares são as lesões precursoras do CCU denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) ou lesões intraepiteliais escamosas (*SIL–squamous intraepithelial lesions*), classificadas como de alto ou baixo grau. As lesões de baixo grau (NIC I ou *Low SIL*) correspondem às alterações morfológicas associadas à replicação ativa do HPV enquanto as lesões de alto grau (NIC II, NIC III ou *High SIL*) indicam a transformação celular, caracterizada principalmente por alterações nucleares (WOLSCHICK et al., 2007; DOOBAR et al., 2016).

A infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico é o principal fator para o CCU, porém, outros fatores de risco importantes também estão relacionados para o desenvolvimento do câncer cervical, tais como: a idade, imunidade, genética, situação conjugal, baixa condição socioeconômica, início precoce da atividade sexual, multiplicidade de parceiros sexuais, multiparidade, infecções sexualmente transmissíveis (IST), dentre outros co-fatores (QUEIROZ, CANO, ZAIA, 2007; CUNNINGHAM et al., 2015; AUDI et al., 2016).

## **2.3 DIAGNÓSTICO**

### **2.3.1 Métodos de rastreio das lesões precursoras do CCU**

#### **2.3.1.1 Citologia Convencional – Exame Papanicolau**

A citologia cervical, introduzida na década de 1940 por Papanicolau para prevenção e diagnóstico precoce do CCU, é o exame ginecológico que se baseia na esfoliação de células do colo uterino para avaliação da sua morfologia. Neste exame, podem ser visualizadas alterações que o HPV pode causar nas células, mas ele não é capaz de diagnosticar a presença do vírus (SCHIFFMAN et al., 2011). A estratégia governamental brasileira para controle do CCU tem se concentrado no rastreamento de mulheres de 25 a 64 anos, com periodicidade de 3 anos, após 2 exames anuais consecutivos com resultado normal (BRASIL, 2016b).

A coleta cervical é realizada sob controle visual iniciando-se com a colocação de um espéculo vaginal seguido da raspagem da ectocérvice com espátula de madeira (Ayre) e da

endocérvice com a escovinha de náilon, a *citobrush*. Posteriormente, as amostras são espalhadas sobre uma lâmina de microscopia e fixadas em álcool etílico a 95% para envio ao laboratório, onde são coradas e lidas por citotécnicos e citopatologistas de acordo com o sistema de classificação das células alteradas (quadro 3) (NAYAR; WILBUR, 2015; BRASIL, 2016b).

**Quadro 3:** Classificações Citológicas e Histológicas.

Classificação Citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação Histológica da OMS (1952)	Classificação Histológica de Richart (1967)	Classificação Histológica de Bethesda (2001)	Classificação Citológica Brasileira (2006)
Classe I	-	-	-	-
Classe II	-	-	-	Alterações Benignas
Classe III	Displasia Leve	NIC I*	LIEBG	LIEBG
	Displasia Moderada e Acentuada	NIC II e NIC III	LIEAG	LIEAG
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	LIEAG	LIEAG Adenocarcinoma <i>in situ</i>
Classe V	CEC	CEC	CEC	CEC

\*Inclui efeito citológico pelo HPV.

CEC = carcinoma espinocelular; LIEAG = lesão intraepitelial de alto grau; LIEBG = lesão intraepitelial de baixo grau; NIC = neoplasia intraepitelial cervical.

**Fonte:** Barbosa; Sartori (2013).

O sistema Bethesda é atualmente utilizado no diagnóstico citológico de amostras provenientes do colo uterino permitindo a classificação das células anormais em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau – LSIL e lesões intraepiteliais escamosas de alto grau - HSIL (NAYAR; WILBUR, 2015; BRASIL, 2016b). A citologia cervical juntamente com a colposcopia e o exame histopatológico formam o conjunto diagnóstico na busca das lesões precursoras e da neoplasia invasora do colo uterino (SANTOS, MORENO, PEREIRA, 2009).

O exame citopatológico, como ferramenta de rastreio, proporcionou importante redução na mortalidade ao detectar as lesões precursoras do câncer e possibilitar o tratamento precoce, principalmente onde a sua aplicação foi organizada (COLONELLI, 2014). No entanto, a sensibilidade da citologia cervical para detectar lesões de alto grau num único exame é relativamente baixa (50%), com número de falso-negativos que varia de 20 a 40% (STABILE et al., 2012). 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. Seu resultado também pode ser associado com a colposcopia para localizar e determinar lesões epiteliais para confirmar o que foi detectado pela citologia (RAMA et al., 2008). Nesse contexto, motivou-se a busca por inovações referente ao método convencional e, assim, foi desenvolvida a técnica de citologia em meio líquido (CML).

### **2.3.1.2 Citologia em Meio Líquido (CML)**

A citologia em meio líquido (CML), aprovada em 1996 pelo *Food and Drug Administrations* (FDA) nos Estados Unidos, trata-se de uma metodologia que contribui para a melhoria no tratamento clínico do câncer através de um aumento da sensibilidade na detecção, no diagnóstico da doença (SIMION et al., 2014). A coleta ocorre como na citologia convencional, no entanto, utiliza-se uma escova específica para a coleta do material cervical e a confecção das lâminas citológicas é realizada através de equipamentos semi-automatizados (FILIPA, 2013). No Brasil, a CML está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, sendo um procedimento aceito pelo Ministério da Saúde, que consta como opção de método citológico na base de dados do Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero – SISCOLO (SALES, 2015).

Neste método, o material coletado é colocado no frasco contendo um fixador, que possui uma solução conservante à base de álcool, que serve como veículo de transporte, conservante e meio antibacteriano para amostras ginecológicas (COLLAÇO; ZARDO, 2008). Dependendo do fabricante, as escovas possuem formas diferentes. No caso das escovas desenvolvidas pela BD Diagnostics<sup>®</sup>, é possível retirar a cabeça da escova, a qual é totalmente removível, e colocá-la no frasco. Posteriormente, o material coletado é encaminhado ao laboratório para processamento, possibilitando a realização de novas lâminas e testes moleculares com o material residual, sem necessidade de nova coleta (COLLAÇO; ZARDO, 2008; LUCENA, 2011).

O processo é baseado no enriquecimento celular com separação e redução da quantidade de materiais interferentes que possam causar obscurecimento na leitura (tais como sangue, muco e células inflamatórias), preservando a interpretação do fundo e proporcionando uma melhor e mais rápida visualização das células de interesse para o diagnóstico. Não há necessidade de etapas extras durante o processamento para aquelas amostras com excesso de sangue ou muco, o que torna o procedimento mais padronizado, levando a resultados mais standardizados e confiáveis (COLLAÇO; ZARDO, 2008; MISHRA et al., 2015; STABILE et al., 2012).

O método, além de diminuir os fatores que costumam limitar a qualidade da amostra, permite ainda a utilização do material residual para o preparo de lâminas adicionais e/ou colorações especiais a partir do mesmo material, sem necessidade de se convocar a paciente para nova coleta (COLONELLI, 2014). Outra vantagem é a oportunidade de utilização do material coletado para citologia líquida para outros testes moleculares, onde podem ser realizados exames para detecção de diversos patógenos sexualmente transmissíveis, incluindo a análise molecular para detecção e genotipagem do HPV (SIMION et al., 2014).

### 2.3.2 Detecção do DNA do HPV

A identificação direta do DNA do HPV é atualmente o método de escolha para a detecção deste vírus em esfregaços ou amostras de tecidos. Alguns métodos para a detecção do DNA do HPV possibilitam a quantificação e a genotipagem do vírus (quadro 4) (BICCA, 2013).

**Quadro 4:** Principais métodos utilizados na detecção do DNA de HPV.

Método	Como Funciona	Aplicações	Utilidades
Reação em cadeia da Polimerase (PCR – do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	Síntese enzimática de DNA, gerando multiplicação de um determinado fragmento de ácido nucléico (DNA/RNA) usado como molde	- Detecção de HPV e de outras IST. - Neoplasias/mutações genéticas	Quando há diagnóstico citológico díspares; discordância entre citologia e coloscopia; identificação de subtipos de HPV.
Captura Híbrida	Utiliza sondas de RNA complementar ao material genético em questão; os híbridos formados são quantificados por quimioluminescência.	HPV	Diagnóstico citológico díspares; discordância entre citologia e coloscopia; avaliação quantitativa do vírus; controle terapêutico de lesões HPV induzidas.
Hibridização <i>in situ</i>	Permite a identificação de ácidos nucleicos em meio intracelular também com o pareamento complementar de sondas.	HPV	Localização da infecção (tipo histológico afetado); suspeita de evolução da doença (incorporação do material genético viral ao DNA celular como marcador prognóstico).

**Fonte:** Bonfietto (2013).

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) detecta, com alta sensibilidade e especificidade, a presença do DNA do HPV em células, tecidos e fluidos corporais sendo capaz de identificar a presença de praticamente todos os tipos de HPV

existentes (SERRAVALLE et al., 2015). Este método permite escolher iniciadores específicos do tipo de HPV (regiões únicas para cada tipo, com base nas variações de sequência presentes nos genes E6 e E7 dos subtipos de HPV), possibilitando a identificação do genótipo do HPV, ou então podem ser escolhidos *primers* universais para regiões conservadas ou comuns do genoma do HPV, como a L1, permitindo assim detectar um painel de diferentes tipos de HPV em uma única reação (WOLSCHICK et al., 2007).

A PCR em tempo real (qPCR), por sua vez, é uma variação do método de PCR convencional, a qual é monitorada, em tempo real, por um detector de emissão de fluorescência e um computador, interligado ao termociclador, com *software* próprio para aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Na qPCR é necessário um marcador fluorogênico que se ligue ao DNA de fita dupla amplificado. Quando excitados, os fluorogênicos emitem fluorescência que gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, ou seja, quanto maior o sinal emitido, maior a quantidade de produto gerado. Assim, a quantificação dos ácidos nucléicos ocorre de maneira precisa e com maior reprodutibilidade (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; OLIVEIRA, 2011).

A otimização das estratégias de rastreamento pode ser obtida combinando testes de genotipagem de HPV e triagens citológicas (BICCA, 2013). Os testes biomoleculares de HPV podem prever melhor quais mulheres desenvolverão LSIL, HSIL ou câncer cervical invasivo nos próximos 5 a 15 anos do que a citologia (COX, 2013).

### **2.3.3 Vacinas contra o HPV**

A prevenção do câncer cervical é possível e, visando combater a disseminação do vírus e o controle das lesões ocasionadas pelo HPV, foram desenvolvidos dois tipos de vacinas contra o HPV - a profilática e a terapêutica. A vacina profilática é baseada no contato com partículas semelhantes ao vírus (VLP – *virus-like particles*) que estimulam a resposta humoral; já terapêutica sensibiliza as células imunocompetentes para combater à infecção viral, e é produzida a partir de outras proteínas que têm sido propostas como antígenos vacinais, principalmente E6 e E7 (ZARDO et al., 2014). As VLPs são sintetizadas baseando-se na proteína estrutural do capsídeo viral L1 do HPV, as quais não possuem DNA e/ou outros produtos biológicos, que induzem produção anticorpos neutralizantes sendo consideradas seguras por não oferecer risco de infecção ou desenvolver uma neoplasia (WANG; RODEN, 2013).

Atualmente existem três vacinas profiláticas disponíveis, todas dentro das normas em relação a imunogenicidade, segurança e eficácia, aprovadas pela FDA: a bivalente (aprovada em 2007), a quadrivalente (aprovada em 2007) e a nonavalente (aprovada em 2014). A vacina bivalente protege contra os HPV 16 e 18 que são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero. A quadrivalente protege contra os HPV 6, 11, 16 e 18 sendo que os dois primeiros (6 e 11) causam outras lesões, tais como as verrugas genitais. A nonavalente também combate as verrugas genitais (6 e 11) e outros HPV com potencial oncogênico (16, 18, 45, 31, 33, 52 e 58) (LAGINHA, 2011; BRASIL, 2016a; RIBEIRO; BORGES, 2016).

Um dos países pioneiros a inserir a vacina contra o HPV no calendário vacinal foi a Austrália em 2007, atualmente com uma cobertura de meninas e meninos de 12 e 13 anos respectivamente, apresentando redução considerável do índice de verrugas genitais e do câncer cervical (FORMAN et al., 2012; ZARDO, 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) implementou no calendário vacinal, em 2014, a vacina tetravalente contra o HPV para meninas de 9 a 13 anos de idade. A partir de 2017, o MS estendeu esta vacina para meninas de 14 anos e meninos de 12 a 13 anos de idade (BRASIL, 2017c). O Amazonas foi um dos primeiros Estados do país a serem contemplados com a vacina tetravalente anti-HPV, introduzida em 2013, contemplando a faixa etária de 11 a 13 anos, atingindo uma cobertura superior a 80% da população alvo em dois anos (BRASIL, 2015b).

