

Rafael Martins Mafetoni

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV EM AMOSTRAS
ENDOCERVICAIS DE MULHERES HIV SOROPOSITIVAS DE
PALHOÇA/SC**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia, na área de concentração Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Mafetoni, Rafael Martins

Detecção e genotipagem do HPV em amostras
endocervicais de mulheres HIV soropositivas de
Palhoça/SC / Rafael Martins Mafetoni ; orientador,
Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, 2019.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Papilomavirus Humano (HPV). 3.
Virus da Imunodeficiência Humana (HIV). 4. Reação em
cadeia da polimerase (PCR). 5. Câncer do colo do
útero. I. Onofre, Alexandre Sherlley Casimiro. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV EM
AMOSTRAS ENDOCERVICAIS DE MULHERES
HIV SOROPOSITIVAS DE PALHOÇA/SC”**

POR

Rafael Martins Mafetoni

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



**Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC – Membro
Titular)**



Prof(a). Dr(a). Lisleia Golfetto (UFSC – Membro Titular)



**Prof(a). Dr(a). Alexandre Sherley Casimiro Onofre (UFSC –
Orientador(a))**

**Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 21 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por tudo, inclusive pela força e inteligência necessária para conseguir concluir este trabalho.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me deram incentivos para continuar estudando.

À minha noiva Carla, pela paciência, ajuda com o trabalho escrito e apoio em todos os momentos desta jornada.

Ao Professor Alexandre S. C. Onofre, no qual considero, acima de tudo, meu grande amigo que me deu a oportunidade de iniciar a pós-graduação e fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação durante todo o mestrado, me ensinou a lidar com todos os momentos do mestrado, principalmente com os difíceis, e acima de tudo por compartilhar suas experiências me ajudando a crescer tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

À Professora Maria Luiza Bazzo, por abrir as portas de seu laboratório para que eu pudesse aprender e dedicar meu esforço e trabalho para o andamento do projeto, por toda a ajuda oferecida para o bom andamento da pesquisa e com certeza pela oportunidade de aprendizado durante todo o processo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), pela troca de conhecimentos e ajuda nos momentos de necessidade.

À pós doutoranda Ana Paula Pessoa, no qual palavras aqui seriam poucas para dizer o quanto sou grato por toda ajuda e dedicação para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida, pela paciência em querer me ensinar mesmo nas vezes em que parecia uma porta para aprender, por me manter firme com os pés no chão para eu não desistir de lutar, sempre me apoiar e acreditar em mim até o final de todo trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Citologia (UFSC), pelos momentos divertidos de descontração e risadas, pelos auxílios técnicos e críticos durante as prévias das várias apresentações que tivemos, em especial pela Mariana por toda ajuda oferecida nesse trajeto, pelos cafezinhos no CCS, por ajudar com dúvidas e dividir os desespos.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, mas por si só não é suficiente para causar progressão neoplásica grave. A co-infecção com o HIV facilita a persistência da infecção pelo HPV e também novas infecções. Nosso objetivo foi detectar e avaliar a frequência de genótipos de HPV de alto e baixo risco em mulheres com HIV. De abril a julho de 2016, foram coletadas 114 amostras de mulheres atendidas no Centro Especializado de Aconselhamento e Prevenção de Palhoça-SC. Os dados sócio-demográficos foram obtidos por meio de um questionário no dia da coleta das amostras. Os métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) foram utilizados para detectar e genotipar o HPV, respectivamente. O DNA do HPV foi detectado em 37 amostras (32,5%) com predomínio de genótipos de alto risco (43,2%). Co-infecções de diferentes genótipos ocorreram em 18,9% das pacientes e todas apresentaram pelo menos um genótipo do HPV de alto risco. Vinte e dois diferentes genótipos foram encontrados, um deles com risco indeterminado. Maior frequência de HPV de alto risco foram HPV16 (11,8%) e HPV53 (11,8%) seguidos pelos HPV 45 (8,8%) e HPV6 (5,9%), HPV61 (5,9%), HPV62 (5,9%) e HPV83 (5,9%). Usando análise multivariada, as mulheres que iniciaram a vida sexual com menos de 18 anos (OD, 3,97, 95% CI, 1,0994-14,384, $p = 0,035$) tiveram maior risco de possuir HPV. Neste ponto de vista, as mulheres soropositivas para o HIV apresentaram maior frequência de genótipos de alto risco, o que pode facilitar o prognóstico do câncer do colo do útero. Portanto, deve-se considerar este tipo de população em termos de controle de vacinação e acompanhamento para triagem, a fim de reduzir os riscos para o desenvolvimento de câncer nessas mulheres.

Palavras-chave: HPV, HIV, PCR, RFLP, Câncer do colo do útero.

ABSTRACT

HPV is the major risk factor for development of uterine cervical cancer, but alone it is not sufficient to cause neoplastic progression. Co-infection with HIV facilitates persistence of HPV infection and also new infections. Our objective was to detect and to evaluate the frequency of high and low risk HPV genotypes in women with HIV. From April to July 2016, 114 samples from women attended at the Specialized Counseling and Prevention Center from Palhoça-SC, Brazil, were collected. Socio-demographic data were obtained through a questionnaire on the day of samples collection. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) were used to evaluate HPV genotypes. HPV DNA was detected in 37 samples (32.5%) with a predominance of high risk genotype (43,2%). 18.9% of women had co-infection with different genotypes and all co-infections had presence of at least one high-risk HPV. Twenty-two different genotypes were found, one of them with undetermined risk. More frequency of hrHPV was HPV16 (11.8%) and HPV53 (11.8%) followed by HPV 45 (5,9%) and HPV6 (5.9%), HPV61 (5.9%), HPV62 (5.9%) and HPV83 (5.9%). Using multivariate analysis, women who started sexual life under 18 years old (OD, 3.97, 95% CI, 1.0994 to 14.384, $p = 0.035$) had higher risk of harbour HPV. In this point of view, HIV-positive women presented higher frequency of high-risk genotypes, which may facilitate a prognosis for uterine cervical cancer. Therefore, we should consider this type of population in terms of vaccination control and follow-up for screening in order to reduce risks for the development of cancer in these women.

Keywords: HPV, HIV, PCR, RFLP, cervical cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do genoma viral do HPV. Adaptado de (De Sanjosé <i>et al.</i> , 2018)	23
Figura 2 - Representação do ciclo de vida do HPV e progressão ao câncer. Adaptado de (Woodman <i>et al.</i> , 2007).....	28
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação nas diferentes concentrações das diluições seriadas em PBS. * PM – Peso Molecular 100 pb; P1 ao P10 – pontos da diluição seriada; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo.....	52
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação nas diferentes concentrações das diluições seriadas em amostra humana sabidamente negativa para HPV.* PM – Peso Molecular 100 pb; P1 ao P10 – pontos da diluição seriada; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo.	52
Figura 5 - Eletroforese em agarose 1,5 % mostrando a amplificação pela PCR multiplex para detecção de HPV e beta-globina em amostras clínicas.*PM – Peso molecular 100 pb; Canaletas do 1 ao 11 – Amostras clínicas; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo. As canaletas 2, 3, 4, 6, 7 e 9 assinaladas foram positivas para HPV.....	53
Figura 6 - Eletroforese em agarose 1,5 % mostrando a amplificação pela PCR convencional para confirmação e utilização na etapa de genotipagem do HPV em amostras clínicas.*PM – Peso molecular 50 pb; Canaletas do 1 ao 11 – Amostras clínicas positivas para HPV; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo.	54
Figura 7 - Genotipagem de amostra clínica por PCR-RFLP do HPV16 em gel poliacrilamida 12%. PM – peso molecular 50 pb; Canaleta 1 – fragmentação com a enzima Pst I (210/216 pb); Canaleta 2 – fragmentação com a enzima Hae III (450 pb); Canaleta 3 -fragmentação com a enzima Ddel (450 pb); Canaleta 4 – fragmentação com a enzima Rsa I (310/70 pb); Canaleta 5 – Produto de PCR não digerido; PM* - peso molecular 25 pb.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos iniciadores, sequências, tamanho dos fragmentos e temperaturas de hibridização.	42
Quadro 2 - Genótipos amplificados com eficiência pelos primers PGMY09 e PGMY11.	43
Quadro 3 - Genótipos identificáveis pela metodologia de genotipagem por PCR-RFLP estratificados por risco oncológico.	46
Quadro 4 - Características sócio-demográficas e clínicas das pacientes participantes do estudo.	50
Quadro 5 - Razão de Chance e intervalo de confiança de 95% da associação entre a idade de início da vida sexualmente ativa (IVSA) e a positividade para DNA do HPV.	51
Quadro 6 - -infecções e a relação dos genótipos identificados.	56

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Etapas do projeto	39
-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CCU	Câncer do Colo do Útero
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
DIU	Dispositivo Intrauterino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
hrHPV	<i>High-risk Human Papillomavirus</i>
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
IST	Infecção sexualmente transmissível
JEC	Junção escamo colunar
LCR	<i>Long control region</i>
lrHPV	<i>Low-risk Human Papillomavirus</i>
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
TARV	Terapia Anti-retroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VIA	Inspeção visual com ácido acético
VLP	<i>Virus-like particles</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	HPV – PAPILOMAVÍRUS HUMANO	23
2.1.1	Estrutura do Genoma Viral	23
2.1.2	Classificação do HPV	24
2.1.3	História Natural da Infecção pelo HPV e Carcinogênese Cervical.....	26
2.1.4	Co-infecção HPV x HIV.....	28
2.1.5	Prevalência da Infecção pelo HPV e Câncer do Colo do Útero.....	29
2.2	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E PREVENÇÃO	30
2.2.1	Exame Citopatológico	30
2.2.2	Exame Histopatológico	31
2.2.3	Diagnóstico Molecular	31
2.2.3.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32
2.2.3.2	Genotipagem por Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP).....	33
2.2.4	Rastreamento.....	33
2.2.5	Vacinação.....	35
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4.	METODOLOGIA	39
4.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	39
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS	40
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	40
4.3.1	Extração do DNA	40
4.4	DETECÇÃO DO DNA VIRAL.....	41

4.4.1	Teste de Sensibilidade.....	41
4.4.2	PCR Multiplex para Detecção do HPV e Controle Interno de Qualidade.....	41
4.4.3	PCR com Iniciadores PGMY09 e PGMY11 para Genotipagem.....	44
4.5	GENOTIPAGEM UTILIZANDO POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	45
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5.	RESULTADOS	49
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SÓCIO-DEMOGRÁFICAS	49
5.2	PCR MULTIPLEX	52
5.3	PCR COM INICIADORES PGMY09 E PGMY11 PARA GENOTIPAGEM.....	53
5.4	GENOTIPAGEM UTILIZANDO POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	54
6.	DISCUSSÃO	57
7.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero (CCU), ou câncer cervical, é uma doença grave considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Possui como principal fator de risco a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), no qual a persistência da infecção pode comprometer as células causando anormalidades em seus núcleos e ocasionando lesões pré-cancerosas e um crescimento celular anormal (WHO, 2014).