A vacinação, em conjunto com o exame preventivo (Papanicolaou), se complementam como ações de prevenção deste câncer. Mesmo as mulheres vacinadas, quando alcançarem a idade preconizada (a partir dos 25 anos), deverão fazer o exame preventivo periodicamente, pois a vacina não protege contra todos os subtipos oncogênicos do HPV (BRASIL, 2015a).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a infecção por Papillomavirus Humanos de alto risco em mulheres com citologias alteradas e normais atendidas na Atenção Primária à Saúde no município de Coari - Amazonas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a prevalência de alterações citopatológicas em uma amostra de mulheres atendidas para exame ginecológico de rotina nas Unidades Básicas de Saúde do município de Coari;
- Descrever o perfil socioeconômico e características relacionadas ao comportamento sexual de todas as participantes;
- Rastrear HPV de alto risco em todas as amostras das mulheres com citologia alterada através de teste molecular;
- Rastrear HPV de alto risco em amostras de mulheres com citologia normal através de teste molecular;
- Descrever o perfil socioeconômico e características relacionadas ao comportamento sexual das participantes infectadas com HPV de alto risco.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 População do Estudo

Trata-se de um estudo transversal, de conveniência, de mulheres atendidas na atenção primária à saúde do município de Coari, Amazonas - Brasil. Segundo dados, em 2014, do Instituto Brasileiro de Pesquisa Geográfica e Estatística – IBGE, a população feminina de Coari acima de 18 anos é de aproximadamente 14.000 mulheres (BRASIL, 2010).

A cidade de Coari (figura 6) é um dos 62 municípios do estado do Amazonas e está situada a 363 quilômetros da Capital Manaus, com uma população estimada de 84.762 habitantes em 2017 (BRASIL, 2017b). Está localizada na região do Médio Solimões e, segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde SEMSA/Coari, a cidade atualmente possui 206 comunidades ribeirinhas. É uma das cidades com mais recursos financeiros do Estado advindos principalmente dos *royalties* devidos à exploração de petróleo e gás natural pela Petrobras no município.

**Figura 6** Localização Geográfica do município de Coari, Amazonas – Brasil.



**Fonte:** Google (2018) - Adaptado

## **4.2 Caracterização do Estudo e Aspectos Éticos**

Este estudo faz parte de um projeto de pesquisa intitulado “Caracterização dos Genótipos de HPV na População de Rastreo e em Pacientes com Câncer de Colo Uterino do Estado do Amazonas” aprovado, em 15/06/2013, pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, com número de protocolo CAAE 128122134000004 (Anexo A).

A realização deste trabalho foi possível devido a colaboração de várias instituições de pesquisa como a FCECON, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT-SP, Fundação Oncocentro de São Paulo – FOSP, da Secretaria Municipal de Saúde de Manaus e da Secretaria Municipal de Saúde de Coari.

## **4.3 Cálculo Amostral**

A realização do cálculo amostral deste estudo foi realizado em 2014. A prevalência esperada para esta pesquisa foi baseada na metanálise de estudos brasileiros realizado por Ayres e Silva (2010), o qual registrou um perfil de prevalência da infecção por HPV de alto risco entre 11-15% na população citologicamente normal no Brasil. Portanto, a prevalência esperada para este estudo foi 11%.

Para o cálculo, foi considerada a população feminina acima de 18 anos no município de Coari, 14.000 mulheres (BRASIL, 2010), uma prevalência de HPV estimada de 11% (AYRES; SILVA, 2010), erro amostral de 3% e um intervalo de confiança de 95%.

O número amostral que representa a população feminina para o estudo foi de 450 mulheres. O software utilizado para o cálculo da amostra foi o Epi Info versão 7.0.

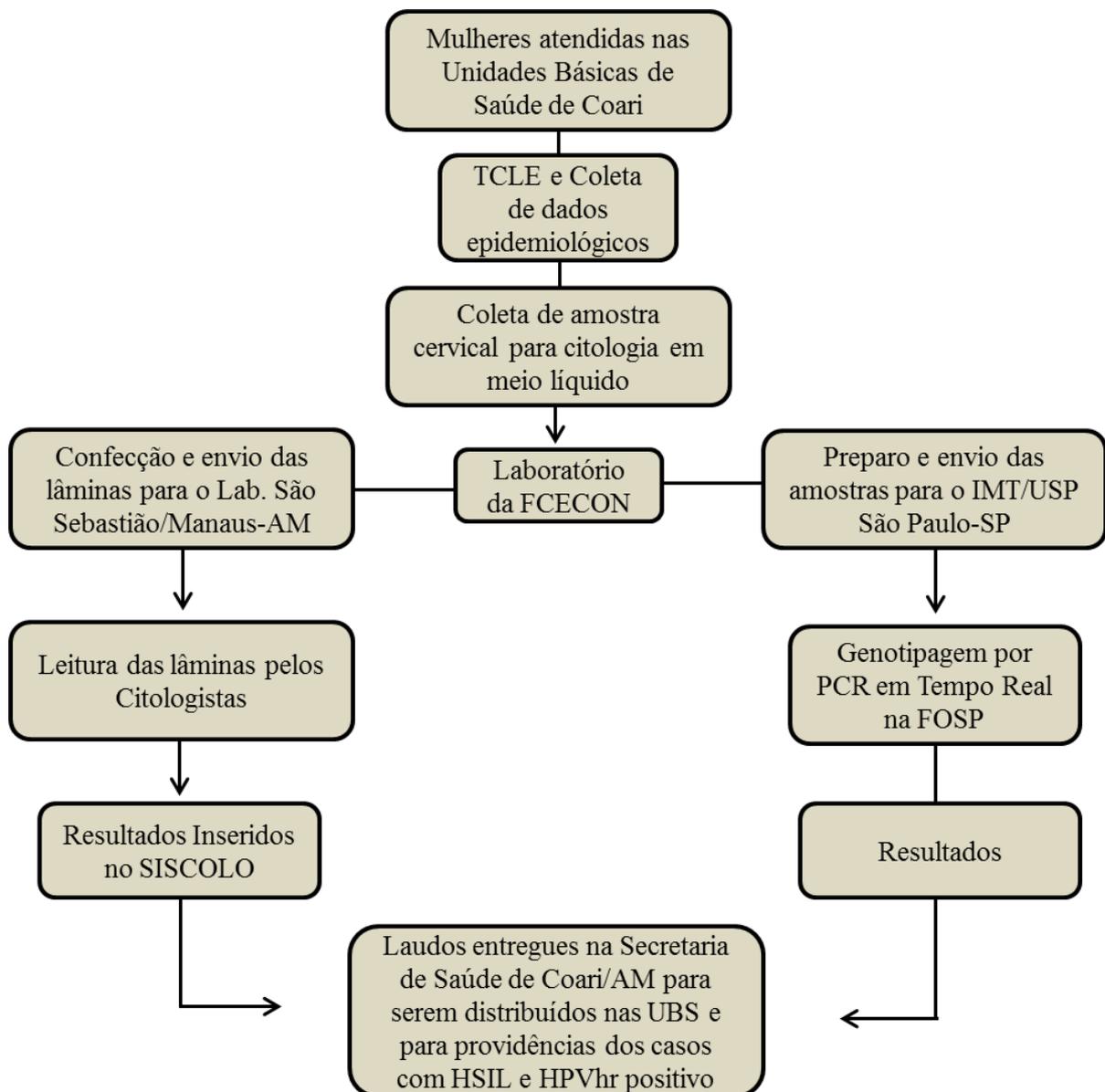
## **4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão**

- Critérios de inclusão:
  - Mulheres com idade acima de 18 anos;
  - Mulheres em exames ginecológicos de rotina nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) no município de Coari.
- Critérios de exclusão:
  - Mulheres abaixo de 18 anos
  - Mulheres Gestantes
  - Mulheres Histerectomizadas

#### 4.5 Coleta de Dados, de Amostras e Procedimentos de Análise das amostras

Nas UBS, as mulheres que procuraram os referidos centros de saúde para exame ginecológico de rotina foram convidadas e esclarecidas quanto aos objetivos da pesquisa. Após aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), responderam ao questionário epidemiológico e foram submetidas à coleta de amostra cervical por CML. As etapas realizadas neste estudo estão descritas na figura 7.

**Figura 7:** Fluxograma dos Procedimentos Realizados no Estudo.



#### 4.5.1 Coleta de dados epidemiológicos e sócio demográficos

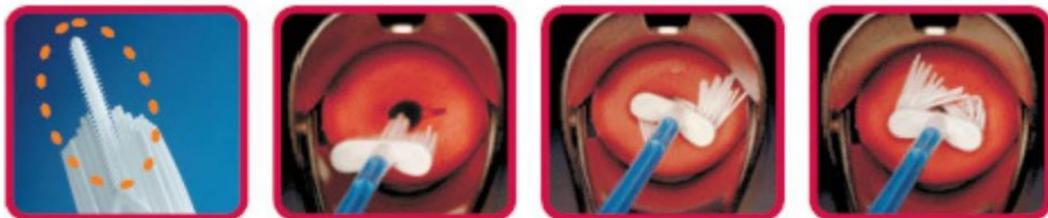
Após o consentimento da participante, pela assinatura do TCLE (anexo B), foi aplicado um instrumento de coleta de dados epidemiológicos, sóciodemográficos e de fatores risco para a infecção por HPV (Anexo C).

#### 4.5.2 Coleta e processamento de amostras para CML

Para a coleta de células da junção escamo-colunar (JEC) para o exame de CML (BD *SurePath™ - TriPath*, Burlington, NC, EUA), utilizou-se a escova *Rovers® Cervix Brush Combi*, a qual contém na parte central cerdas mais longas e nas laterais cerdas mais curtas. A escova foi introduzida de modo que as cerdas mais longas se posicionassem no canal endocervical e as cerdas mais curtas se espalhem pela ectocérvice ao mesmo tempo. Manteve-se uma leve pressão e foi realizado um movimento rotatório, 3 vezes no sentido horário (Figura 8). A coleta foi realizada por profissionais envolvidos na execução desta pesquisa.

Ao final da coleta, a cabeça da escova, a qual é totalmente removível, foi dispensada no frasco coletor (BD *SurePath® Preservative Fluid Collection*) contendo 10 mL de reagente fixador à base de álcool (Figura 9).

**Figura 8:** Coleta de amostra cervical com a escova Rovers® Cervix Brush Combi.



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

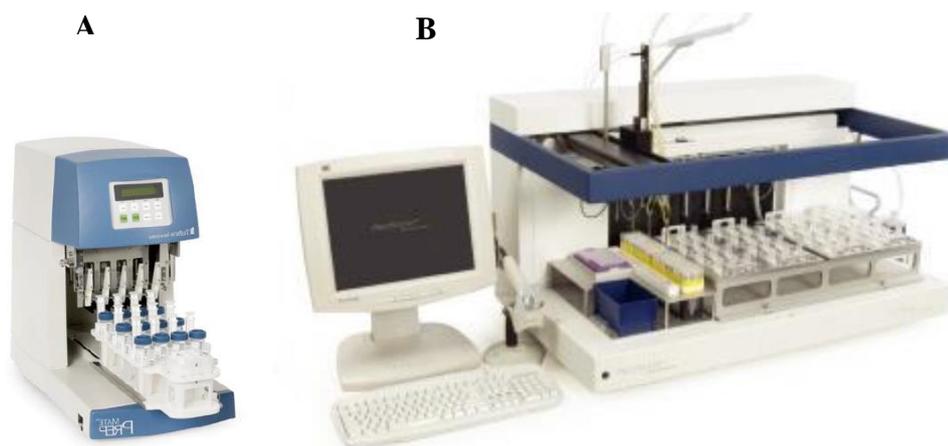
**Figura 9:** Kit de coleta de citologia em meio líquido SurePath™.



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

O material cervical coletado foi encaminhado para FCECON, na cidade de Manaus, para confecção das lâminas nos equipamentos semi-automatizados BD *PrepMate*<sup>TM</sup> e BD *PrepStain*<sup>TM</sup> (Figura 10). Todo o protocolo seguiu rigorosamente as recomendações do fabricante.

**Figura 10:** Equipamentos semi-automatizados *PrepMate*<sup>TM</sup> e *PrepStain*<sup>TM</sup>.



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

A primeira etapa consistiu na identificação dos frascos contendo as amostras com seus respectivos tubos de centrifugação e lâminas. Após o cadastro, amostras foram submetidas à agitação em vórtex, para desprender e desagregar células das cerdas da cabeça da escova, e inseridas no equipamento BD *PrepMate*<sup>TM</sup> Preparation (figura 7A). O *PrepMate*<sup>TM</sup> realiza novamente uma homogeneização das amostras e transfere 8 mL para um tubo de centrifugação que contém 4 mL de reagente de densidade BD. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, onde o reagente de densidade divide as moléculas conforme o tamanho, formato e a densidade, separando as células mais pesadas (células epiteliais), concentrando-as no fundo do tubo de centrifugação, das células mais leves e outros interferentes (como excesso de células inflamatórias, muco, sangue e lubrificantes) que ficam na camada superior da amostra. Então, o sobrenadante, que contém os elementos interferentes, é removido e uma segunda centrifugação é feita para concentrar as células epiteliais e outras células relevantes, em forma de *pellet*, e o excesso de fluido da amostra é descartado.

Os tubos de centrifugação, contendo os *pellets* celulares enriquecidos, foram submetidos à agitação em vórtex e inseridos no equipamento BD *PrepStain*<sup>TM</sup> Slide Processor

(figura 7B). O *PrepStain™* ressuspensa o *pellet* em água e transfere 200µl da amostra num delimitador de campo com 13 mm de diâmetro da lâmina. A fase de secagem ocorre por 10 minutos, período em que as células sedimentam por gravidade no fundo da lâmina através do líquido. Após secagem, as células eram coradas e protegidas com uma lamínula.

No final do processo, obteve-se lâminas com uma camada fina e homogênea de células coradas, de fundo limpo e livre de interferentes, permitindo uma visualização com mais clareza das células epiteliais e de outras células relevantes para o diagnóstico das lesões cervicais e de organismos infecciosos.

#### **4.5.3 Leitura das lâminas de citologia líquida**

A leitura das lâminas e a emissão dos laudos foram realizados por citologistas, devidamente treinados para a leitura de lâminas por citologia líquida, do Laboratório Prof. Sebastião Marinho, na cidade de Manaus/AM, o qual está vinculado às unidades e serviços do Sistema Único de Saúde - SUS. Assim, as lâminas seguiram exatamente o mesmo fluxo empregado na citologia convencional.

#### **4.5.4 Detecção molecular do HPV**

No laboratório de biologia molecular da FCECON, separou-se um alíquota de 1 mL de cada amostra em microtubos, devidamente identificados, e então foram encaminhadas para o Laboratório de Virologia do IMT– USP, em São Paulo, seguindo as regras de biossegurança e de transporte de material biológico da ANVISA. Os procedimentos da análise molecular foram realizados no Laboratório de Citopatologia da FOSP, em São Paulo. Utilizou-se o protocolo do fabricante e o protocolo de realização de testes moleculares já padronizados e utilizados no referido Instituto.

As amostras submetidas ao teste molecular foram as amostras com diagnóstico de citologia alterada e amostras, sorteadas, dentre as citologias com resultado normal, estratificadas de acordo com a idade e equiparadas às amostras com citologias alteradas.

O teste molecular utilizado para a detecção e genotipagem do HPV foi o ensaio HPV BD *Onclarity®*, testado com o equipamento BD *Viper* LT (figura 11). É um ensaio de amplificação de DNA, PCR em tempo real, para detecção qualitativa de 14 tipos HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), sendo que a detecção dos genótipos 16, 18, 31, 45, 51 e 52 é feita de forma individual e os outros genótipos são identificados em grupos: P1 = 33/58, P2 = 56/59/66 e P3 = 35/39/68. O ensaio possui, ainda, um tubo de controle interno (IC) consistindo de um fragmento de DNA do gene de beta

globina humana. Os *primers* desenhados para os 14 genótipos de HPV tem como alvo uma região de 79 a 137 pares de bases das regiões E6 e E7 do genoma viral, enquanto para o gene da beta globina amplificam uma região de 75 pares de bases.

**Figura 11:** Equipamento automatizado BD *Viper LT*<sup>TM</sup>.



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

Uma alíquota de 0,5mL de cada amostra cervical foi transferida para o tubo de diluição do Ensaio BD *Onclarity*<sup>®</sup> (tubo específico para processamento no equipamento BD *Viper LT*). Cada tubo de diluição foi cadastrado no sistema do equipamento *Viper LT*.

Após o cadastro, as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-aquecimento a 120°C por, aproximadamente, 30 minutos e em seguida resfriadas por mais 30 minutos a temperatura ambiente no Aquecedor BD *Pre-warm Heater*, para lisar as células e liberar a molécula de DNA para ser extraída e amplificada. Posteriormente, as amostras foram introduzidas no equipamento BD *Viper LT*, o qual realiza, automaticamente, todo o procedimento de extração e amplificação do DNA alvo.

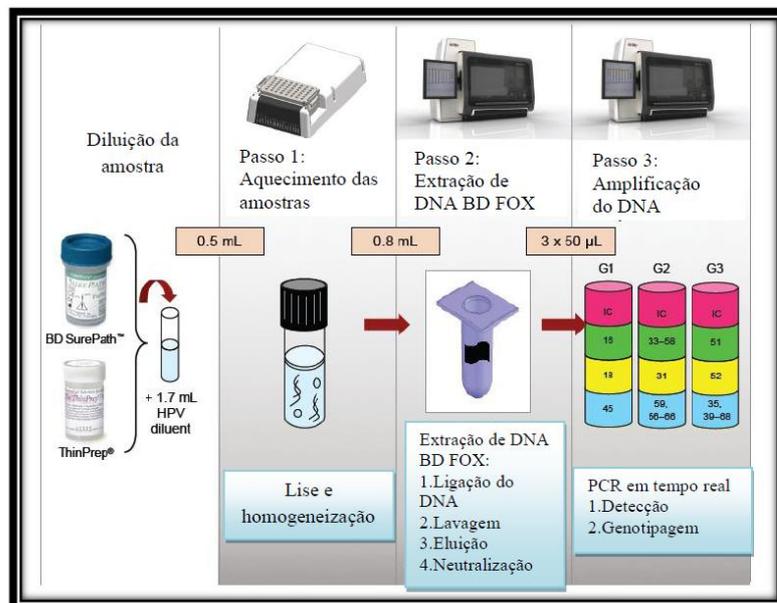
No equipamento, BD *Viper LT*, as amostras são transferidas para os tubos de extração de DNA, os quais contêm partículas de óxido férrico numa película dissolúvel. Um ácido é adicionado para diminuir o pH e induzir uma carga positiva no óxido férrico, o qual se liga à carga negativa da molécula de DNA. As partículas e DNA não ligados são retirados do tubo de extração e são tratados antes de serem removidos para a lixeira. As partículas são lavadas e 400µL tampão de eluição, com pH elevado, é adicionado para eluir o DNA purificado. Finalmente, o tampão de neutralização é usado para ajustar o pH da solução e para otimizar a amplificação do DNA.

O ensaio HPV BD *Onclarity*® é baseado na detecção e amplificação simultânea do DNA alvo através da reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando iniciadores de amplificação e sondas marcadas com fluorescência, fixados (secos) na placa de PCR. Os reagentes são distribuídos em três tubos (G1, G2 e G3), os quais possuem a capacidade de detectar 14 genótipos de HPV, sendo 13 de alto risco e 1 tipo de HPV possivelmente oncogênico. O ensaio possui, ainda, um tubo de controle interno (IC) consistindo de um fragmento de DNA do gene de beta globina humana. Cada tubo (G1, G2, G3 e IC) contém iniciadores de amplificação, sondas fluorescentes, DNA polimerase, nucleotídeos e outros reagentes necessários para a amplificação no respectivo ensaio.

Na etapa de amplificação, 50 µL de DNA de cada tubo de extração é transferida dentro de três tubos de PCR (G1, G2 e G3), que rehidrata o Master-Mix e a HotStart Taq DNA Polimerase, os quais são selados por uma película transparente, para prevenir contra contaminação. As condições de amplificação da PCR foram: ativação da enzima a 95°C durante 15 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 55°C por 60 segundos. A presença ou ausência do DNA do HPV é determinada pelo ciclo de PCR no qual o sinal ultrapassa o limiar “*threshold*” previamente estabelecido. Além disso, o ensaio extrai, detecta e amplifica e detecta um fragmento de beta globina humana como controle interno para garantir e validar os processos de extração e amplificação das amostras testadas.

A figura 12 demonstra, de maneira simplificada, todo o procedimento realizado no equipamento BD *Viper* LT.

**Figura 12:** Processamento da amostra no equipamento *Viper* LT



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

#### **4.5.5 Resultados citológicos e moleculares**

Todos os laudos citológicos, com citologia alterada ou negativa, e os laudos positivos para HPV de alto risco das mulheres que participaram deste estudo, foram entregues na Secretaria de Saúde para o(a) coordenador(a) da Saúde da Mulher, para providências da realização do exame colposcópico na Policlínica Dr. Roque Juan Dellosa em Coari ou para serem encaminhadas para realizar o exame na FCECON.

#### **4.6 Análise Estatística**

Os dados analisados estão descritos e apresentados em tabelas sob a forma de frequência absoluta e relativa e/ou média ou mediana. Para verificar diferenças estatísticas entre os grupos utilizou-se o teste *t*-Student.

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 ( $\chi^2$ ) e/ou o Teste Exato de Fisher para os casos em que a frequência esperada fosse inferior a cinco ( $p < 0,05$ ). O nível de significância utilizado nos testes foram de 5%, com um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram realizadas através do software SPSS versão 20 e MS Excel versão 2013.

## 5 RESULTADOS

A população do estudo foi composta por 455 mulheres que buscaram atendimento nas UB do município de Coari-AM para realização de consultas ginecológicas de rotina e realização de exame preventivo no período de setembro a dezembro de 2014. Todas foram esclarecidas quanto aos objetivos da pesquisa e, após aceitação e assinatura do TCLE, responderam ao questionário epidemiológico e foram submetidas à coleta de amostra cervical por CML.

### 5.1 Características Gerais da Amostra

As informações advindas dos questionários mostraram que a maioria das mulheres era natural do município Coari-AM (75,9%), casadas ou vivam em união estável (74,5%) e se autodeclararam pardas (82,2%). A idade das participantes variou entre 18 a 77 anos com média de idade de 36,7 anos (DP=11,5). As mulheres com idade de 25 a 64 anos representaram 84,6% da amostra, sendo esta faixa etária a preconizada pelo MS para o rastreamento do câncer do colo do útero (Tabela 1).

Quanto ao grau de escolaridade, a maioria (269, correspondente a 59,%) afirmou ter até 8 anos estudo, que corresponde ao Ensino Fundamental Completo. Em relação à ocupação, 25,1% das participantes declararam-se autônomas, 24,3% eram donas de casa, 4,8% afirmaram ser estudantes e 5,1% estavam desempregadas. A maioria das mulheres (80,0%) relataram possuir renda familiar de até 1 salário mínimo (Tabela 1).

Em relação ao comportamento sexual das participantes (Tabela 2), a idade da primeira relação sexual variou entre 11 a 32 anos, com média de 16,1 anos (DP=2,6). A maioria (84,8%) disse ter tido apenas 1 parceiro sexual nos últimos 12 meses e 76,5% delas declararam ter tido de 1 a 4 parceiros sexuais ao longo da vida. Quando questionadas a respeito do uso de preservativo, 43,7% disseram “nunca” usar, 36,0% afirmaram usar “às vezes” e 20,3% relataram que “sempre” faziam o uso do preservativo. Quanto à paridade, 427 (93,9%) das participantes relataram ter filhos. Destas, a maioria (50,8%) tiveram de 1 a 3 filhos e o tipo de parto mais comum foi o parto normal (79,6%).

Quando questionadas em relação ao exame preventivo, 9,2% das participantes informaram que “nunca realizaram o exame”, a maioria (69,5%) relatou ter realizado o exame numa periodicidade de 1 vez ao ano e 21,3% tinham realizado o exame há mais de 2 anos.