No mundo em 2018 foram registrados 311.365 mortes causadas pelo CCU representando 3,2% de todas as mortes causadas por câncer. Foi estimado que no ano em questão haveriam cerca de 569.847 novos casos. Dentre todos os tipos de câncer que acometem tanto homens quanto mulheres, o CCU é o oitavo tipo de câncer mais comum em todo o mundo, sendo que na população feminina ela está em quarto lugar como o mais frequente (Bray *et al.*, 2018). No Brasil cerca de 5.800 foram a óbito em 2016, com estimativa para o biênio 2018/2019 de 16.370 novos casos. No país é o 3º câncer mais frequente e alcançou o 2º lugar na região sul (BRASIL, 2018b). Em Santa Catarina levou a óbito 171 mulheres em 2016 com 17 mortes registradas em Florianópolis e 4 em Palhoça (Brasil, 2018a).

A evolução das lesões celulares para câncer depende, principalmente, do genótipo do HPV, que são classificados como de alto risco oncogênico e de baixo risco oncogênico, no qual estão relacionados principalmente com o desenvolvimento de câncer do colo do útero e verrugas genitais, respectivamente (Serrano *et al.*, 2018). Essa classificação é baseada na frequência com que os genótipos são encontrados em amostras de câncer do colo do útero, sendo então os de alto risco os mais frequentemente identificados e considerados com uma maior capacidade de promover a evolução das lesões à um câncer (Muñoz *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2018).

Atualmente considera-se que apenas a infecção pelo HPV por si só não é capaz de promover o desenvolvimento de um câncer. Além de tudo a persistência da infecção é um fator que contribui ativamente no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (Burd, 2003). Vários fatores facilitam e promovem tanto a entrada do vírus no organismo como a persistência no qual pode resultar no desenvolvimento de câncer. Infecções virais, outras infecções sexualmente transmissíveis, idade, hábitos comportamentais (tabagismo, etilismo, uso de drogas ilícitas, uso de preservativos, promiscuidade), uso de anticoncepcionais e a

idade de início da vida sexualmente ativa (IVSA) são exemplos e considerado como fatores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento neoplásico (Stoler, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2007; Natphopsuk *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016; Guidry e Scott, 2017; Shi *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018).

Dentre os fatores de risco citados, a infecção pelo HIV é o fator mais preocupante considerando a vulnerabilidade no qual este tipo de infecção traz ao hospedeiro (Guidry e Scott, 2017). Estudos mostram que mulheres infectadas pelo HIV e posteriormente infectadas pelo HPV desenvolvem câncer 10 anos mais cedo do que as mulheres não infectadas. A progressão a partir da infecção pelo HPV e aparecimento das lesões celulares até o desenvolvimento de um câncer invasivo ainda é um processo lento. Esse intervalo de tempo facilita na prevenção e rastreamento do câncer cervical através de programas ou protocolos de rastreio (Burd, 2003; Liu *et al.*, 2014; Gravitt e Winer, 2017); WHO, 2019).

Em estudo de meta-análise realizado por Freitas e colaboradores em 2015 evidenciou que há poucos estudos que envolvam mulheres HIV soropositivas que estão direcionados para o rastreio dos genótipos de HPV de alto risco em Santa Catarina. Por isso, em se tratando de mulheres HIV soropositivas no estado, o objetivo desse estudo foi avaliar as frequências de infecções pelo HPV e dos genótipos envolvidos nessa população com a finalidade de realizar um levantamento sobre a frequência de infecções pelo HPV com seus respectivos genótipos e a relação das infecções com alguns fatores comportamentais e sociais considerados de risco.

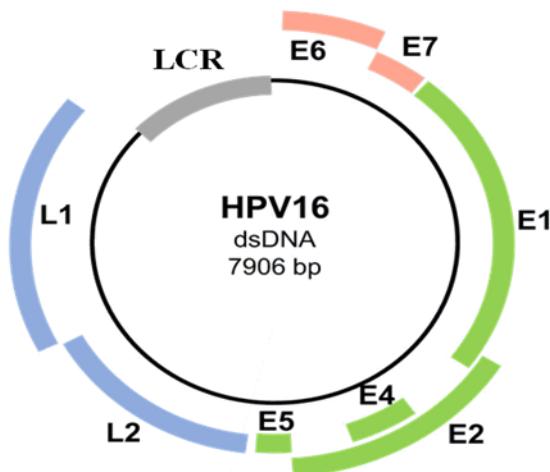
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HPV – PAPILOMAVÍRUS HUMANO

2.1.1 Estrutura do Genoma Viral

O HPV é um vírus do tipo não envelopado de, aproximadamente, 55 nm de diâmetro que possui um capsídeo icosaédrico composto por 72 capsômeros. Seu genoma possui DNA do tipo circular de fita dupla com cerca de 8.000 pares de base no qual apenas uma das fitas do DNA atua como molde para transcrição. Esta fita codificadora compreende três principais regiões genômicas e incluem cerca de 10 principais fragmentos de leitura aberta ou *open reading frame* (ORFs) responsáveis pela transcrição de proteínas essenciais para a regulação e replicação viral, bem como a manipulação do meio celular. Tais regiões são denominadas como precoce (*early* - E), tardia (*late* - L) e a terceira região referenciada na literatura como região de controle longo (*long control region* - LCR), *upstream regulatory region* – URR ou região não-codificada (*noncoding region* – NCR) (Figura 1) (Harden e Munger, 2017; Van Doorslaer *et al.*, 2018).

Figura 1 - Representação do genoma viral do HPV. Adaptado de De Sanjosé *et al.*, 2018



A região precoce, representando 50% do genoma viral, inclui as ORFs E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8. As proteínas codificadas pelas E1 e E2 são as mais importantes pois são responsáveis pela transcrição viral, replicação e particionamento do genoma. A proteína E1, conhecida como helicase, tem papel fundamental sendo a única enzima viral responsável pela replicação e amplificação do DNA viral no núcleo das células hospedeiras infectadas. Já a proteína E2 atua como um regulador do ciclo de vida viral, possuindo um papel crucial na regulação da transcrição das proteínas, iniciação da replicação do DNA e particionamento do genoma viral. Quando em sua forma completa a proteína E2 codifica um ativador de transcrição e na forma incompleta ocorre uma fusão entre proteínas formando a E8^{E2} que atuam como repressores transcricionais. Quando E4 é incorporada no gene E2 ocorre a expressão de uma proteína de fusão E1^{E4} que ocorre durante os estágios finais do ciclo viral. As proteínas E4 também podem ligar-se a filamentos de citoqueratina fazendo com que interrompam a estrutura e isso esteja ligada à fuga do vírus de camadas epiteliais cornificadas. A proteína E5, que ainda não tem sua função muito bem esclarecida, parece desempenhar um papel na apoptose celular e evasão da resposta imune. As ORFs E6 e E7, consideradas as mais importantes do ponto de vista clínico, são as responsáveis por codificar as denominadas oncoproteínas. Elas atuam impulsionando a entrada do vírus no ciclo celular permitindo a amplificação do genoma nas camadas epiteliais superiores. As oncoproteínas E6 ligam-se e degradam a p53 e ativam a telomerase, já as E7 degradam o gene supressor de tumor de retinoblastoma (pRB) e em conjunto com a E6 contribuem para a progressão maligna por induzir instabilidade genômica (Zheng e Baker, 2006; Harden e Munger, 2017).

A região tardia (L), representa 40% do genoma e estão presentes as ORFs L1 e L2 responsáveis por codificarem as proteínas estruturais do capsídeo viral, sendo que o L1 expressa proteínas da porção maior do capsídeo e as L2 da menor. Por fim, o LCR que não está envolvido na tradução de nenhuma proteína, mas representa 10% do genoma e é responsável pela origem das replicações bem como múltiplos locais de ligação ao fator de transcrição (Zheng e Baker, 2006; Harden e Munger, 2017).

2.1.2 Classificação do HPV

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* que está atualmente dividida em duas subfamílias: a *Firstpapillomavirinae* que inclui cerca

de 50 gêneros com mais de 130 espécies e a *Secondpapillomavirinae* com um único gênero e espécie (Van Doorslaer *et al.*, 2018). Os papilomavírus possuem como hospedeiros classes diferentes de animais como mamíferos, peixes, répteis ou pássaros sendo assim classificados e enquadrados em suas subfamílias de acordo com as suas definições filogenéticas, relação entre espécie/hospedeiro e diferenças na organização genômica, baseando-se na sequência idêntica de 60% ou mais de nucleotídeos do ORF L1. Na prática, como os gêneros não possuem um critério rigoroso de classificação, pelo fato de apresentarem entre si menos de 60% da sequência idêntica de nucleotídeos de L1, eles são classificados basicamente por inspeção das árvores filogenéticas com derivação das sequências de nucleotídeos de E1, E2, L1 e L2 (Bernard *et al.*, 2010; Van Doorslaer *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, o HPV é descrito como tipo ou genótipo e estes tipos são classificados de acordo com a região ORF L1 que é a mais conservada do genoma viral. Utilizando-se disso, um novo tipo é reconhecido quando o genoma todo foi clonado e a sequência de DNA da região L1 difere em mais de 10% do tipo mais próximo conhecido. Quando essa diferença ocorrer entre 2 e 10% temos então um subtipo e quando for menor de 2% é então identificado como variante. Dentre as inúmeras variações existentes do Papilomavírus, atualmente estão descritos 225 genótipos diferentes capazes de infectar a espécie humana dos quais, aproximadamente, 60 possuem tropismo pelo epitélio mucoso (HPV Center, 2018; (De Villiers *et al.*, 2004; Harden e Munger, 2017).