**Tabela 1:** Distribuição segundo os dados sociodemográficos das mulheres amostradas no município de Coari, Amazonas, Brasil, 2014.

Variáveis	n = 455	
	n	%
<b>Idade</b>		
Média ± DP	36,7 ± 11,5	
Amplitude	18 - 77	
18  --- 24	64	14,1
25  --- 34	159	35,0
35  --- 44	125	27,5
45  --- 54	69	15,1
55  --- 64	32	7,0
≥ 65	6	1,3
<b>Naturalidade</b>		
Coari	345	75,9
Outros Municípios do Amazonas	98	21,5
Outros Municípios do Brasil	12	2,6
<b>Estado Civil</b>		
Solteira/Divorciada/Viúva	116	25,5
Casada/União Estável	339	74,5
<b>Raça</b>		
Branca	40	8,8
Parda	374	82,2
Negra	23	5,1
Indígena	18	3,9
<b>Escolaridade</b>		
≤ 8 anos	269	59,1
> 8 anos	186	40,9
<b>Ocupação</b>		
Aposentada ou Pensionista	11	2,4
Assalariado com ou sem CTPS	79	17,4
Autônoma	114	25,1
Dona de Casa	111	24,3
Funcionária Pública	86	18,9
Estudante	22	4,8
Desempregada	23	5,1
Outros	9	2,0
<b>Renda Familiar</b>		
Até 1 SM	364	80,0
De 2 a 3 SM	75	16,5
Acima de 3 SM	16	3,5

CTPS=Carteira de Trabalho da Previdência Social; SM = Salário Mínimo; n = Número de Amostras.

**Tabela 2:** Distribuição segundo os dados relativos ao comportamento sexual e história clínica das mulheres amostradas no município de Coari, Amazonas, Brasil, 2014.

Variáveis	n = 455	
	n	%
<b>Idade da primeira relação sexual</b>		
Média ± DP	16,1 ± 2,6	
Amplitude	11 - 32	
<b>Idade do 1º Parto (n=429)</b>		
Média ± DP	18,6 ± 3,5	
Amplitude	12 – 38	
<b>Nº de parceiros nos últimos 12 meses</b>		
Nenhum	36	7,9
1	386	84,8
≥2	33	7,3
<b>Nº de parceiros ao longo da vida</b>		
1 a 4	348	76,5
5 a 8	82	18,0
≥ 9	25	5,5
<b>Uso de preservativo</b>		
Nunca	199	43,7
Às vezes	164	36,0
Sempre	92	20,3
<b>Nº de Filhos</b>		
Nenhum	28	6,1
1 a 3	231	50,8
4 ou mais	196	43,1
<b>Tipo de Parto (n=427)</b>		
Normal	340	79,6
Cesariana	87	20,4
<b>Já teve aborto (n=455)</b>		
Sim	149	32,7
Não	306	67,3
<b>Nº de aborto (n=149)</b>		
1	112	75,2
2 ou mais	37	24,8
<b>Exame Preventivo (455)</b>		
Nunca realizou o exame	42	9,2
1 vez ao ano	316	69,5
Mais de 2 anos	97	21,3

DP = Desvio Padrão; n = Número de Amostras.

## 5.2 Resultados Citológicos

A adequabilidade do material celular classificada como satisfatória teve um percentual de 99,3% (n=452) e as lâminas insatisfatórias foram 0,7% (n=3).

Das 452 citologias classificadas como satisfatórias, 419 (92,7%) apresentaram resultados dentro da normalidade e 33 (7,3%) apresentaram resultados alterados, sendo 4 (0,9%) ASCUS, 26 (5,3%) LSIL e 5 (1,1%) HSIL (tabela 3).

Alguns dados socioeconômicos, clínicos e comportamentais das mulheres com citologia normal e alteradas são comparados na tabela 4.

**Tabela 3:** Distribuição segundo os dados relativos à adequabilidade do material cervical coletado, epitélios representados nas lâminas e resultados da Citologia em Meio Líquido. Manaus, Amazonas, Brasil, 2015.

Variáveis	n	%
<b>Adequabilidade do Material (n=455)</b>		
Satisfatória	452	99,3
Insatisfatória	3	0,7
<b>Tipos de Epitélios na Amostra (n=452)</b>		
Escamoso	162	35,7
Escamoso e Glandular	256	56,6
Escamoso e Metaplásico	1	0,2
Escamoso, Glandular e Metaplásico	33	7,5
<b>Resultados Citológicos (n=452)</b>		
Citologia Normal	419	92,7
ASCUS	4	0,9
LSIL	24	5,3
HSIL	5	1,1

n = Número de Amostras; ASCUS = Atípias Escamosas com Significado Indeterminado; LSIL = Lesão de Baixo Grau; HSIL = Lesão de Alto Grau.

**Tabela 4:** Distribuição segundo os dados relativos às variáveis socioeconômicas e de comportamento sexual das mulheres com citologia normal e com citologia alterada. Coari, Amazonas, Brasil, 2015.

Variáveis	Citologia Alterada (n=33)		Citologia Normal (n=419)		p-value
	n	%	n	%	
<b>Idade</b>					0,317**
Média ± DP	34,7 ± 9,6		36,8 ± 11,7		
Amplitude	18 - 53		18 - 77		
<b>Idade do 1º Parto</b>					<b>0,017**</b>
Média ± DP	17,2 ± 2,4		18,7 ± 3,5		
Amplitude	12 - 23		13 - 38		
<b>Idade da primeira relação sexual</b>					0,531**
Média ± DP	15,8 ± 3,2		16,1 ± 2,6		
Amplitude	12 - 30		11 - 32		
<b>Estado Civil</b>					<b>&lt;0,0001*</b>
Solteira	19	16,1	99	83,9	
Casada/União Estável	14	4,2	320	95,8	
<b>Escolaridade</b>					<b>0,040*</b>
≤ 8	25	9,4	241	90,6	
> 8	8	4,3	178	95,7	
<b>Renda Familiar</b>					***
Até 1 SM	30	8,3	332	91,7	
De 2 a 3 SM	1	1,3	73	98,7	
Acima de 3 SM	2	12,5	14	87,7	
<b>Nº de Filhos</b>					***
Nenhum	3	10,7	25	89,3	
1 a 3	11	4,8	220	95,2	
4 ou mais	19	9,8	174	90,2	
<b>Nº de parceiros nos últimos 12 meses</b>					***
Nenhum	6	20,0	24	80,0	
1 a 2	25	6,1	384	93,9	
3 ou mais	2	15,4	11	84,6	
<b>Nº de parceiros ao longo da vida</b>					0,326*
1 a 4	22	6,6	312	93,4	
5 ou mais	11	9,3	107	90,7	
<b>Uso de preservativo</b>					0,481*
Nunca	12	6,0	187	94,0	
Às vezes	15	9,3	147	90,7	
Sempre	6	6,6	85	93,4	

DP = Desvio padrão; SM = Salário Mínimo; n = Número de Amostras; \*Teste Qui-Quadrado de Pearson; \*\* Teste *t-Student*;

\*\*\*Teste Exato de Fisher; \*\*\*\*Não foi possível aplicar a estatística do teste devido às restrições do Qui-Quadrado.

### 5.3 Resultados do Teste Molecular

O rastreio do DNA de HPV de alto risco foi realizado em 33 das amostras de mulheres com citologia alterada. Para a comparação entre os grupos, 42 participantes foram sorteadas, de acordo com a idade e equiparadas com as amostras com citologia alterada, para a detecção e genotipagem de hrHPV.

Das 75 amostras, provenientes da CML, submetidas ao teste molecular BD Viper LT<sup>®</sup>, 73 foram adequadas, possibilitando a genotipagem do HPV, as quais apresentaram 100% da presença do gene da beta globina humana, utilizado como controle interno para avaliação da qualidade das amostras. Duas amostras (ambas LSIL) foram inconclusivas mesmo sendo novamente processadas para validar os resultados do teste. A positividade de hrHPV foi detectada em 27 das amostras, sendo 22 (66,7%) das citologias alteradas e 5 (11,9%) das citologias negativas (tabela 5).

**Tabela 5:** Resultados relativos à infecção por HPV de alto risco nas mulheres com citologia normal e alterada detectados pelo BD Viper LT<sup>®</sup>. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.

Teste Molecular HPV Alto Risco	Citologia alterada	Citologia Normal	Total
	n (%)	n (%)	
Positivo	22 (66,7)	5 (11,9)	27
Negativo	9 (27,3)	37 (88,1)	46
Amostra Inadequada	2 (6,0)	-	2
Total	33	42	75

n = Número de Amostras

A tabela 6 mostra os resultados da detecção do hrHPV em 22 (70,9%) das 31 citologias alteradas. Das citologias diagnosticadas com LSIL, 77,3% (17/22) foram positivas para hrHPV, nas amostras com diagnóstico de ASCUS, o hrHPV foi detectado em 50,0% (2/4) e em 60,0% (3/5) confirmaram-se a presença de hrHPV nas amostras com HSIL. Duas das amostras com diagnóstico HSIL por CML foram negativas para hrHPV.

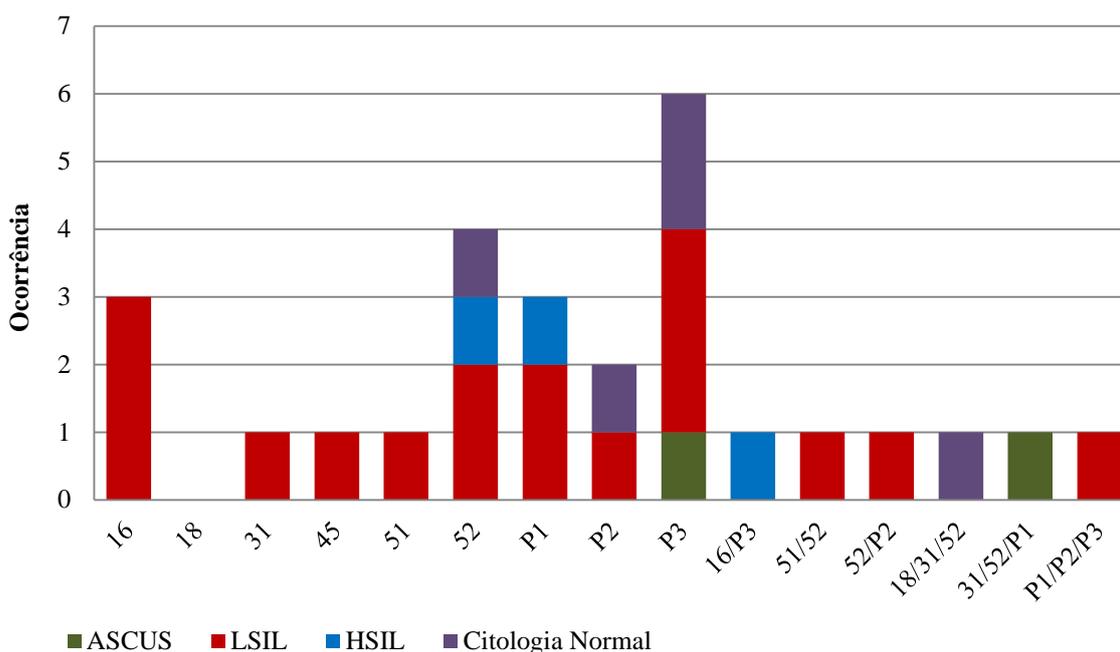
**Tabela 6:** Resultados relativos à infecção por hrHPV nas mulheres com citologia alterada detectados pelo BD Viper LT®, de acordo com a categoria de alteração citológica. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.

Alteração Citopatológica	Positivo (%)	Negativo (%)	Total
LSIL	17 (77,3)	5 (22,7)	22
HSIL	3 (60,0)	2 (40,0)	5
ASCUS	2 (50,0)	2 (50,0)	4
Total	22 (70,9)	9 (29,1)	31

LSIL = Lesão de Baixo Grau ; HSIL = Lesão de Alto Grau; ASCUS = Células Escamosas Atípicas com significado Indeterminado, \*Teste Exato de Fisher.

O gráfico 1 mostra, detalhadamente, a distribuição dos tipos de HPV de alto risco encontrados nas amostras submetidas ao Ensaio BD Onclarity®. O tipo de hrHPV mais frequente detectado de forma individual de foi o HPV 52 e dentre os hrHPV detectados por grupo de genótipo foi o P3, que corresponde aos HPV 35/39/68.

**Gráfico 1:** Distribuição dos genótipos do hrHPV das mulheres com citologia normal e citologia alterada. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.



Alguns dados socioeconômicos, clínicos e comportamentais das mulheres com citologia alterada e normal são comparados na tabela 8 e 9, respectivamente.

**Tabela 7:** Distribuição segundo a frequência das variáveis relacionadas aos dados sociodemográficos e história clínica em relação à infecção pelo HPV nas mulheres com citologia alterada amostradas no município de Coari - AM.

Variáveis	Citologia Alterada (n=31)			p-value
	Total n (%)	HPV + n (%)	HPV - n (%)	
<b>Idade</b>				0,887*
Média ± DP		34,45 ± 9,9	35 ± 9,19	
Amplitude		18 - 53	26 - 53	
18  --- 24	4 (12,9)	4 (100)	.	
25  --- 34	13 (41,9)	6 (46,1)	7 (53,9)	
35  --- 44	9 (29,0)	9 (100)	.	
≥45	5 (16,1)	3 (60,0)	2 (40)	
<b>Escolaridade</b>				0,510**
≤ 8	19 (61,3)	13 (68,4)	6 (31,6)	
> 8	12 (38,7)	9 (75,0)	3 (25,0)	
<b>Estado Civil</b>				0,582**
Solteira	13 (41,9)	9 (69,2)	4 (30,8)	
Casada/União Estável	18 (58,1)	13 (72,2)	5 (27,8)	
<b>Nº de parceiros ao longo da vida</b>				0,217**
1 a 4	22 (71,0)	17 (77,2)	5 (22,8)	
5 ou mais	9 (29,0)	5 (55,5)	4 (44,5)	
<b>Nº de Filhos</b>				***
Nenhum	3 (9,7)	2 (66,6)	1 (33,4)	
1 a 3	10 (32,2)	7 (70,0)	3 (30,0)	
4 ou mais	18 (58,1)	13 (72,2)	5 (27,8)	
<b>Uso de preservativo</b>				***
Nunca	10 (32,2)	5 (50,0)	5 (50,0)	
Às vezes	15 (48,5)	13 (86,6)	2 (13,4)	
Sempre	6 (19,3)	4 (66,6)	2 (33,4)	
<b>Exame preventivo</b>				***
Nunca realizou	4 (12,9)	2 (50,0)	2 (50,0)	
1 vez ao ano	19 (61,3)	15 (79,0)	4 (21,0)	
A cada 2 anos	5 (16,1)	4 (80,0)	1 (20,0)	
Mais de 3 anos	3 (9,7)	1 (33,4)	2 (66,6)	

DP = Desvio Padrão; \*Teste Qui-Quadrado de Pearson; \*\* Teste *t-Student*; \*\*\*Teste Exato de Fisher; \*\*\*\*Não foi possível aplicar a estatística do teste devido às restrições do Qui-Quadrado.

**Tabela 8:** Distribuição segundo a frequência das variáveis relacionadas aos dados sociodemográficos e história clínica em relação à infecção pelo HPV nas mulheres com citologia normal amostradas no município de Coari - AM.

Variáveis	Citologia Normal (42)			p-value
	Total n (%)	HPV + n (%)	HPV - n (%)	
<b>Idade</b>				0,769*
Média ± DP		33,4 ± 11,9	34,8 ± 9,7	
Amplitude		18 - 51	19 - 53	
18  --- 24	5 (11,9)	1 (20,0)	4 (80,0)	
25  --- 34	18 (42,9)	2 (11,1)	16 (88,9)	
35  --- 44	11 (26,2)	1 (9,0)	10 (91,0)	
≥45	8 (19,0)	1 (12,5)	7 (87,5)	
<b>Escolaridade</b>				0,172**
≤ 8	21 (50,0)	1 (4,7)	20 (95,3)	
> 8	21 (50,0)	4 (19,0)	17 (81,0)	
<b>Estado Civil</b>				0,237**
Solteira	8 (19,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	
Casada/União Estável	34 (81,0)	3 (8,8)	31 (91,2)	
<b>Nº de parceiros ao longo da vida</b>				0,382**
1 a 4	35 (83,3)	5 (14,2)	30 (85,8)	
5 ou mais	7 (16,7)	-	7 (100)	
<b>Nº de Filhos</b>				***
Nenhum	2 (4,8)	-	2 (100)	
1 a 3	18 (42,9)	2 (11,1)	16 (88,9)	
4 ou mais	22 (52,3)	3 (13,6)	19 (86,4)	
<b>Uso de preservativo</b>				***
Nunca	16 (38,1)	2 (12,5)	14 (87,5)	
Às vezes	18 (42,8)	3 (16,6)	15 (83,4)	
Sempre	8 (19,1)	-	8 (100)	

DP = Desvio Padrão; \*Teste Qui-Quadrado de Pearson; \*\* Teste *t-Student*; \*\*\*Teste Exato de Fisher; \*\*\*\*Não foi possível aplicar a estatística do teste devido às restrições do Qui-Quadrado.

## 6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa trata-se de um estudo transversal, cujo objetivo foi investigar a presença de hrHPV em mulheres que apresentaram resultados alterados no exame de citologia cervical na cidade de Coari, Amazonas, no período de Setembro a Dezembro de 2014. Nossa amostra consistiu de 455 mulheres que buscaram atendimento para exame ginecológico de rotina nas UBS do referido município. Vale ressaltar que este estudo é o primeiro a utilizar a CML para o diagnóstico das lesões precursoras do CCU no município de Coari.

A idade das participantes variou entre 18 a 77 anos, com média de 36,7 anos (DP=11,5), a maioria era casada ou vivia em união estável (74,5%), tinham baixa escolaridade (59,1%) e possuíam baixa renda familiar (80,0%). Nossos dados se assemelham, em grande parte, ao perfil das mulheres alcançadas pelo estudo de Rocha (2012), que, investigando 361 mulheres também em exame ginecológico de rotina nas 10 UBS do município de Coari/AM no ano de 2010, encontrou que a maioria das participantes era natural do município (69,8%), casadas ou viviam em união estável (77,3%), tinham idade entre 18 a 78 anos, com média de 36,4 anos (DP=13,4), possuíam baixa escolaridade (62,0%), a principal ocupação relatada era de agricultora (16,7%) ou agente administrativo (16,1%), com uma renda de até 1 salário mínimo (53,2%). Já o estudo de Mariño (2015) realizado com 412 mulheres moradoras de comunidades ribeirinhas na zona rural do município de Coari/AM no ano de 2014, cuja abordagem para recrutamento foi feita de casa em casa para estudo da detecção do HPV por meio de autocoleta, mostrou que a maioria das participantes era casada ou viviam em união estável (84,4%), tinham idade entre 18 a 81 anos, com média de 36 anos (DP=13,2), possuíam baixa escolaridade (53,4%), eram agricultoras (78%) e tinham como principal fonte de renda o programa governamental “Bolsa Família” (61,8%). Analisando os nossos dados juntamente com os achados de Rocha (2012) e de Mariño (2015), podemos observar um perfil em comum das participantes tanto na zona urbana quanto da zona rural do referido município.

Em relação ao comportamento sexual, a idade da primeira relação sexual das participantes variou de 11 a 32 anos, com uma média de 16,1 anos, e a maioria tinham filhos (93,9%), assemelhando-se ao estudo de Mariño (2015), realizado com mulheres moradoras da zona rural de Coari, cuja relação sexual das participantes foi iniciada entre 10 a 28 anos, com média de 15 anos e 94,4% das mulheres tinham filhos. Esta pesquisa e o estudo de Mariño (2015) foram realizados concomitantemente, o que nos leva a observar que o início da vida sexual das participantes na zona rural parece começar um pouco mais cedo do que nas

mulheres da zona urbana da cidade, embora não tenha sido feita uma análise comparativa para verificar se a diferença entre as populações foi estatisticamente significativa. Recentemente, dados preliminares divulgados pelo Ministério da Saúde indicam que a média de idade da primeira relação sexual das mulheres no Brasil é de 15,4 e em Manaus/AM e no Rio de Janeiro/RJ a média do início da prática sexual entre os adolescentes é de 15,1 e 14,9, respectivamente (BRASIL, 2017a). Segundo Oliveira et al. (2013), adolescentes são consideradas mais suscetíveis à infecção pelo HPV e tem maiores chances do vírus desenvolver as lesões precursoras do carcinoma cervical porque elas possuem um colo uterino biologicamente imaturo. As lesões progridem mais rapidamente neste grupo devido à maturação tardia da zona de transformação cervical e uma área aumentada de epitélio imaturo, o que pode aumentar a vulnerabilidade do epitélio cervical à infecção por HPV e alterações neoplásicas (KAHN et al., 2002).

Observamos também que o preservativo não tem sido utilizado nas relações sexuais devido ao fato de 43,7% das participantes terem relatado que “nunca” fizeram o uso e de 36,0% reportar que “às vezes” usavam a camisinha, sendo que a maioria das justificativas para o não uso era devido à confiança no parceiro, por serem casada ou união estável, e/ou porque ela ou o parceiro não gostavam de usar o preservativo. Tamer et al. (2016), afirma que o uso da camisinha serve como uma barreira ao prevenir contato direto e o risco de transmissão do HPV pode ser reduzido pelo uso regular do preservativo. Segundo Pinto, Fuzii e Quaresma (2011), não usar a camisinha durante a prática sexual representa maior risco para a infecção pelo HPV e de outras IST.

Ao compararmos algumas variáveis aos resultados da CML, a variável escolaridade apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,040$ ). Em nossos resultados, observamos que a maioria das mulheres, tanto com citologia alterada quanto citologia normal, tinha baixa escolaridade. Segundo Oliveira (2015), quanto mais baixa a escolaridade menor será o nível de compreensão sobre o câncer, seus fatores de risco e tratamento, o que também pode implicar na adesão das mulheres às medidas de prevenção para o câncer cervical, cabendo aos profissionais da saúde orientá-las quanto aos benefícios do preventivo e à periodicidade da realização do exame.

Outra variável que apresentou diferença estatisticamente significativa foi quanto ao estado civil ( $p<0,0001$ ). Constatamos que a maioria das mulheres com citologia normal era casada ou vivia em união estável enquanto a maioria das participantes com citologia alterada era solteira. Os estudos de Pinto, Fuzii e Quaresma (2011) e de Bahmanyar et al. (2012), correlacionaram que mulheres solteiras apresentam um maior risco de infecção por HPV por

estarem expostas a um maior número de parceiros sexuais e por não fazerem o uso de preservativos. Em contradição, o estudo recente de Lopes et al. (2016) traz que mulheres solteiras e sem companheiros fixos apresentam baixo risco à infecção por neste grupo se observar uma maior adesão ao uso consistente de preservativo, o que não é observado nas mulheres casadas/em união estável, devido à vida sexual consensual, em que existe um padrão de confidencialidade e segurança em relação ao parceiro, predispondo estas mulheres a infecções por HPV e outras IST.

A variável idade do primeiro parto também teve diferença significativa ( $p=0,017$ ) em relação aos resultados da CML. Ao analisarmos as médias de idade do primeiro parto, observamos que as mulheres com citologia alterada eram mais jovens ( $17,2\pm 2,4$ ) em comparação às primíparas com citologia normal ( $18,7\pm 3,5$ ). As lesões cervicais progridem mais rapidamente em mulheres jovens devido à maturação tardia da zona de transformação cervical e uma área aumentada de epitélio imaturo, o que pode aumentar a vulnerabilidade do epitélio cervical à infecção por HPV e alterações neoplásicas (KAHN et al., 2002). Segundo Zhang et al. (2013), esta relação também pode ser explicada (1) pelo fato de que no período gestacional há uma maior exposição da zona de transformação do epitélio cervical, expondo a camada basal ao HPV, e (2) pelo nível aumentado do estrogênio durante a fase da adolescência que acidifica da cavidade vaginal, um determinante da metaplasia escamosa, e quando ocorre na presença de HPV a probabilidade de transformação celular aumenta resultando em mudanças neoplásicas. Por ser um estudo transversal, as associações encontradas em nossa pesquisa não podem ser consideradas causais da infecção por hrHPV.