Atualmente, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) classifica 12 genótipos como oncogênicos ou de alto risco: 16, 18, 33, 58, 31, 52, 35, 59, 45, 39, 51, 56 (Bouvard *et al.*, 2009). Outros estudos classificaram como de alto risco oncológico 22 genótipos por estarem associados com lesões de alto grau e câncer de colo do útero (16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85 e 91), três potencialmente oncogênicos (26, 53 e 66) e 27 genótipos como baixo risco oncológico por estarem associados a lesões benignas e verrugas genitais (6, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 64, 70, 71, 72, 74, 78, 81, 83, 84, 86, 87, 89 e CP6108) (Muñoz *et al.*, 2003; De Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010). Os HPV 16 e 18 são os genótipos de alto risco mais frequentes encontrados em pacientes com CCU e responsáveis por cerca de 70% dos casos no mundo. Os tipos 6 e 11 são os mais frequentes entre os de baixo risco e normalmente são encontrados em lesões benignas com verrugas (Serrano *et al.*, 2018).

2.1.3 História Natural da Infecção pelo HPV e Carcinogênese Cervical

Naturalmente, a infecção do HPV se dá através de contato sexual com uma elevada incidência quando se trata de mulheres jovens, principalmente, as que acabaram de iniciar a vida sexual apresentando um aumento a cada novo parceiro. Essa proporção tende a diminuir quando observado em mulheres com idades mais avançadas (Collins *et al.*, 2005; Gravitt e Winer, 2017). Os órgãos mais susceptíveis à infecção com algum potencial capaz de gerar alguma alteração neoplásica é o colo do útero e a região pectínea do canal anal. A partícula viral do HPV pode ser detectada no colo do útero, vagina e vulva na mulher, na glândula, prepúcio e pele do pênis e escroto no homem (Castellsagué, 2008).

O HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer, mas não o único suficiente para causar progressões neoplásicas, pois acredita-se que além da infecção pelo HPV, outros fatores são necessários para o desenvolvimento da malignidade (Castellsagué *et al.*, 2002; Castellsagué e Muñoz, 2003). A maioria das infecções por HPV se resolvem de forma espontânea sem nenhuma intervenção médica. Porém, nos demais casos, a persistência da infecção que é considerada a principal causa do desenvolvimento do CCU, possui uma progressão lenta podendo levar de 15 a 20 anos para desenvolver o câncer em mulheres sadias. Mulheres com deficiências no sistema imunológico, como as portadoras do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) sem tratamento podem desenvolver um câncer dentro de apenas 5 a 10 anos (Burd, 2003); WHO, 2019). Outros fatores de risco potencializam as chances à uma progressão neoplásica como: (i) o número de parceiros ao longo da vida, (ii) a idade do primeiro intercurso sexual, (iii) tabagismo, (iv) deficiências alimentares, (v) uso de medicamentos imunossupressores e (vi) uso prolongado de anticoncepcionais. Outros agentes infecciosos sexualmente transmissíveis como herpes simples, clamídia ou HIV também são classificados como fatores que podem desencadear o desenvolvimento de câncer (Stoler, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2007; Natphopsuk *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016; Guidry e Scott, 2017; Shi *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018).

As Infecções podem se apresentar na forma latente, no qual não se detecta a presença do vírus; na forma sub-clínica, em que observa-se a presença do vírus porém com morfologia normal ou discretas alterações no epitélio infectado e na forma clínica com a presença de lesões epiteliais evidentes (Passos *et al.*, 2008). Aproximadamente 90%

das novas infecções por HPV se tornam indetectáveis em 1 a 2 anos e tal situação pode representar uma resposta imune em níveis indetectáveis, uma latência viral ou um fenômeno denominado *clearance viral* (Schiffman *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014; Shew *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2016).

Mesmo com a grande diversidade de genótipos existentes de HPV, apenas uma pequena parcela é responsável pelo desenvolvimento de câncer do colo de útero. Os genótipos de alto risco têm uma capacidade maior de ocasionar uma proliferação celular em camadas basais e diferenciadas, que apesar de não serem capazes de completar o ciclo natural viral têm a capacidade de ativar vários outros meios que estimulam a transformação epitelial. A atividade das oncoproteínas E6 e E7 é uma das explicações para a capacidade aumentada de carcinogênese dos genótipos de alto risco e mesmo que E6 e E7 façam parte de todos os genótipos do HPV, seu papel nos tipos de baixo risco está relacionado com o aumento da aptidão e produção viral e possui uma capacidade muito reduzida de ocasionar o desenvolvimento de lesões neoplásicas e câncer (Schiffman *et al.*, 2016).

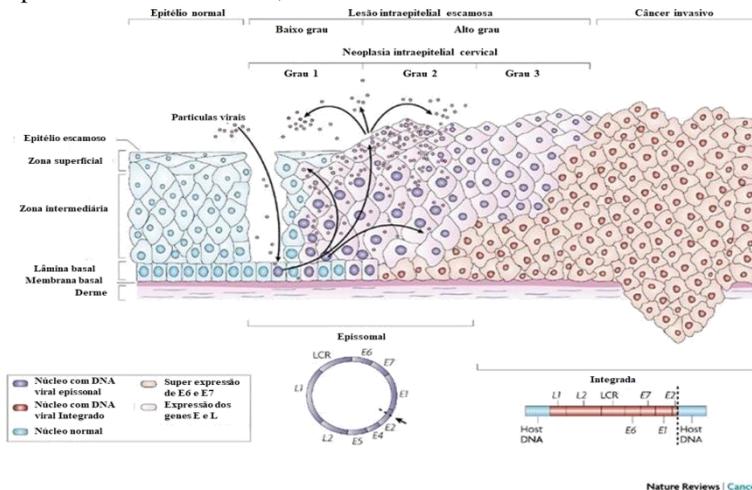
A carcinogênese intra-uterina se inicia quando a infecção persistente pelo HPV causa alterações nucleares de caráter maligno em células epiteliais ou glandulares localizadas no colo do útero em uma região conhecida como junção escamo colunar (JEC). O vírus infecta células basais do epitélio escamoso, através de micro-fissuras ou contato com a camada basal. As células basais infectadas iniciam então a produção de partículas virais que podem vir a gerar lesões nas células de baixo e alto grau sujeitas a evoluir para um câncer invasivo (De Sanjosé *et al.*, 2018).

Existem três principais estágios dessa infecção persistente pelo HPV: latente, permissivo (produtivo) e transformador. Na forma latente, o DNA viral se mantém com baixas cópias em um estado extracromossomal (episomal). A integração do DNA viral com o DNA da célula hospedeira ocorre no estágio produtivo onde há uma grande expressão gênica viral resultando na replicação do vírus e liberação de partículas virais na superfície epitelial. Como a expressão gênica do vírus ocorre em paralelo com a diferenciação epitelial nesse estágio, as oncoproteínas E6 e E7 são expressas nas células das camadas basais e são rigorosamente controladas favorecendo a proliferação e resultando na multiplicação das células que transportam o genoma viral. Clinicamente, nesse ponto é possível ocorrer lesões de baixo grau ou modificações morfológicas características de infecção por HPV como a presença de coilócitos. O estágio transformador, ainda não muito bem

elucidado e presente em uma pequena parcela das infecções, é uma transição do estágio produtivo para o transformador que pode ocorrer por uma super expressão das oncoproteínas E6 e E7 e, do ponto de vista clínico, caracterizar as lesões pré-cancerosas de alto grau (Figura 2) (Krawczyk *et al.*, 2008; Prigge *et al.*, 2017; De Sanjosé *et al.*, 2018).

A integração viral é a principal responsável pelo desenvolvimento de lesões malignas nas células podendo causar alterações importantes nas funções celulares. Tais alterações podem silenciar genes de suma importância que atuam nas correções de erros durante a replicação do DNA ou que estão ligados com o processo de apoptose celular (Shirasawa *et al.*, 1986; Choo *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 2014; Shukla *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015).

Figura 2 - Representação do ciclo de vida do HPV e progressão ao câncer. Adaptado de Woodman *et al.*, 2007.



2.1.4 Co-infecção HPV x HIV

Como um dos co-fatores de importância no desenvolvimento de câncer uterino envolvendo o HPV, a ligação entre câncer e infecção pelo HIV já é feita desde o conhecimento da imunossupressão causada por esse patógeno, mais conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS – *acquired immune deficiency syndrome*). Durack, em 1981, descreve uma associação entre o sarcoma de Kaposi com outras infecções oportunistas reconhecendo isso como um marco da AIDS. Em 1990, o CDC (*Center for Disease Control and Prevention - EUA*) emitiu

relatórios sobre a possibilidade de risco aumentado de CCU em mulheres portadoras do vírus HIV e, em 1992, inclui o CCU como uma definição de caso de vigilância da AIDS (CDC, 1990). Um estudo feito por Maiman e colaboradores (1990) avaliou 114 mulheres com displasia cervical e câncer e diagnosticou 37 com câncer cervical. Todas tinham menos de 50 anos e 19% delas eram HIV soropositivas e apresentavam o maior estágio da doença.

Apesar da significativa diminuição na incidência de alguns tipos de câncer após o início das terapias anti-retrovirais, como o sarcoma de Kaposi e linfoma não-Hodgking, para o CCU e câncer anal, a diminuição dessas neoplasias não foi tão significativa (Cancer, 2000). Mulheres vivendo com HIV possuem maior tendência a ter infecção persistente pelo HPV, sendo mais propensas a desenvolver lesões neoplásicas e câncer (Ghebre *et al.*, 2017). Um estudo feito por Orlando e colaboradores (2017) observou que mais de 60% das lesões HSIL nas pacientes com HIV foram causadas pela infecção de um ou mais genótipos do HPV o qual não eram nem o genótipo HPV16 e nem o HPV18. Esse mesmo estudo comparou a presença do HPV16 em pacientes com e sem HIV tendo este genótipo maior frequência em ambas populações seguido pelos genótipos HPV52, 66, 31 e 53 nos HIV soronegativos, e HPV66, 53, 52 e 31 nas HIV soropositivos (Orlando *et al.*, 2017).

Em pacientes imunossuprimidos, a associação dos tipos de alto e baixo risco é um fator importante no desenvolvimento de lesões pré-malignas até a evolução para um câncer. Um estudo realizado na Itália com grupos de mulheres infectadas e não infectadas com o HIV, observou que o grupo de mulheres infectadas com HIV apresentaram uma maior frequência de anormalidades citológicas no exame de Papanicolaou em relação ao grupo não infectado com o HIV. Além da prevalência do genótipo 16 na maioria das lesões das pacientes HIV soropositivas, ainda observou a presença de genótipos do HPV sem um risco ainda estabelecido e de genótipos de baixo risco (6, 54, 72 e 81) em 18% das pacientes com lesões de baixo grau (LSIL) e 8% com lesões de alto grau (HSIL) (Tornesello *et al.*, 2008).