As amostras, obtidas através da técnica de CML, obtiveram a classificação do material celular como satisfatória em 99,3% delas. Este índice é considerado como indicador da qualidade da coleta, justificada pelo fato das lâminas citológicas possuírem elementos celulares representativos da região onde a maior parte das lesões se inicia, aumentando a chance de identificação de lesões precursoras do CCU. O Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) recomenda que o percentual aceito de lâminas insatisfatórias seja até 5%. Na pesquisa de Rocha (2012), realizado em Coari/AM, o percentual de lâminas insatisfatórias por citologia convencional correspondeu a 11%. Esse percentual indica problemas na qualidade do material para o exame citopatológico do colo do útero, havendo a necessidade de investir na qualificação profissional de quem realizam as coletas e/ou a leitura das mesmas (BRASIL, 2012). Ainda em comparação ao estudo de Rocha (2012), as lâminas analisadas em nosso estudo, confeccionadas por CML, mostraram-se superior com um percentual de satisfatoriedade de 99,3%. Em paralelo ao nosso estudo, Sales (2015), rastreando as lesões

precursoras do CCU e a presença de HPV de alto risco em amostras cervicais de 967 mulheres que buscaram atendimento nas UBS da cidade de Manaus/AM, obteve um percentual de 99,8% de satisfatoriedade das lâminas confeccionadas por CML. Estes achados reforçam o estudo de revisão de Santos, Silvério e Messoria (2014), os quais afirmam que a CML permite uma melhor categorização da amostra, devido à preservação celular e pelo processamento que gera a lâmina, o qual diminui elementos obscuros, permitindo uma detecção mais precisa de células atípicas e de lesões, que no esfregaço convencional não poderiam ser detectados.

Os resultados citológicos deste estudo mostraram que 92,7% (427/455) das participantes estavam dentro da normalidade e o percentual de citologias alteradas correspondeu a 7,3% (33/457), distribuindo-se em 0,9% de ASCUS, 5,3% de LSIL e 1,1% de HSIL. O percentual de citologias alteradas, a proporção de exames compatíveis com ASCUS e a proporção de resultados de HSIL entre exames citológicos do colo do útero encontrados em nosso estudo estão de acordo com o recomendado pelo Ministério da Saúde, que seria igual ou maior a 3%, menor que 5% e maior ou igual a 0,4%, respectivamente (BRASIL, 2016a). O estudo de Mariño (2015) também encontrou essa concordância.

Nossos dados assemelham-se, em partes, ao estudo de Sales (2015) em Manaus/AM, do qual se obteve um percentual de 4,4% (42/965) alterações citológicas por CML, sendo 2,5% de LSIL, 0,10% de HSIL, 1,45% ASCUS e 0,31% ASC-H e ao estudo de Schmitt et al. (2013), na Bélgica, encontrando 8,6 % de citologias anormais dos quais 4,1% eram ASCUS, 0,3% ASC-H, 2,2% LSIL e 1,5% HSIL. O estudo de Martins et al. (2016b), obteve-se um alto percentual (25%) de alterações citológicas, 8,1% ASCUS; 9,9 % LSIL, 6,5 % HSIL e 0,5% de mulheres com Câncer Cervical Invasivo, explicado pelas amostras obtidas de mulheres de dois centros de referência do Estado de São Paulo: o Hospital das Clínicas em São Paulo e o Hospital de Câncer de Barretos São Paulo/SP. Assim podemos observar que estes percentuais variam de acordo com o tipo de estudo e da população estudada.

Vários estudos relatam um melhor desempenho da CML na detecção das lesões precursoras do câncer do colo do útero (FROBERG et al., 2013; SIMION et al., 2014). Os estudos de Martins (2016a) e Longato-Filho et al. (2015) encorajam a implantação da CML como ferramenta para melhorar a qualidade no rastreio CCU no Brasil. No entanto, a perspectiva dessa metodologia ser implantada é relativamente baixa, assim como em outros países, tendo em vista o seu alto custo (WHEELER, 2013).

O teste molecular detectou a presença de hrHPV em 27 (36,0%) das 75 amostras submetidas ao teste em nosso estudo. Duas das amostras com diagnóstico HSIL na CML

foram negativas para hrHPV e, segundo Oliveira (2011), uma possível explicação para o resultado negativo é que provavelmente sejam um falso +HSIL pela CML ou proveniente de falhas no teste utilizado. Das amostras com citologia negativa, 11,9% (5/42) apresentaram positividade para hrHPV, correspondendo aos HPV 52, HPV 18, HPV 31 e aos grupos de genótipos HPV P3 (35/39/68) e HPV P2 (56/59/66). Em 2012, Rocha encontrou um alto percentual, 31,8%, da infecção por HPV em mulheres com citologia normal na cidade de Coari/AM e Sales (2015) também registrou um elevado percentual, 14,8%, em mulheres com citologia normal em Manaus/AM. A positividade para hrHPV em citologias normais em nosso estudo, mesmo em poucas amostras, estão de acordo com Doorbar et al. (2016b), o qual afirma que a detecção de HPV na ausência de doença aparente é comumente encontrado em 11-12% de todas as mulheres. Segundo Kim et al. (2012) e Ryser, Myers e Durrett (2015), a maioria das infecções por HPV é transitória, eliminada espontaneamente em aproximadamente até 24 meses geralmente atribuída a uma resposta imune efetiva e baixa carga viral, e uma pequena porcentagem das mulheres infectadas pelo vírus a infecção é persistente, resposta imune pouco efetiva e alta carga viral, as quais possuem um risco elevado de desenvolverem CCU. Rodríguez et al. (2008) sugerem que, quando possível, um paciente com citologia normal e resultado inicial positivo do HPV deve ser observado com atenção, pois um acompanhamento de 12 meses pode excluir com segurança mais de 50% das infecções como transitórias.

Dentre as 31 amostras com citologias alteradas, aquedadas ao teste molecular, a presença de hrHPV foi detectada em 22 (70,9%). O HPV 52 foi o tipo mais frequente dentre os hrHPV identificados de forma individual em nosso estudo. Vários estudos indicam que os tipos mais prevalentes no mundo são os HPV 16 e 18, no entanto, nosso achado corrobora com vários estudos que mostram uma prevalência do HPV 52. Kim, Kim e Kim (2013), utilizando o sistema de *microarray* de DNA, detectaram o HPV52 como um dos tipos de HPV de alto risco prevalentes em lesões pré-cancerosas na Coreia. Meloni et al. (2014), utilizando INNO-LiPA HPV para genotipagem dos tipos de HPV, mostraram uma alta frequência da infecção pelo HPV 52 em mulheres na Itália. Zhou et al. (2017) e Zhang et al. (2016), usando PCR e teste de hibridização reversa *dot blot*, encontraram que o HPV 52 foi o tipo mais prevalente dentre os HPV encontrados em suas populações de estudo na China. Nos EUA, o estudo de Monson et al. (2015), através do teste de genotipagem linear array HPV, revelou que o HPV 52 foi o segundo tipo mais predominante.

Os outros tipos encontrados em nosso estudo foram o HPV 16, HPV 31, HPV 51, HPV 45. O grupo HPV P3, que corresponde aos HPV 56/59/66, também teve alta frequência,

no entanto não é possível estabelecer a que tipo específico essa infecção foi associada devido ao fato de que a detecção destes tipos ocorre de forma agrupada, podendo ser realizada uma futura identificação com *primers* específicos para estabelecer qual(is) genótipo(s) de hrHPV estão presente nessas amostras. Entretanto, destaca-se a importância destes diagnósticos, tanto identificado de forma individual quanto agrupado, para que todas as mulheres infectadas com hrHPV sejam encaminhadas para tratamento.

Alguns dos estudos realizados no Amazonas fornecem informações relacionada aos genótipos de hrHPV (16, 18, 33, 31, 39, 45, 56, 58, 59, 66 e 68) circulantes nos locais das pesquisas e permitem que estratégias sejam tomadas tanto no rastreamento quanto na adequação da vacina para a população local (CORREA, 2005; LIRA, 2010; CASTRO, 2011; ROCHA et al., 2013; QUEIROZ et al., 2015; MARIÑO, 2015; SALES, 2015). Observando alguns estudos de rastreamento molecular do HPV em diferentes regiões do Brasil, observamos maior frequência do HPV 16 e HPV 18 assim como detectados nos estudos realizados no Amazonas, como descrito no estudo de Fonseca et al. (2015) realizado com mulheres indígenas do Norte do Amazonas e Noroeste de Roraima, onde a prevalência geral da infecção por HPV foi de 39,7% e os tipos de hrHPV mais frequentes no Distrito Yanomami foram o HPV 16, 31 e 18 enquanto os tipos 31 e 68 foram os mais comuns no Distrito Leste. Miranda et. al. (2012), identificaram 11% da infecção por HPV em mulheres de Ouro Preto/MG sendo o HPV 16 o mais frequente. O estudo de Dos Santos et. al. (2013) que encontraram 31% da presença de HPV em amostras provenientes de mulheres de Porto Velho/RO encontrando os tipos oncogênicos HPV 16, 18, 56, 33 e 53. Teixeira et al. (2016) que detectou um percentual de 27,5% da infecção por HPV em seu estudo, Rio Grande/RS, tendo como os genótipos mais frequentes do HPV 18 e do HPV 16. Considerando que as vacinas profiláticas bivalente e tetravalente disponibilizadas no Brasil contemplam proteção contra os tipos de HPV 16/18 e 6/11/16/18, respectivamente, é importante mostrar a presença dos genótipos de HPV circulantes no país afim de contribuir com programa de vacinação para avaliar a oportunidade de inserir a vacina nonavalente a qual inclui proteção contra os HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Segundo Serrano et al. (2015), a inserção da vacina nonavalente poderia potencialmente evitar quase 88% dos tipos de câncer da região anogenital feminino.

Ao analisarmos os dados sociodemográficos e comportamentais das mulheres com citologia alterada, tais como a idade, escolaridade, estado civil, número de parceiros ao longo da vida, número de filhos e o uso de preservativo, para investigação da associação com a infecção por HPV (tabela 8), nenhuma variável teve diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os dois grupos. Apesar da correlação entre as variáveis e a presença do

HPV não mostrar diferença estatisticamente significativa, houve uma prevalência maior, nos casos positivos para o HPV, nas pacientes com menos de 8 anos de estudo (59,1%), casadas ou que vivem em união estável (59,1%), que tinham 4 ou mais filhos (59,1%), que tiveram de 1 a 4 parceiros ao longo da vida (77,3%) e que “às vezes” faziam o uso de preservativos (59,1%).

Os dados sociodemográficos e comportamentais das mulheres com citologia negativa foram cruzados para a investigação da associação com a infecção por HPV (tabela 9). No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. Apesar da correlação entre as variáveis e a presença do HPV não mostrar diferença estatisticamente significativa, houve uma prevalência maior, nos casos positivos para o HPV, nas pacientes com menos de 8 anos de estudo (80,0%), casadas ou que vivem em união estável (60,0%), que tinham 4 ou mais filhos (60,00%), que tiveram de 1 a 4 parceiros ao longo da vida (100%) e que “às vezes” faziam o uso de preservativos (60,0%).

Nos países com baixos recursos para cobrir os custos e a organização de um programa de rastreio, a incidência e a mortalidade por CCU permanecem elevada (UIJTERWAAL, 2014). O teste de HPV pode substituir a citologia como ferramenta primária de rastreio na detecção de lesões. Esta substituição aumentará a eficácia dos atuais programas de triagem cervical, melhorando a sensibilidade do rastreio regular (LEVI et al., 2014), como demonstrado no estudo piloto em várias UBS de São Paulo/SP realizado por Martins, (2016a).

A estratégia ideal deve identificar com eficiência e precisão as lesões precursoras de câncer, que provavelmente irão progredir para câncer invasivo, e evitar a detecção e o tratamento desnecessário da infecção transitória pelo HPV e suas lesões benignas associadas (UIJTERWAAL, 2014). Recentemente, os programas de rastreamento de câncer cervical foram adaptados no Brasil para permitir a detecção precoce de lesões precursoras de CCU e, assim, reduzir a mortalidade por câncer. Uma combinação de testes de HPV com CML parece ser uma nova abordagem promissora na triagem do câncer cervical no Brasil e no mundo, com alta expectativa para oferecer um controle adequado da carga CCU neste país. (ZHANG et al., 2016; LORENZI; SYRJANEN; LONGATTO-FILHO et al., 2015; DIJKSTRA et al., 2014; UIJTERWAAL, 2014). A otimização de uma estratégia de vacinação em articulação com o rastreio do CCU poderá vir a favorecer a redução do número de casos e mortes relacionadas com o HPV (RIBEIRO et al., 2016).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O percentual de 99,4% de lâminas satisfatórias em nosso estudo reforça dados descritos na literatura que apresentam a CML como uma ferramenta promissora no rastreamento do CCU, principalmente em nossa região onde o índice deste câncer é o mais prevalente do país.

Nosso estudo revelou um início precoce da atividade sexual entre as participantes e que nem sempre fazem uso de preservativo. Apesar da vacina contra HPV atender a uma demanda de adolescentes, sugere-se uma educação sexual como uma das estratégias para que se consiga reduzir a incidência do CCU no estado e em outras regiões do país futuramente.

A presença de hrHPV foi detectada em 66,7% das amostras com citologias alteradas e em 11,9% das amostras com citologia normais submetidas ao teste molecular com maior frequência do HPV 52, seguido do HPV 16, HPV 31, HPV51, HPV 18, HPV 45 e dos HPV identificados por grupo de genótipo (HPV 33/58; HPV56/59/66; HPV 35/39/68). Esses genótipos, juntamente com os tipos de hrHPV encontrados por Rocha (2012) e Mariño (2015), demonstram a diversidade dos tipos de HPV oncogênicos circulantes na população de Coari/AM, sendo uns tipos com mais frequência e outros menos frequentes. A detecção de hrHPV contribuiu para o seguimento de mulheres com real risco para o desenvolvimento do CCU.

Estes resultados podem contribuir com o conhecimento epidemiológico necessário para o fortalecimento e redirecionamento das políticas de controle do câncer do colo do útero, além de fornecer informações que podem subsidiar a implantação da vacina nonavalente no programa de vacinação contra HPV tendo em vista que a mesma abrange grande parte dos genótipos detectados nestes estudos, que futuramente pode ter um grande efeito na diminuição da incidência do câncer cervical no município e, conseqüentemente, no Estado.

## REFERÊNCIAS

- ANATOMIA DO ÚTERO. Disponível em <<http://labpath.blogspot.com.br/2012/05/carcinoma-de-colo-de-utero.html>>. Acessado em 15/05/2018.
- ANSCHAU, F.; GINECOLOGIA, D.; LUCAS, S. Citologia Cervical em Meio Líquido Versus Citologia Convencional Liquid-based Cervical Cytology Versus Conventional Cytology Comparação entre a Citologia Convencional e a Citologia em Meio Líquido. *Femina*, v. 34, n. 5, p. 7, 2006.
- ARAÚJO, E. S. et al. Avaliação do Seguimento de Mulheres com Exames Citopatológicos Alterados de acordo com as Condutas Preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 60, n. 1, p. 7–13, 2014.
- AUDI, C. A. F. et al. Exame de Papanicolaou em mulheres encarceradas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 19, n. 3, p. 675–678, 2016.
- AYRES, A.R.; SILVA, G.A. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev. Saúde Pública*, v.44, n.5, p.963-74, 2010.
- BAHMANYAR, E. R. et al. Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecologic Oncology*, v. 127, n. 3, p. 440–450, 2012.
- BARBOSA, M. G.; SARTORI, M. G. F. *Manual de Ginecologia*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2013.
- BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, v. 32, n. SUPPL., p. 1–6, 2005.
- BICCA, G. L. D. O. et al. HPV infection and cervical cancer: a review of screening and preventive strategies in developed countries and brazilian policies. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 23, n. 3, p. 157–162, 2013.
- BONFIETTE, C. *Biologia Molecular na Ginecologia*. In: BARBOSA, M. G.; SARTORI, M. G. F. *Manual de Ginecologia*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2013.
- BOSCH, F. X. et al. *Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases*. *Vaccine*, v. 31, p. H1–H31, 2013.
- BRASIL. Ministério do Planejamento. Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Contagem Populacional*. Rio de Janeiro: 2010.  
< <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130120&search=amazonas|coari> >
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Instituto Nacional do Câncer (Brasil). *Coordenação de Prevenção e Vigilância. Monitoramento das ações de controle dos Cânceres do Colo do Útero e de Mama*. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, Cadernos de Atenção Básica, n. 13, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Ficha técnica de indicadores das ações de controle do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação geral do programa nacional de imunizações/DEVIT/SVS/MS. Vacinação contra HPV. Boletim Informativo do PNI - 2015. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio a Organização de Rede. Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia. – 2. ed. rev. ampl. – Rio de Janeiro: INCA, 160 p, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio a Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Associação Hospitalar Moinhos de Vento. Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil): Resultados preliminares – Associação Hospitalar Moinhos de Vento – Porto Alegre, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) 2017b. Acesso em 18/04/2018.  
[ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_de\\_Populacao/Estimativas\\_2017/estimativa\\_dou\\_2017.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2017/estimativa_dou_2017.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) 2017c. Acesso em 18/08/2017.  
[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo\\_uterio/prevencao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uterio/prevencao)

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

BRUNI, L. et al. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. n. July, 2017.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

CAMARA, G. N. N. D. L. et al. Os Papilomavírus Humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 149–158, 2008.

CAMPANER, A.; JÚNIOR, E. D. M.; VILLA, L. L. Guia do HPV. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavirus Humano, p. 5, 2013.

CASTRO, T. M. P. G. et al. Manifestações orais associada ao Papilomavírus Humano (hpv) conceitos atuais: revisão bibliográfica. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 70, n. Iii, p. 546–550, 2004.

CASTRO, M. M. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the Central Amazon Region. Genetics and Molecular Research 10 (1):186-196, 2011.

CHEN, X.; WALLIN, K-L.; DUAN, B. G. M. Prevalence and Genotype Distribution of Cervical Human Papillomavirus (HPV) Among Women in Urban Tianjin, China. Anticancer Research, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2015.

COLLAÇO, L. M.; ZARDO, L. Cytologic Screening Programs. In: Comprehensive Cytopathology. 3. ed. Elsevier Inc, 2008.

COLONELLI, D. E. Avaliação do desempenho da citologia em meio líquido *versus* citologia convencional no Sistema Único de Saúde. Dissertação (Mestrado em Ciências), Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2014.

CORRÊA, G. J. Prevalência do Papilomavírus humano (HPV) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino. Dissertação (Mestrado em em Doenças Tropicais e Infecciosas). Universidade do Estado do Amazonas – UEA. 2005.

COX, J. T. et al. Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study. The American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 208, no. 3, pp. 184.e1–184.e11, 2013.

CUNNINGHAM, M. S. et al. Cervical cancer screening and HPV vaccine acceptability among rural and urban women in Kilimanjaro Region, Tanzania. BMJ Open, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2015.

CUTTS, F. T. et al. Human Papillomavirus and HPV vaccines: a review. Bulletin of the World Health Organisation, v. 85, n. 10, p. 812 – 819, 2007.

DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. International Journal of Cancer, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017

DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of Papillomaviruses. Virology, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DIJKSTRA, M. G. et al. Primary hrHPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening : How to Manage Screen-Positive Women ? A POBASCAM Trial Substudy. American Association for Cancer Research, v. 1, n. 9, p. 55–64, 2014.

DOORBAR, J. The Papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology, v. 32, p. 7–15,

2005.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, v. 30, n. SUPPL.5, p. F55–F70, 2012.

DOORBAR, J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *Journal of Pathology*, v. 238, p. 166–179, 2016a.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.*, v. 25, p. 2–23, 2016b.

DOS SANTOS, J. C. et al. Ocorrência de Papilomavírus Humano na cérvix uterina de mulheres da região ocidental da Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 2, p. 185–190, 2013.

DOSHI, D. et al. HPV, Cervical Cancer and Pap Test Related Knowledge Among a Sample of Female Dental Students in India. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 16, n. 13, p. 5415–20, 2015.

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

ENTIAUSPE, L. G. et al. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. v. 694, p. 689–694, 2014.

FERRAZ, L. D. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. *Journal of the Health Sciences Institute*, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

FILIPA, D. Citologia de Base Líquida: Vantagens e desvantagens, aplicações da técnica e comparação de técnicas. ESTSP Politécnico do Porto, 2013.

FITZMAURICE, C. et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncology*, 1, 505-527, 2015.

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, 2015.

FORMAN, D. et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*, v. 30, p. F12–F23, 2012.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through Papillomavirus vaccination. *Nature reviews. Immunology*, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2004.

FROBERG, M. et al. Liquid-based Cytology With HPV Triage of Low-grade Cytological Abnormalities Versus Conventional Cytology in Cervical Cancer Screening. *Current Pharmaceutical Design*. v. 19, 2013.

GAGE, J. C. et al. Comparative performance of human papillomavirus DNA testing using novel sample collection methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 12, p. 4185–

4189, 2011.

GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 17 de maio de 2017.

GRIFFIN, H. et al. Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM. *Modern Pathology*, v. 28, n. 7, p. 977–993, 2015.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAHN, J. A. et al. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *Journal of Pediatrics*, v. 141, n. 5, p. 718–723, 2002.

KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e Embriologia: uma introdução à patologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KIM, J. W. et al. Factors affecting the clearance of high-risk human papillomavirus infection and the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of International Medical Research*, v. 40, n. 2, p. 486–496, 2012.

KIM, M.-J.; KIM, J. J.; KIM, S. Type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus by cervical cytology and age: Data from the health check-ups of 7,014 Korean women. *Obstetrics & gynecology science*, v. 56, n. 2, p. 110–20, 2013.

KRANJEC, C.; DOORBAR, J. Human papillomavirus infection and induction of neoplasia : a matter of fitness. *Current Opinion in Virology*, v. 20, p. 129–136, 2016.

LAGINHA, F. Vacinas contra HPV. *Rev Onco*, p. 36–39, 2011.

LAJER, C. B.; BUCHWALD, C. VON. The role of Human Papillomavirus in head and neck cancer. *Apmis*, v. 118, n. 6-7, p. 510–519, 2010.

LEVI, J. E. et al. Evaluation of HPV Molecular Tests in Primary Screening for Cervical Cancer in. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 4, n. June, p. 470–478, 2014.

LIRA, E. C. Co-infecção do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com citologia normal e alterada. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Amazonas. 2010.

LOPES, N. G. et al. Avaliação da Eficácia do Exame de Rastreamento de Lesões HPV em Mulheres. *Rev Enferm UFPE*, v. 10, n. 4, p. 1292–1298, 2016.

LONGATTO-FILHO, A. et al. Critical Analyses of the Introduction of Liquid-Based Cytology in a Public Health Service of the State of São Paulo , Brazil. *Acta Cytologica*, p. 273–277, 2015.

LORENZI, A. T.; SYRJANEN, K. J.; LONGATTO-FILHO, A. Human papillomavirus

(HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. *Virology Journal*, v. 12, p. 112, 2015.

LUCENA, E. E. S. et al. Método de coleta e a qualidade do esfregaço de mucosa oral. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.* v. 11, n. 2, p. 55-62, 2011.

MARIÑO, J. M. 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. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Amazonas. 2015.

MARTINS, T. R. Citologia Líquida e Teste Molecular para HPV de alto risco: Avaliação de novas modalidades de rastreamento para prevenção de Câncer de Colo do Útero na rede pública de Saúde do Estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Paulo, 2016a.

MARTINS, T. R. et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions : correlation to cytological data. *Virology Journal*, p. 1–9, 2016b.

MELONI, A. et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. *Journal of Public Health Research*, v. 3, n. 1, 2014.

MIRANDA, P. M. et al. Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 2, p. 1752–1761, 2012.

MISHRA, S. et al. Efficacy of Manual Liquid Based Cytology over Conventional Cytology in Oral Squamous Cell Carcinoma. v. 4, p. 11–15, 2015.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human Papillomavirus oncoproteins : pathways to transformation. *Nature Publishing Group*, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

MORSIED, K. et al. Human Papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis. *Otolaryngologia Polska*, v. 68, n. 5, p. 213–219, 2014.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytologica*, p. 121–132, 2015.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR Em Tempo Real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 33, p. 10–13, 2004.

OLIVEIRA, C. M. Existe Câncer Cervical Negativo?. 2011. 185f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, G. R. 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, n. 5, p. 26–32, 2013.

OLIVEIRA, E. S. DE et al. Citopatologia Cervical E Perfil Epidemiológico De Mulheres Com Vida Sexual Ativa. *Journal of Nursing UFPE / Revista de Enfermagem UFPE*, v. 9, p. 8985–8992 8p, 2015.

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.

PRIMO, W. Q. S. P.; CORRÊA, F. J. S.; BRASILEIRO, J. P. B. Manual de Ginecologia da Sociedade de Ginecologia e Obstetrícia de Brasília. 2. ed. Brasília: Editora Luan Comunicação. 704p. 2017.