2.1.5 Prevalência da Infecção pelo HPV e Câncer do Colo do Útero

O CCU é o oitavo tipo de câncer mais comum no ranking mundial e o quarto mais frequente entre a população feminina. Em escala mundial em 2018, estimou-se 569.847 novos casos, com taxa de incidência de 13,1 para cada 100.000 mulheres e 311.365 mortes,

representando 3,2% das mortes causadas por neoplasias no mundo. Apesar de estar em segundo lugar em incidência e mortalidade em países menos desenvolvidos, atrás apenas do câncer de mama, o CCU é a neoplasia mais diagnosticada em 28 países e a maior responsável por mortes em 42 países (Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, em 2016, foram registradas 5.847 mortes por essa neoplasia (BRASIL, 2018a). Estima-se para o biênio 2018/2019 cerca de 16.370 novos casos, com uma taxa de incidência de 15,43 casos para cada 100.000 mulheres, alcançando o terceiro lugar no ranking nacional. Desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o CCU é o primeiro mais frequente no Norte do país, com uma taxa de 25,62 casos para cada 100.000 mulheres. Nas regiões Nordeste (20,47/100.000) e Centro-Oeste (18,32/100.000) é o segundo mais frequente e nas regiões Sul (14,07/100.000) e Sudeste (9,97/100.000) é o quarto com maior frequência (BRASIL, 2018b).

Em Santa Catarina, em 2016, essa neoplasia levou a óbito 171 mulheres, sendo registrado 17 mortes em Florianópolis e 4 na cidade de Palhoça (BRASIL, 2018a). Estima-se para 2018/2019 no estado, uma taxa de novos casos de 13,23 para cada 100.000 mulheres (BRASIL, 2018b).

2.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E PREVENÇÃO

2.2.1 Exame Citopatológico

Responsável por salvar muitas vidas de mulheres no decorrer de quase 70 anos, o médico George Nicholas Papanicolaou desenvolveu a técnica de rastreamento mais utilizada, atualmente, no mundo. Desde meados da década de 1920, Papanicolaou observou, em suas pesquisas, a presença de células malignas em esfregaços de mulheres e levantou a hipótese da possibilidade de detecção precoce de câncer do colo do útero. Foi em 1928 que George Nicholas Papanicolaou publica seu artigo onde descreve a técnica hoje conhecida como Teste de Papanicolaou (Shingleton *et al.*, 1995; Diamantis *et al.*, 2014). O método passou a ser utilizado para o rastreio do câncer do colo do útero entre as décadas de 1940 e 1950 (Shingleton *et al.*, 1995).

Inicialmente, a terminologia sugerida para a diferenciação dos achados citológicos, baseados nas características morfológicas, foi estabelecida pelo próprio Papanicolaou, em 1954, como uma classificação numérica de 5 classes: Classe I para células normais e ausência de atipia, Classe II para citologia atípica sem malignidade,

Classe III para citologia sugestiva, mas não conclusiva, para malignidade, Classe IV para citologia fortemente sugestiva para malignidade e Classe V para citologia conclusiva para malignidade (Herbert *et al.*, 2007).

Devido as confusões entre laboratórios e clínicos causadas pela terminologia de Papanicolaou, em 1988, com o intuito de tornar mais claro e simples as interpretações dos achados citológicos e uniformizar os sistemas de nomenclaturas foi introduzido o Sistema de Bethesda. Essa nomenclatura foi revisada nos anos de 1991 e em 2001, sendo que em 2014 teve a sua última atualização (Solomon *et al.*, 2002; Apgar *et al.*, 2003; Wilbur e Nayar, 2015). Portanto, sendo atualmente, a nomenclatura adotada pela maioria dos países incluindo o Brasil, o Sistema de Bethesda classifica os achados citológicos em: alterações benignas sem lesões intraepiteliais, atípicas de significado indeterminado (ASC-US), lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), atipia glandular, adenocarcinoma *in situ* (AIS), carcinoma invasivo e adenocarcinoma invasivo (Nayar e Wilbur, 2017).

2.2.2 Exame Histopatológico

A histopatologia definiu historicamente os conceitos de desenvolvimento da progressão de pré câncer ao câncer cervical. O conceito de pré-câncer foi refinado ao longo de mais de um século no qual incluiu alterações menos severas e displásicas (Jenkins, 2007). O diagnóstico histopatológico baseia-se em critérios morfológicos de tecidos sendo considerado o padrão ouro para avaliações morfológicas (Silva *et al.*, 2018). A nomenclatura atualmente utilizada foi unificada e denominada por Ralph M. Richart, em 1967, como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que englobava tanto os achados ditos como displásicos e os carcinomas *in situ*, e foram classificados em NIC I, NIC II, NIC III e câncer invasivo (Ralph M. Richart, 1967; N'golet, 2000).

2.2.3 Diagnóstico Molecular

Está bem estabelecido que o câncer de colo do útero possui uma forte relação causal com a persistência da infecção pelos genótipos de alto risco do HPV. Desde então, pesquisas têm focado na avaliação de testes para detecção do DNA viral do HPV como um método alternativo para o rastreio do câncer de colo do útero. Com o avanço da tecnologia, atualmente, cada vez mais novos testes para identificação do HPV vêm

sendo desenvolvidos. Considerando a dificuldade do crescimento do HPV em culturas convencionais e a baixa sensibilidade em testes imunológicos, o diagnóstico para detecção e identificação do vírus necessita da detecção do genoma viral em amostras celulares coletadas dos locais de interesse para investigação (Koliopoulos *et al.*, 2017).

A detecção molecular do DNA e RNA do HPV é atualmente o padrão ouro para a identificação de infecções pelo HPV e está dividido em três principais categorias de ensaio: os ensaios de hibridização não amplificado, ensaios de hibridização por amplificação de sinal e ensaios por amplificação de alvo (Tsikouras *et al.*, 2016). Em pesquisas clínicas os métodos abordados são do tipo de amplificação sendo categorizadas em amplificação de sinal e amplificação de alvo e dentro dessas categorias as maiores representantes são os métodos de captura híbrida 2 (HC2) e as reações em cadeia da polimerase (PCR), respectivamente. Atualmente existem três testes comerciais baseados em DNA e um baseado em RNA aprovados pela FDA: Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA test (HC2; Qiagen, Hilden, Germany), o Cervista HPV HR test (CER; Hologic, Madison, WI), o Cobas® HPV test (Roche, Pleasanton, USA) e Aptima® HPV assay (Hologic, San Diego, CA) baseado em RNA. (Koliopoulos *et al.*, 2017; Samwel *et al.*, 2019; Tsikouras *et al.*, 2016).

2.2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase é um método muito utilizado que amplifica uma sequência específica do DNA de modo exponencial em uma sequência cíclica que utiliza ciclos repetitivos com variações de temperatura para assim realizar a desnaturação do DNA alvo, a hibridização dos *primers* e por fim a extensão da fita nova de DNA. Este ensaio é um método sensível pois sintetiza uma quantidade elevada de cópias de uma região específica do DNA a partir de pequenas quantidades de seu alvo, o que possibilita a sua utilização em amostras que contenham uma quantidade escassa de células ou DNA (Snijders *et al.*, 2010; Koliopoulos *et al.*, 2017).

Os *primers* mais utilizados em amostras clínicas para detecção da maioria dos genótipos de HPV normalmente são do tipo consensos que são direcionados a sequências específicas e conservadas do genoma viral (MY09-MY11, GP+5-GP+6, PGMY09-PGMY11 e SPF10). O PGMY09/PGMY11 amplifica um alvo de 450 pb que tem como alvo a região L1 do HPV e possui uma sensibilidade e reprodutibilidade

superior do que o seu antecessor MY09/MY11 (Gravitt *et al.*, 2000; Snijders *et al.*, 2010; Şahiner *et al.*, 2014).

Testes de PCR possuem um custo-efetividade menor quando comparado com outros métodos de detecção e com uma concordância na detecção do DNA quase idêntica. Esse fator torna o método um potencial ensaio para ambientes clínicos de poucos recursos financeiros (Samwel *et al.*, 2019).

2.2.3.2 Genotipagem por Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

Produtos amplificados de PCR podem ser analisados por vários tipos de testes de genotipagem, sendo um deles o Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição. Este método envolve a fragmentação do produto de PCR por enzimas de restrição que cortam o DNA em regiões específicas formando fragmentos que ao ser analisados em gel de poliacrilamida geram um padrão que pode ser específico para um determinado genótipo quando se trata do HPV (Nobre *et al.*, 2008).

Esta é uma metodologia que possui um custo-efetividade melhor do que outros métodos de genotipagem do HPV, sendo um bom candidato como teste primário para países de baixa renda (Nobre *et al.*, 2008; Golfetto *et al.*, 2018). O RFLP está limitado quanto a variedade de genótipos capaz de identificar não sendo possível a identificação de todos os conhecidos atualmente, frequentemente utiliza grande quantidade de enzima de restrição e ainda podem ser ineficaz ou demandar tempo durante a análise dos padrões dos resultados para identificação do HPV, principalmente em padrões de múltiplas infecções (Nobre *et al.*, 2008). A combinação do uso das enzimas PstI, RsaI, HaeIII e DdeI, feito por Nobre e colaboradores em 2008, tornou o método suficientemente eficiente, sendo capaz de identificar 49 genótipos diferentes do HPV incluindo 23 variantes e 2 subtipos, mais barato e com um uso relativamente menor das enzimas sem a necessidade da utilização de equipamentos sofisticados para a análise dos resultados.

2.2.4 Rastreamento

A abordagem de prevenção proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) segue um programa integral em três níveis independentes: i) prevenção primária - visa reduzir o risco de infecção pelo HPV propondo a vacinação de meninos e meninas de 9 a 13 anos,

como ponto principal, e a educação sexual e distribuição de camisinhas para meninos e meninas sexualmente ativos; ii) prevenção secundária - propõe o rastreamento e tratamento das lesões precursoras do câncer a partir do aconselhamento e rastreamento de lesões neoplásicas em mulheres de 30 a 49 anos e o tratamento dessas lesões; e iii) prevenção terciária - consiste no tratamento das pacientes que desenvolveram o CCU visando atingir o objetivo da redução da mortalidade associada (WHO, 2014).

A OMS recomenda o rastreamento de lesões precursoras através da citologia ou inspeção visual com ácido acético (VIA – *Visual Inspection with Acetic Acid*), assim como, o rastreamento do HPV através de testes moleculares em mulheres de 30 a 49 anos de idade ou em mulheres mais jovens que apresentem lesões de alto grau (Bray *et al.*, 2018). A faixa etária e a frequência do rastreamento vai depender da proporção local das mulheres que apresentam lesões precursoras ou câncer em relação às mulheres da mesma faixa etária, o número de novos casos de câncer nos últimos três anos, assim como a prevalência da infecção pelo HIV. Nas mulheres que apresentam resultado negativo dos exames diagnósticos, a recomendação é repetir os testes em um intervalo de três a cinco anos e nas mulheres submetidas a tratamentos de lesões precursoras o intervalo deve ser de um ano (Smith *et al.*, 2017); WHO, 2014). Atualmente, o método mais utilizado é o exame citopatológico de Papanicolaou, porém, outras metodologias vem ganhando espaço como a VIA para visualização das lesões causadas pelas infecções do HPV e métodos moleculares como PCR para a detecção do DNA viral (Koliopoulos *et al.*, 2017; Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, o programa de rastreamento utiliza o exame citopatológico Papanicolaou como método de rastreamento. O exame é repetido a cada três anos para mulheres com resultados normais e em mulheres que após apresentarem algum resultado positivo para lesão precursora estiverem com resultados negativos para qualquer dessas lesões após dois exames anuais consecutivos. A faixa etária é de 25 a 64 anos e, se após essa idade houver dois exames negativos consecutivos nos últimos 5 anos, o rastreamento pode ser interrompido. Algumas situações especiais podem alterar as recomendações para o rastreamento como, por exemplo, gravidez, imunossupressão, histerectomia e pós-menopausa, sendo que há uma atenção especial quando se trata de mulheres imunossuprimidas pela facilidade de desenvolver lesões e câncer invasivo. Nessa população é recomendado que o exame seja realizado logo após o início da vida sexual em intervalos de 6 meses no primeiro ano e, se os resultados estiverem normais, o seguimento deve ser anual até qualquer alteração (Brasil, 2016).

2.2.5 Vacinação

Atualmente, existem três vacinas profiláticas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para a prevenção da infecção pelo HPV: i) bivalente (Gardasil - Merck & Co., Inc) capaz de imunizar contra os HPV 16 e 18, ii) quadrivalente (Cervarix - GlaxoSmithKline Biologicals) contra os HPVs 6, 11, 16 e 18; e iii) nonavalente (Gardasil 9 - Merck & Co., Inc) contra os HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Todas são compostas de preparações purificadas de partículas conhecidas como VLPs (*virus-like particles*). Nesse caso, são partículas semelhantes à principal proteína presente no capsídeo viral (L1) (Markowitz *et al.*, 2014; Petrosky *et al.*, 2015). Alguns estudos realizados em vários países com o intuito de avaliar a capacidade da proteção da vacina contra a infecção, demonstraram que houve eficácia na proteção cruzada contra os HPVs 31, 33, 45 e 51 das vacinas bivalente e quadrivalente (Brown *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2012).

As recomendações da OMS para a vacinação inclui dois públicos-alvo: meninas de 9 a 14 anos, antes de iniciar a vida sexual, devem tomar duas doses da vacina, com intervalo mínimo de 6 meses entre as doses, não devendo ultrapassar de 12 a 15 meses; e meninas com idade igual ou superior a 15 anos, pessoas imunossuprimidas com ou sem infecção por HIV, devem seguir o protocolo de três doses com intervalo de 1 – 2 meses entre a primeira e a segunda dose e intervalo de 6 meses entre a segunda e a terceira dose (WHO, 2017).

No Brasil, o programa de vacinação seguia o modelo proposto pela OMS. Atualmente, além da inclusão de meninos de 11 a 14 anos de idade, houve também a alteração do esquema vacinal antigo de três doses (0, 2 e 6 meses) para um novo utilizando apenas duas doses (0 e 6 meses). Mulheres/homens e meninos/meninas HIV soropositivas com idade entre 9 e 26 anos seguem o protocolo das três doses (BRASIL, 2018c).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a detecção e genotipagem do HPV, através de metodologias baseadas em biologia molecular, em mulheres HIV soropositivas de Palhoça/SC.

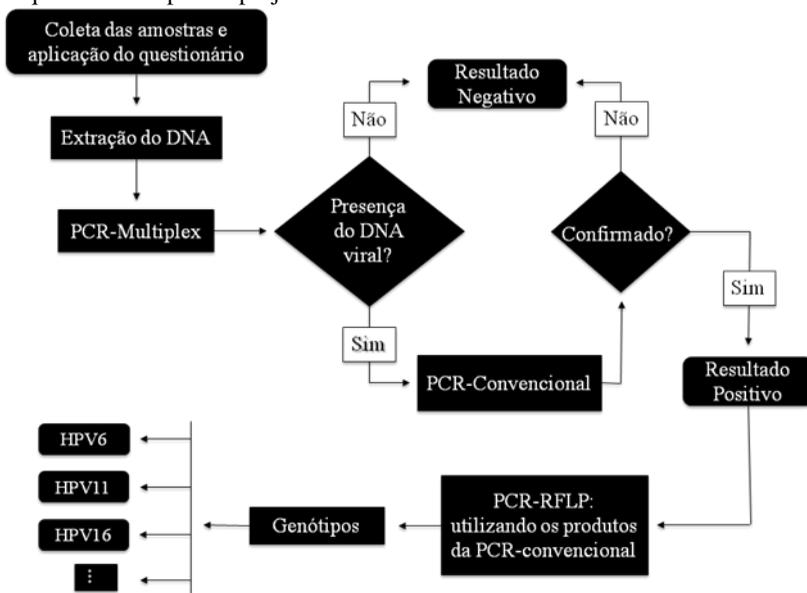
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os iniciadores PGMY 09/11 para a detecção do DNA do Papilomavírus Humano;
- Realizar a genotipagem do HPV empregando a técnica de genotipagem por polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) para a identificação dos genótipos presentes nas amostras clínicas;
- Verificar possíveis associações entre a presença do DNA do Papilomavírus Humano e as variáveis comportamentais e sócio-demográficas;
- Verificar a frequência dos genótipos de alto e baixo risco oncológico encontrados na população estudada.

4. METODOLOGIA

Com o intuito de guiar o leitor, o esquema a seguir mostra um breve resumo de todas as etapas realizadas durante o andamento do trabalho.

Esquema 1 - Etapas do projeto



4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Foi realizado um estudo do tipo transversal com coleta das amostras no período de abril a julho de 2016. Amostras cérvico-vaginais de 114 mulheres portadoras do vírus HIV foram coletadas no Centro Especializado em Aconselhamento e Prevenção da cidade de Palhoça/SC.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o 1.487.654/2016, com substituição de pesquisador (CAAE 49117315.1.0000.0121) (Anexo A). Todas as informações sócio-

demográficas e comportamentais obtidas nesse estudo foram concedidas pela Mestre Joice de Souza Pereira juntamente com as amostras de todas as pacientes avaliadas no presente trabalho. Todas as pacientes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) juntamente com um questionário contendo informação sobre características comportamentais e sócio-demográficas (Anexo B). Os dados são provenientes do trabalho de mestrado intitulado: Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras endocervicais de mulheres HIV soropositivas de Palhoça/SC.

Para a detecção do DNA viral, as amostras foram armazenadas e analisadas no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas por enfermeiras do próprio Centro Especializado em Aconselhamento e Prevenção por esfregaço utilizando *swab* na endocervice uterina e posteriormente imersos em meio de transporte universal UTMTM (COPAN), transportados ao LBMMS, sendo então armazenadas a -20°C para análise e, posteriormente, conservadas a -80 °C para a necessidade de análises futuras.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Em um primeiro momento essas amostras foram utilizadas para extração do DNA e análise de infecções por *Chlamydia trachomatis* em 2016 e armazenadas a -80° C. Posteriormente, em 2017, as amostras já extraídas foram reaproveitadas para análise do HPV e novas extrações foram realizadas a medida que se fez necessário.

4.3.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit ReliaPrep Blood gDNA Miniprep system (PROMEGA) seguindo o protocolo da fabricante e a quantificação para avaliação da qualidade da extração foi realizada em espectrofotômetro (NanoVue).

4.4 DETECÇÃO DO DNA VIRAL

4.4.1 Teste de Sensibilidade

A primeira etapa na padronização da PCR HPV Multiplex foi avaliar a sensibilidade da técnica. Foram realizadas diluições seriadas (na base 10), partindo de uma concentração inicial de 100 ng/μL de DNA do HPV seguidas de mais nove (9) pontos. As diluições foram feitas em duplicata, sendo uma diluição misturada com PBS e a outra misturada com uma amostra clínica sabidamente negativa para HPV. Em seguida, foi realizada extração para posterior análise.

4.4.2 PCR Multiplex para Detecção do HPV e Controle Interno de Qualidade

Para detecção do DNA viral foi realizada a técnica de PCR utilizando *primers* do tipo PGMY09 e PGMY11 que amplificam sequências presentes na região conservada L1 do HPV com tamanho molecular de 450 pares de bases (pb) (Gravitt *et al.*, 2000). *Primers* para o gene da β-globina humana (GH20 e PCO4) foram utilizados como controle de qualidade das amostras extraídas gerando um produto de 268 pb (Bauer *et al.*, 1991) e a utilização de um controle negativo contendo água ultrapura para descartar a possibilidade de contaminação dos reagentes da reação. Todos os iniciadores utilizados se encontram descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação dos iniciadores, seqüências, tamanho dos fragmentos e temperaturas de hibridização.