QUEIROZ, F. A. et al. Detecção e genotipagem do HPV em mulheres com citologia indeterminada e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, 51(3):166-172, 2015.

QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T.; ZAIA, J. E. O Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 39, n. 2, p. 151–157, 2007.

PATEL, M. M.; PANDYA, A. N.; MODI, J. Cervical pap smear study and its utility in cancer screening, to specify the strategy for cervical cancer control. *National Journal of Community Medicine*, v. 2, n. 1, p. 49–51, 2011.

RAMA, C. H. et al. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. *Revista de Saude Publica*, v. 42, n. 3, p. 411–419, 2008.

RIBEIRO, J. P.; BORGES, I. Eficácia das Vacinas Contra o Vírus do Papiloma Humano nas Mulheres com mais de 24 Anos na Prevenção do Cancro do Colo do Útero. *Acta Med Port*, v. 29, n. 6, p. 401–408, 2016.

ROCHA, D. A. P. Epidemiologia Molecular de Patógenos Sexualmente Transmissíveis em Mulheres no Município de Coari, Amazonas. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2012.

ROCHA, D. A. P. et al. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Article ID 514859, 5 pages, 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 Nefrologia*, v. 45, n. 6, p. 457–462, 2009.

RODRÍGUEZ, A. C. et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 100, n. 7, p. 513–517, 2008.

ROSA, M. I. DA et al. Papilomavírus Humano e neoplasia cervical. *Caderno de Saúde Pública*, v. 25, n. 5, p. 953–964, 2009.

RYSER, M. D.; MYERS, E. R.; DURRETT, R. HPV Clearance and the Neglected Role of Stochasticity. *PLoS Computational Biology*, v. 11, n. 3, p. 1–16, 2015.

SALES, L. R. Caracterização da infecção por HPV em mulheres que realizam exame de rastreio do Câncer do Colo do Útero do Município de Manaus/Am. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Amazonas. 2015.

SANJOSE, S. DE et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer : a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, v. 11, n. November, p. 7–11, 2010.

SANTOS, C. G. D. S. O Diagnóstico Do Câncer Cérvico Vaginal. 2011.

SANTOS, L. A.; SILVÉRIO, A. DOS S. D.; MESSORA, L. B. Comparação do desempenho da Citopatologia Convencional e Citologia em Meio Líquido na detecção de lesões : uma revisão sistemática. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 12, n. 1, p. 99–107, 2014.

SANTOS, M. L.; MORENO, M. S.; PEREIRA, V. M. Exame de papanicolaou: qualidade do esfregaço realizado por alunos de enfermagem. *Rev bras cancerol*, v. 55, n. 1, p. 19–25, 2009.

SCHIFFMAN, M. et al. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, v. 103, n. 5, p. 368–383, 2011.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *NATURE REVIEWS*, v. 2, n. 1, 8 jul. 2016.

SCHMITT, M. et al. Prevalence and viral load of 51 genital human papillomavirus types and three subtypes. *International Journal of Cancer*, v. 132, n. 10, p. 2395–2403, 2013.

SERRAVALLE, K. et al. Comparação entre duas técnicas de genotipagem do HPV em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 37, n. 2, p. 94–99, 2015.

SIMION, N. et al. Conventional cytology versus liquid based cytology in cervical pathology : correspondences and inconsistencies in diagnosis , advantages and limits. *Embryol, Rom J Morphol*, v. 55, n. 4, p. 1331–1337, 2014.

STABILE, S. B. A. et al. Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncológica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido. *Einstein*, v. 10, n. 69, p. 466–472, 2012.

TAMER, E. et al. Demographic characteristics and risk factors in Turkish patients with anogenital warts. *Journal of Infection and Public Health*, v. 9, n. 5, p. 661–666, 2016.

TEIXEIRA, L. O. et al. Prevalência dos tipos de Papilomavírus Humano em mulheres atendidas em um Hospital Universitário no Sul do Brasil. *Medicina (Brazil)*, v. 49, n. 2, p. 116–123, 2016.

UIJTERWAAL, M. H. et al. Arguments in favor of HPV testing for cervical screening and post-treatment CIN2+ monitoring. *Expert review of molecular diagnostics*, v. 14, n. 3, p. 245–248, 2014.

VEO, C. A. R. et al. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk Human Papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumor Biology*, v. 36, n. 7, p. 5399–5405, 2015.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2 , the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, v. 445, p. 175–186, 2013.

WHEELER, C. M. et al. A population-based study of human papillomavirus genotype prevalence in the United States: Baseline measures prior to mass human papillomavirus vaccination. *International Journal of Cancer*, v. 132, n. 1, p. 198–207, 2013.

WOLSCHICK, N. M. et al. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 39, n. 2, p. 123–129, 2007.

WRIGHT, T. C. et al. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, v. 287, n. 16, p. 2120–9, 2002.

ZARDO, G. P. et al. Vacina como agente de imunização contra o HPV. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 19, n. 9, p. 3799–3808, 2014.

ZHANG, B. et al. Risk Factors for Cervical Cancer in Rural Areas of Wuhan China: a Matched Case-control Study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 14, n. 12, p. 7595–600, 2013.

ZHANG, Y. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and genotyping for population-based cervical screening in developed regions in China. *Oncotarget*, v. 7, n. 38, 2016.

ZHOU, X. H. et al. Distribution Characteristics of Human Papillomavirus Infection : A Study Based on Data from Physical Examination. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 18, p. 1875–1879, 2017

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

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP**  
**VERSÃO 002/13**

**I. IDENTIFICAÇÃO**

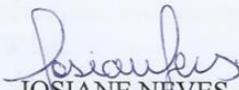
**Título:** Caracterização dos Genótipos de HPV a População de Rastreio e em Pacientes com Câncer de Colo Uterino do Estado do Amazonas

**Pesquisador:** Dra. Kátia Luz Torres Silva e Dr. José Eduardo Levi

**Data da Apresentação ao CEP:** 15.05.2013

**5. Parecer do CEP: Projeto APROVADO.** O pesquisador deverá apresentar relatórios parciais e final do estudo a este CEP.

**Data Parecer:** 15 / 06 / 2013

  
JOSIANE NEVES  
Secretária do  
Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Convidamos a Senhora para participar da Pesquisa “Caracterização dos genótipos de HPV na população de rastreamento e em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dra. Kátia Luz Torres Silva, Dra. Valquíria do Carmo 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 para autocoleta receberá instruções para uso do material de coleta.

O material coletado será utilizado unicamente para os objetivos da pesquisa e serão encaminhados para realização de exames especializados para pesquisa e genotipagem do vírus HPV.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos sendo apenas 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 consentir em sua participação a Senhora desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa 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 outra informação, o (a) Sr (a) 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-Infirmação

Eu, \_\_\_\_\_, 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.

Manaus, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



\_\_\_\_\_  
Assinatura da participante - Paciente

Impressão do dedo polegar  
caso não saiba assinar

## ANEXO C – Questionário

## Apêndice II- Instrumento de coleta de dados epidemiológicos, sociodemográficos e de risco para a infecção pelo HPV

Código no Projeto \_\_\_\_\_

### Dados do estudo

1. Data da abordagem para o estudo: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 2. Código de identificação da paciente na unidade: \_\_\_\_\_

### Dados pessoais

3. Iniciais da paciente: \_\_\_\_\_  
 4. Endereço para contato: \_\_\_\_\_  
 5. Telefone: \_\_\_\_\_ 6. Celular: \_\_\_\_\_  
 7. Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 8. Município de Nascimento: \_\_\_\_\_  
 9. Estado: \_\_\_\_\_ 10. Unidade de Saúde: \_\_\_\_\_  
 11. Município \_\_\_\_\_  
 12. Raça: ( ) Branca ( ) Negra ( ) Indígena ( ) Oriental  
 13. Estado civil: ( ) Solteira ( ) Casada ( ) Viúva ( ) Relação estável ( ) Divorciada

### Dados Sócio-demográficos

14. Escolaridade: ( ) Analfabeto ( ) Fundamental incompleto ( ) Fundamental completo  
 ( ) Médio incompleto ( ) Médio completo ( ) Superior incompleto ( ) Superior completo  
 15. Ocupação: \_\_\_\_\_  
 16. Renda familiar: ( ) 1 salário mínimo ( ) 2 – 3 salários mínimos ( ) ≥ 4 salários mínimos

### Dados comportamentais

17. Com qual idade iniciou a atividade sexual: ( ) menos de 14 anos ( ) 15 a 18 anos  
 ( ) mais de 18 anos  
 18. Faz uso de camisinha na relação sexual: ( ) Nunca ( ) as vezes ( ) Sempre  
 19. Se não utiliza, qual o motivo: \_\_\_\_\_  
 20. Usa ou usou algum método anticoncepcional (exceto camisinha)?  
 ( ) Pílula (anticoncepcional oral) Quanto tempo? \_\_\_\_\_ ( ) Anticoncepcional injetável  
 ( ) Dispositivo intra-uterino (DIU) ( ) Tabela ( ) Coito interrompido  
 ( ) Outro Especificar: \_\_\_\_\_  
 21. Número de parceiros sexuais em um ano: ( ) 1 ( ) 2 a 3 ( ) >4  
 22. Quantos parceiros sexuais já teve ao longo de sua vida: ( ) 1 a 5 ( ) 5 a 10 ( ) acima de 10  
 23. Número de filhos (paridade): ( ) zero ( ) 1 a 3 ( ) 4 a 5 ( ) >5  
 24. Idade do primeiro parto \_\_\_\_\_ 25. Qual tipo de parto: ( ) Normal ( ) Cesariana  
 26. Teve algum aborto: ( ) Nunca ( ) Sim 27. Quantos: \_\_\_\_\_

**Dados epidemiológicos**

28. Qual foi a data da sua última menstruação? \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_
29. Já apresentou doenças sexualmente transmissíveis: ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
30. Se sim, qual(is): \_\_\_\_\_
31. Já apresentou corrimento vaginal, verruga ou ferida? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
32. Já se vacinou contra o Papiloma vírus humano (HPV)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
33. Realiza exame preventivo de câncer de colo de útero com que frequência?
- ( ) Nunca realizou ( ) 1 x ao ano ( ) a cada 2 anos ( ) mais de 3 anos ( ) Não sabe
34. Qual foi o local de realização do último exame? ( ) Rede SUS ( ) Rede Não SUS ( ) Não sabe
35. Quais os motivos pelos quais não realizou o exame? ( ) Inibição ( ) Medo ( ) Falta de tempo ( ) Dificuldade de acesso ( ) Outros  
Especificar: \_\_\_\_\_
36. Teve alguma dificuldade para agendar o exame? ( ) Não ( ) Sim
37. Qual? \_\_\_\_\_
38. Tem algum familiar que já apresentou câncer de colo de útero ou outro tipo de câncer?
- ( ) Não ( ) Sim Quem? \_\_\_\_\_
39. Já apresentou alguma alteração em exames anteriores? ( ) Não ( ) Sim
40. Se estiver apresentando queixas clínicas, quais são?
- ( ) Úlceras genitais ( ) Dificuldade de urinar ( ) Sangramento durante relações sexuais  
( ) Corrimento vaginal ( ) Coceira ( ) Dor pélvica ( ) Outras Especificar: \_\_\_\_\_
41. A senhora fuma ou já fumou? ( ) Sim ( ) Não 42. Por quanto tempo? \_\_\_\_\_
43. Quantidade consumida de cigarros ao dia? \_\_\_\_\_
44. Idade de início do hábito de fumar? \_\_\_\_\_
45. Fez uso de algum medicamento sistêmico nos últimos 3 meses? ( ) Sim ( ) Não
46. Qual? ( ) Antibiótico ( ) Antifúngico ( ) Antiinflamatório ( ) Analgésico ( ) Outro  
Especificar: \_\_\_\_\_
47. Conhecimentos à cerca do HPV:
- ( ) Nunca ouviu falar sobre HPV
- ( ) Informação sobre HPV em mídia eletrônica ou impressa
- ( ) Informação sobre HPV em instituição de ensino
- ( ) Informação sobre HPV em instituição de saúde
- ( ) Conhecimento de vacinas sobre o HPV
- ( ) Conhecimento de tratamento para o HPV
- ( ) Conhecimento da associação do HPV com câncer de colo de útero
48. Quais as medidas que você conhece e que adota para prevenção do câncer de colo de útero?
- \_\_\_\_\_