Alvo	Iniciadores	Seqüência	Temp. hibridização (°C)	Tamanho do Fragmento (pb)
HPV	PGMY11-A	5'- GCACAGGGACATAACAATGG - 3'	55	450
	PGMY11-B	5'- GCGCAGGGCCACAATAATGG - 3'		
	PGMY11-C	5'- GCACAGGGACATAATAATGG - 3'		
	PGMY11-D	5'- GCCCAGGGCCACAACAATGG - 3'		
	PGMY11-E	5'- GCTCAGGGTTTAAACAATGG - 3'		
	PGMY09-F	5'-CGTCCCAAAGGAAACTGATC - 3'		
	PGMY09-G	5'- CGACCTAAAGGAAACTGATC - 3'		
	PGMY09-H	5'- CGTCCCAAAGGAAACTGATC - 3'		
	PGMY09-I	5'- GCCAAGGGGAAACTGATC - 3'		
	PGMY09-J	5'- CGTCCCAAAGGATACTGATC - 3'		
	PGMY09-K	5'- CGTCCAAAGGGGATACTGATC - 3'		
	PGMY09-L	5'- CGACCTAAAGGGAATTGATC - 3'		
	PGMY09-M	5'- CGACCTAGTGGAAATTGATC - 3'		
	PGMY09-N	5'- CGACCAAGGGGATATTGATC - 3'		
	PGMY09-P	5'- GCCCAACGGAAACTGATC - 3'		
	PGMY09-Q	5'- CGACCCAAGGAAACTGGTC - 3'		
	PGMY09-R	5'- CGTCCTAAAGGAAACTGGTC - 3'		
HMB01	5'- GCGACCCAATGCAAAATGGT - 3'			
Beta-globina humana	PCO4 GH20	5'- CAACTTCATCCACGTTACC - 3' 5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'	55	268

Os *primers* PGMY 09 e PGMY 11 possuem a capacidade de amplificar eficientemente 37 genótipos diferentes sendo 21 deles caracterizados como de alto risco oncológico (incluindo os considerados com grande probabilidade de ser enquadrado na classificação de alto risco) e 14 considerados de baixo risco oncológico (Quadro 2) (Gravitt *et al.*, 2000).

Quadro 2 - Genótipos amplificados com eficiência pelos primers PGMY09 e PGMY11.

		Genótipos do HPV													
Alto risco	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	
	66	67	68	69	70	73	82	-	-	-	-	-	-	-	
Baixo risco	6	11	40	42	54	55	61	62	64	71	72	81	83	84	

Fonte: Dados copiados de Gravitt et al, 2000.

A reação de PCR multiplex com os iniciadores para o HPV e a β -globina humana foi realizada com um volume final de 25,0 μ L contendo: 0,04 μ M dos iniciadores PGMY09 / PGMY11; 0,2 mM dos iniciadores GH20 e PCO4; 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen™ life Technologies); 0,8X do tampão Green GoTaq Flexi Buffer (PROMEGA); 1 U de GoTaq HotStart Polymerase (PROMEGA) e 2,5 μ L de DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C/1 min. (desnaturação), 55°C/1 min. (pareamento), 72°C/1min. (extensão) em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 10 min.

O material amplificado pela PCR foi analisado por eletroforese utilizando gel de agarose na concentração de 1,5% incorporado com brometo de etídio para visualização do DNA através da incidência de luz ultra-violeta no equipamento ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho molecular foi determinado por comparação com o padrão de tamanho de DNA de 100pb (Ludwig).

4.4.3 PCR com Iniciadores PGMY09 e PGMY11 para Genotipagem

Para a reação de PCR para genotipagem foi realizada, em duplicata, uma PCR convencional com os iniciadores PGMY 09 e PGMY 11 com um volume final de 25,0 μ L, contendo: 0,03 μ M dos iniciadores PGMY09/11; 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen™ life Technologies); 0,8X do tampão Green GoTaq Flexi Buffer (PROMEGA); 1 U de GoTaq HotStart Polymerase (PROMEGA) e 5,0 μ L de DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C/1 min. (desnaturação), 55°C/1 min. (pareamento), 72°C/1min. (extensão) em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 10 min.

O material amplificado pela PCR foi analisado por eletroforese utilizando gel de agarose na concentração de 1,5% incorporado com brometo de etídio para visualização do DNA através da incidência de luz ultra-violeta no equipamento ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho molecular foi determinado por comparação com o padrão de tamanho de DNA de 100pb (Ludwig).

4.5 GENOTIPAGEM UTILIZANDO POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

As amostras positivas para o HPV foram submetidas à técnica de genotipagem através do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) baseado no trabalho de Nobre e colaboradores de 2008. Na digestão dos produtos amplificados foram então utilizadas quatro endonucleases de restrição: Pst I (Promega, USA), Hae III (Promega, USA), Dde I (Promega, USA) e Rsa I (Promega, USA), com posterior interpretação algorítmica através de padrões de digestão proposto pelo estudo referenciado. Foi utilizado uma alíquota de 7 μ L de cada amostra positiva amplificada e 0,5 U de cada enzima de restrição com o correspondente tampão (1X) e incubado por 1 hora a 37 °C. Os fragmentos foram fracionados por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida 12%, corados com brometo de etídio e visualizados através da incidência de luz ultra-violeta no equipamento ImagenQuant LAS500 (GE-EUA). Os tamanhos dos produtos foram estimados por comparação aos padrões de tamanho molecular 50pb (Ludwig, Brasil).

A genotipagem, utilizando o método por RFLP com as enzimas citadas anteriormente, tem a capacidade de identificar 49 genótipos diferentes do HPV, conhecidos principalmente por infectar o epitélio mucoso, incluindo 23 variantes e 2 subtipos (HPV 55 que é um subtipo do HPV44 e o HPV64 que é um subtipo do HPV34) (Nobre *et al.*, 2008) (Quadro 3).

Quadro 3 - Genótipos identificáveis pela metodologia de genotipagem por PCR-RFLP estratificados por risco oncológico.

Genótipos do HPV												
Alto risco	16	18*	26	30	31*	33	34	35	39	45*	51	52*
	53*	56	58*	59*	66*	67	68*	69	70*	73	82*	91
Baixo risco	6	11	13	32	40	42	43	44	54*	61		
	62	71	72	74*	81	83*	84	86	87	89		
Risco desconhecido	85		90			97		102			106	

* genótipos com um ou mais variantes.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa MedCalc® (versão 18.11.3) e analisado as associações entre o desfecho da presença do DNA viral do HPV e as variáveis sócio-demográficas através do teste qui-quadrado ou Exato de Fisher. As associações significativas foram avaliadas por Odds Ratio ou Razão de Chance (RC). Foram consideradas significativas as associações com intervalo de confiança (IC) de 95% que obtiveram $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SÓCIO-DEMOGRÁFICAS

De acordo com os dados coletados no questionário aplicado, das 114 participantes desse estudo, 89,5% possuíam mais de 30 anos e a média de idade foi de 43,3 anos (18 - 60 anos). A idade média de início da vida sexualmente ativa (IVSA) foi 16,5 anos de idade (10 - 23 anos) sendo que 42,1% iniciaram com menos de 15 anos. De todas as pacientes avaliadas, 14 (12,28%) não possuíam filhos (Quadro 4).

Quadro 4 - Características sócio-demográficas e clínicas das pacientes participantes do estudo.

Características		Total		HPV positivo (n = 37)		HPV negativo (n = 77)		P*
		n	%	n	%	n	%	
Idade	> 30 anos	12	10,5	4	10,8	8	10,4	1,000
	≤ 30 anos	102	89,5	33	89,2	69	89,6	
Idade IVSA**	< 18 anos	23	20,2	34	91,9	57	74,0	0,026
	≥ 18 anos	91	79,8	3	8,1	20	26,0	
Múltiplos Parceiros	Sim	2	1,8	1	2,7	1	1,3	0,546
	Não	112	98,2	36	97,3	76	98,7	
Terapia Anti-retroviral	Sim	110	96,5	35	94,6	75	97,4	0,594
	Não	4	3,5	2	5,4	2	2,6	
Exame preventivo anterior	Sim	91	79,8	8	21,6	62	80,5	0,790
	Não	23	20,2	29	78,4	15	19,5	
Histórico de ISTs***	Sim	53	46,5	17	45,9	36	46,8	0,936
	Não	61	53,5	20	54,1	41	53,2	
Uso de contraceptivo oral	Sim	7	6,1	2	5,4	5	6,5	1,000
	Não	107	93,9	35	94,6	72	93,5	
Uso de preservativo	Sim	59	51,8	21	56,8	38	49,4	0,459
	Não	55	48,2	16	43,2	39	50,6	
Tabagista	Sim	28	24,6	9	24,3	19	24,7	0,967
	Não	86	75,4	28	75,7	58	75,3	
Consumo de bebidas alcoólicas	Sim	47	41,2	18	48,6	29	37,7	0,265
	Não	67	58,8	19	51,4	48	62,3	
Consumo de outras substâncias psicoativas	Sim	10	8,8	6	16,2	4	5,2	0,750
	Não	104	91,2	31	83,8	73	94,8	

*P < 0,05 significativo; **Início da vida sexualmente ativa; ***Infecções sexualmente transmissíveis.

No momento da coleta foi questionado às mulheres sobre ter conhecimento de infecção por HPV. Relacionado à isso, cerca de 15% das mulheres disseram ter HPV e 7% alegaram ter algum tipo de lesão intraepitelial. A maioria não soube informar se tinha HPV, porém, não apresentaram nenhuma alteração nos exames preventivos realizados até o momento da coleta. Cerca de 20% delas apresentaram verrugas genitais (Quadro 4).

Mulheres HIV soropositivas, normalmente, possuem um risco maior de co-infecções e nesse estudo cerca de 46,5% das pacientes tinham ou já tiveram alguma infecção no trato genital (candida, vaginose bacteriana e/ou sífilis). Nenhuma foi observado quanto a positividade para o HPV. A informação sobre a infecção causada por *Chlamydia trachomatis*, cedida pela pesquisadora Joice de Souza Pereira, mostrou que apenas 2% das mulheres estavam infectadas com o patógeno, o que também não apresentou associação.

No uso de substâncias nocivas, o tabagismo estava presente em 24,6% das pacientes e destas 24,3% das fumantes apresentaram infecção pelo HPV. O consumo de bebidas alcoólicas foi afirmado por 41,2 % das mulheres sendo que das mulheres que apresentaram a infecção pelo HPV 48,6% faziam uso de bebida alcoólica. (Quadro 4).

Ao análisas as variáveis, nenhuma delas tiveram qualquer associação com a positividade para o HPV, exceto a idade de início da vida sexual que apresentou uma associação estatisticamente significativa ($p = 0,026$). Os dados mostraram que as pacientes que iniciam a vida sexual com menos de 18 anos têm 3,98 vezes mais chances de se infectar com o HPV do que as mulheres que iniciaram com mais de 18 anos (OR= 3,976; IC= 95%, 1,0994-14,384, $p = 0,035$).

Quadro 5 - Razão de Chance e intervalo de confiança de 95% da associação entre a idade de início da vida sexualmente ativa (IVSA) e a positividade para DNA do HPV.

Idade IVSA	HPV positivo	HPV negativo	RC (intervalo de confiança 95%)	p^*
< 18 anos	34	57	3,9766 (1,0994-14,384)	0,035
≥ 18 anos	3	20		

* valor de p significativo < 0,05.

5.2 PCR MULTIPLEX

Ao teste inicial de sensibilidade, a metodologia foi capaz de detectar o DNA do HPV em uma concentração mínima de 10^{-7} ng/ μ L (10^{-4} pg/ μ L) nas diluições realizadas com PBS e na amostra clínica negativa como demonstrados na Figura 3 e Figura 4, respectivamente.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação nas diferentes concentrações das diluições seriadas em PBS. * PM – Peso Molecular 100 pb; P1 ao P10 – pontos da diluição seriada; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo.

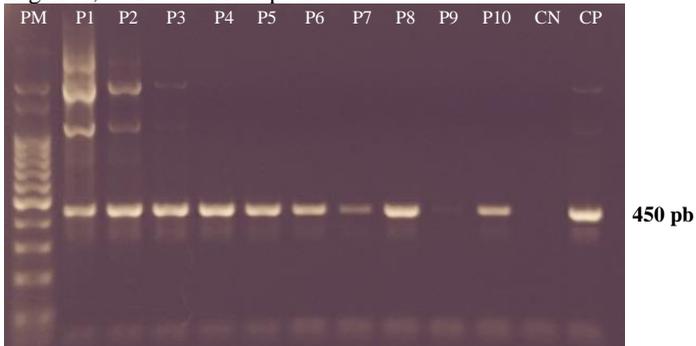
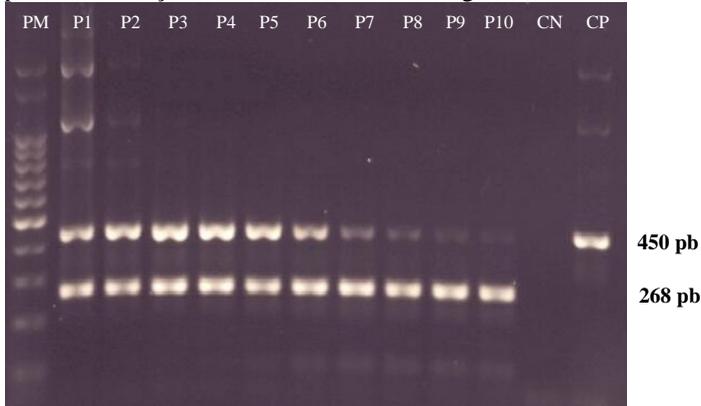
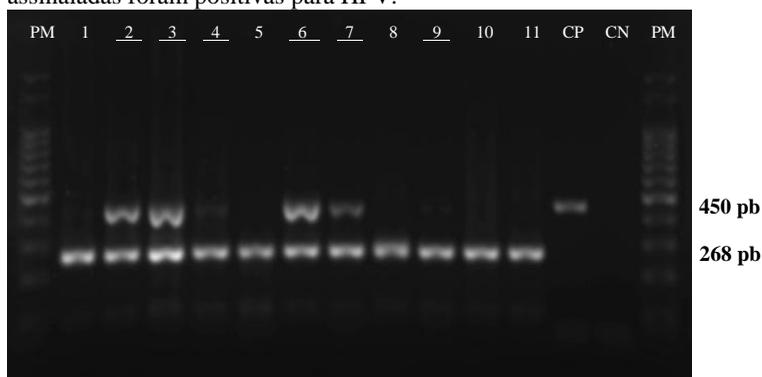


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação nas diferentes concentrações das diluições seriadas em amostra humana sabidamente negativa para HPV.* PM – Peso Molecular 100 pb; P1 ao P10 – pontos da diluição seriada; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo.



Das 114 amostras clínicas submetidas à PCR multiplex, 37 (32,5%) apresentaram amplificação do fragmento de DNA correspondente ao HPV sendo que todas as amostras apresentaram amplificação para o gene da β -globina humana. As amostras consideradas positivas para o HPV apresentaram produtos de PCR de 450 pb e de 268 pb para β -globina, como exemplificado na figura 3.

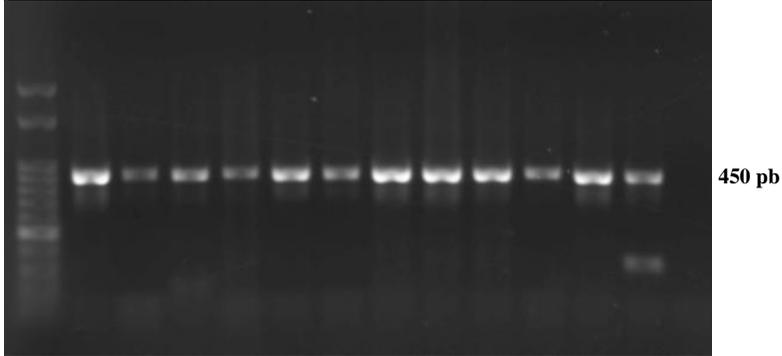
Figura 5 - Eletroforese em agarose 1,5 % mostrando a amplificação pela PCR multiplex para detecção de HPV e beta-globina em amostras clínicas.*PM – Peso molecular 100 pb; Canaletas do 1 ao 11 – Amostras clínicas; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo. As canaletas 2, 3, 4, 6, 7 e 9 assinaladas foram positivas para HPV.



5.3 PCR COM INICIADORES PGMY09 E PGMY11 PARA GENOTIPAGEM

Todos os produtos de PCR das 37 amostras confirmaram a presença do HPV com a amplificação do produto de 450 pb para o segmento da etapa de genotipagem, como observado no exemplo da figura 4.

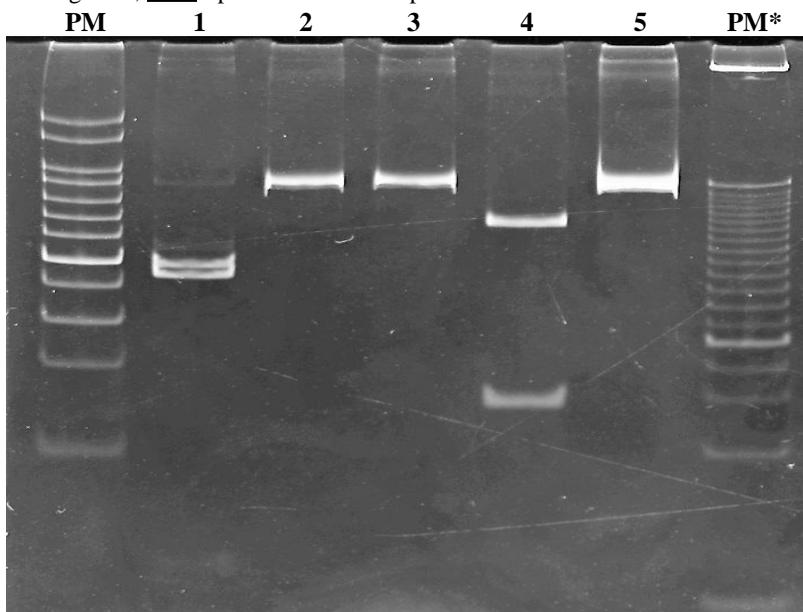
Figura 6 - Eletroforese em agarose 1,5 % mostrando a amplificação pela PCR convencional para confirmação e utilização na etapa de genotipagem do HPV em amostras clínicas. *PM – Peso molecular 50 pb; Canaletas do 1 ao 11 – Amostras clínicas positivas para HPV; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo.



5.4 GENOTIPAGEM UTILIZANDO POLIMORFISMO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Das 37 amostras positivas para HPV, 33 (89,2%) amostras foram submetidas à técnica de genotipagem por RFLP e as outras 4 (10,8%) amostras não tiveram material biológico suficiente para a realização do teste. Das amostras genotipadas pelo RFLP, 7 (21,2%) apresentaram um padrão inconclusivo para definir o genótipo viral. A figura 5 representa a identificação do genótipo 16 em uma das amostras clínicas.

Figura 7 - Genotipagem de amostra clínica por PCR-RFLP do HPV16 em gel poliacrilamida 12%. **PM** – peso molecular 50 pb; **Canaleta 1** – fragmentação com a enzima Pst I (210/216 pb); **Canaleta 2** – fragmentação com a enzima Hae III (450 pb); **Canaleta 3** -fragmentação com a enzima Ddel (450 pb); **Canaleta 4** – fragmentação com a enzima Rsa I (310/70 pb); **Canaleta 5** – Produto de PCR não digerido; **PM*** - peso molecular 25 pb.



Pela metodologia utilizada, foram identificados ao total 22 genótipos diferentes de HPV: 11 genótipos classificados como de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 45, 51, 52, 53, 58, 59, 66 e 69), 10 genótipos classificados como de baixo risco (06, 32, 44, 61, 62, 81, 83, 84, 87 e 89) e 1 genótipos de risco desconhecido (106). Foi identificado um genótipo como HPV55 é descrito como um subtipo do HPV44 que está classificado como um genótipo de baixo risco oncológico.

Nas amostras analisadas houve um predomínio dos genótipos de alto risco, representando 43,2% em comparação com os de baixo risco que tiveram uma frequência de 29,7%. O HPV 16 e o HPV 53 foram os mais frequentes sendo que cada um foi identificado em 11,8% das pacientes seguido dos HPV45 , HPV44, HPV06, HPV61, HPV62, e

HPV83 que apresentaram uma frequência de 5,9% e os demais genótipos totalizaram 35,2%.

A mesma metodologia identificou a presença de 7 co-infecções (18,9%): 4 delas com genótipos de alto risco / baixo risco (57,1%), 2 com genótipos de alto risco / alto risco (28,6%), e 1 com genótipos de baixo risco / risco desconhecido (14,3%). Das co-infecções observadas todas apresentaram pelo menos um genótipo de alto risco (Quadro 6).

Quadro 6 - -infecções e a relação dos genótipos identificados.

Co-infecções	Genótipos		
	Alto risco / Alto risco	Alto risco / Baixo risco	Baixo risco / Risco desconhecido
	HPV45 / HPV66	HPV59 / HPV81	HPV44 / HPV 106
	HPV52 / HPV53	HPV58 / HPV83	-
	-	HPV69 / HPV61	-
	-	HPV53 / HPV87	-

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que mulheres HIV soropositivas de forma geral possuem uma maior prevalência, persistência e presença de múltiplas infecções pelo HPV quando comparadas com mulheres HIV soronegativas. Isso observa-se também para os casos de prevalências dos genótipos alto risco no qual são maiores em mulheres HIV soropositivas (Adebamowo *et al.*, 2017).

A partir dos resultados obtidos neste estudo podemos observar que houve uma frequência relativamente alta de positividade para o HPV (32,5%). Esses dados estão abaixo do observado em outros estudos que mostram uma alta variação da taxa de infecção pelo HPV em mulheres HIV soropositivas, variando de 48 a 73,5 %, de acordo com o método de identificação utilizado, uso de diferentes conjuntos de *primers* para HPV, a posição geográfica e o tipo da população estudada (Araújo *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2017; Badial *et al.*, 2018).

A prevalência do HPV pode variar dependendo da região estudada. Mulheres vivendo com HIV, que possuem achados citológicos normais e estão infectadas com o HPV variam de 25% a 34% na Ásia, Europa e América do Norte, enquanto que na África e América latina essa variação é de 57% a 64%. Essas diferenças tendem a diminuir com o aumento da gravidade das lesões intra-epiteliais (Clifford *et al.*, 2017).

Em Santa Catarina dados preliminares foram emitidos recentemente sobre a prevalência do HPV na cidade de Florianópolis em jovens (homens e mulheres) com idade entre 16 e 25 anos com vida sexual ativa. Foi observado até o momento que a prevalência na população em geral foi de 44%. Os genótipos de alto risco estão presente em 32% dos jovens e 26,4% apresentaram múltiplas infecções (BRASIL, 2017).

Em 2015, Freitas e colaboradores realizaram um levantamento de estudos publicados entre 2010 e 2014 relacionados à prevalência do HPV e dos genótipos nas regiões sul e sudeste do país. Eles observaram que em mulheres HIV soropositivas da região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) houve uma variação de 46,6 a 76,3% para positividade do HPV. Nesse mesmo levantamento, foi observado que o HPV 16 foi o genótipo mais frequente na maioria dos estudos, com exceção de um desses estudos realizado em Maringá-PR, que ao avaliar

178 mulheres HIV soropositivas em uso de tratamento antiretroviral observou que o HPV 72 (baixo risco) foi o mais frequente seguido do HPV 16, HPV 31 e HPV 51 (Freitas *et al.*, 2015; Rocha-Brischiliari *et al.*, 2014).

Apesar da frequência relativamente baixa de positividade para o HPV, no presente estudo pôde-se observar uma alta frequência dos genótipos de alto risco (43,2%), sendo que destes o HPV 16 (11,8%) e HPV 53 (11,8%) foram os mais frequentes seguido do HPV 45 (5,9%). Esses dados mostram uma frequência maior do que o observado em estudos com pacientes portadoras do HIV de outras regiões do Brasil como em Salvador/BA que apresentou uma prevalência de genótipos de alto risco de 33,3 % e o HPV16 (5,1%) e HPV 18 (3,9%) sendo os mais prevalentes nesses pacientes (Travassos *et al.*, 2017). Na cidade de Manaus/AM a prevalência dos genótipos de alto risco em paciente HIV soropositivas foi de 31,1% com uma prevalência de co-infecções (43%) e em São Paulo houve uma prevalência maior, de 57,5%, sendo o HPV 56 mais frequente, seguido do HPV 16 (Badial *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2018).

Um levantamento feito por Miranda e colaboradores (2017) em mulheres portadoras do vírus HIV, encontrou uma prevalência geral dos genótipos de alto risco no país de 28,4%, sendo estratificado por região no qual observou-se uma prevalência de 28,6% no Norte, 25,9% no Nordeste, 33,7% no Meio-Oeste, 24,5% no Sudeste e de 35,3% no Sul (Miranda *et al.*, 2017).

O HPV 16 ainda é o genótipo mais prevalente encontrado em mulheres HIV soropositivas. Estudos mostram um constante aumento da positividade para o HPV 16 através do aumento da gravidade das lesões pré-cancerosas em relação aos outros genótipos de alto risco. Sendo assim o HPV 16 confere um risco preferencial de desenvolver câncer do colo do útero em mulheres HIV soropositivas, assim como o já observado em mulheres HIV soronegativas (Bulk *et al.*, 2006; Clifford *et al.*, 2017; Kremer *et al.*, 2018).

Além do HPV 16, o HPV 18 também é um dos genótipos mais prevalentes encontrados, principalmente em pacientes com câncer do colo do útero. Além desses, outros genótipos de alto risco menos comuns têm se mostrado mais ou tão frequentes quanto os HPV 16 e HPV 18 em pacientes com HIV (Clifford *et al.*, 2017).

Neste trabalho foi observado que, além do HPV 16, os genótipos de alto risco HPV 53 e HPV 45 foram os mais frequentes nas pacientes. Um estudo de meta-análise coletou dados da África, Europa, América do Norte, Ásia e América Latina considerou o HPV 45 como mais

carcinogênico depois do HPV 16 no continente africano. enquanto que na Europa e América do Norte o HPV 33 foi mais comum nas pacientes com câncer já estabelecido (Clifford *et al.*, 2017). Em mulheres não infectadas com o HIV, na Ásia, Europa e na América do Norte o HPV 31, 33, 35 e 58 já foram reportados por conferir maior risco para lesões de alto grau (NIC 3) do que os outros genótipos não-HPV 16 (Kjær *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Schiffman *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a identificação para o HPV 16 e o 18 estão cada vez mais relacionados com o avanço da gravidade das lesões pré-cancerosas confirmando a alta prevalência do HPV 16 em todo o mundo. Apesar do HPV 16 não ter uma relação direta entre a imunodeficiência ocasionada pelo HIV e lesões de alto grau, ele continua sendo prioridade para pacientes vivendo com HIV mesmo conhecendo a relação entre os carcinomas cervicais com infecções ocasionadas por outros genótipos (Clifford *et al.*, 2017).

Outro ponto que justificaria a diferença entre as prevalências, principalmente relacionadas a positividade de DNA do HPV, seria a idade das pacientes. Apesar de serem mulheres HIV soropositivas, o que seria um atenuante para uma alta prevalência do HPV, neste estudo a idade média foi de 43,3 anos (18-60 anos) no qual é considerado uma faixa etária de baixo risco para novas infecções, porém com maiores chances de desenvolver persistência (Gravitt e Winer, 2017; Miranda *et al.*, 2017).

As pacientes avaliadas nesse estudo não apresentaram associação entre a positividade de HPV e a idade das pacientes. Porém, alguns estudos relacionam a idade com a prevalência da infecção pelo HPV e percebe-se um aumento da prevalência do HPV em mulheres mais jovens, como por exemplo o observado por Mercado Gutiérrez que avaliou a influência da idade na prevalência do HPV e encontrou uma alta prevalência dos genótipos de alto risco (59,7%) onde a maior parte delas eram mulheres menor de 35 anos (64,6%) (Mercado Gutiérrez *et al.*, 2017).

Atualmente, o guia emitido pela Sociedade Americana de Câncer orienta sobre a idade e situação para cada caso de rastreio do HPV nas mulheres em risco médio, ou seja, que não têm histórico de câncer cervical, nem algum tipo de imunossupressão. A orientação é que não se faça nenhum tipo de rastreio em mulheres com menos de 21 anos (independente da idade de início da vida sexual) e ainda orienta que as mulheres não devem ser rastreadas anualmente por qualquer método de rastreio. Em resumo, as mulheres devem ser rastreadas a partir dos 21 anos apenas com a citologia e em períodos de 3 em 3 anos, para

mulheres entre 30 e 65 anos a abordagem é preferencialmente a cada 5 anos com citologia e teste do HPV ou manter a citologia a cada 3 anos (Smith *et al.*, 2017).

Sabe-se que mulheres com mais de 35 anos mantêm uma prevalência relativamente baixa de infecção, quando comparada com mulheres mais jovens, porém é comum observar uma maior persistência das infecções nessa faixa etária, o que implicaria em um risco aumentado de desenvolver lesões pré cancerosas. Isso motivou a incorporação de testes para HPV como recomendações de triagem principalmente em mulheres com idades acima de 30 anos (Rijkaart *et al.*, 2012). A maior prevalência das lesões neoplásicas são em mulheres jovens quando comparadas com as mais velhas, ainda assim uma parcela significativa das lesões regredirá espontaneamente, principalmente nas mulheres mais jovens (Smith *et al.*, 2017).

A idade de início da vida sexual das mulheres nesse estudo teve uma associação significativa com a positividade para HPV. As mulheres que iniciaram a vida sexual com menos de 18 anos de idade apresentaram chance 3,97 vezes maior (95% CI, 1,0994-14,384, $p = 0,035$) de adquirir infecção pelo HPV quando comparada com mulheres que tiveram o início após os 18 anos. Esse resultado está de acordo com o observado em vários estudos, no qual quanto mais cedo o início da vida sexual maiores as chances de se contrair o HPV. Entende-se que quanto mais jovens são as mulheres, maiores são os números de parceiros sexuais e acredita-se que o sistema imune em mulheres mais velhas seja mais eficiente em relação as mais jovens (Gravitt e Winer, 2017)

Alguns fatores podem influenciar a aquisição de novas infecções pelo HPV. Um estudo realizado na região de Tapajós no Amazonas em avaliou a aceitabilidade da auto-coleta cervico-vaginal, a prevalência do HPV e a associação à fatores de risco em mulheres HIV soropositivas e soronegativas, no qual observou que o uso de álcool aumentou em 2,49 vezes a chance de se ter infecção pelo HPV e estar infectado com o HIV aumentou esse risco para 6,17 vezes (Rodrigues *et al.*, 2018).

Em relação ao desenvolvimento de câncer do colo do útero, o HPV confere um risco maior quando associado a outros fatores de risco. Outras infecções sexualmente transmissíveis podem favorecer tanto a entrada do HPV nas células quanto a persistência da infecção e desenvolvimento de lesões pré cancerosas e nesse cenário o HIV tem um papel importante podendo reduzir o tempo para o desenvolvimento do câncer propriamente dito (Guidry e Scott, 2017); WHO, 2018). As pacientes avaliadas no presente estudo, apesar de 46,5 % apresentarem

algum histórico de outras infecções sexualmente transmissíveis, não apresentaram nenhuma associação estatisticamente significativa sobre essa variável e a positividade para o HPV, porém, também não foi avaliado no momento do estudo se haviam outras infecções presentes.

O tropismo do HIV pelas principais células de defesa do organismo, incluindo monócitos, células dendríticas e como alvo primário os linfócitos T CD4+, acaba levando a uma deficiência ao sistema imune, importante na defesa contra o HPV, o que influencia diretamente na patogênese do HPV (Guidry e Scott, 2017). Em todo o mundo as mulheres HIV soropositivas têm apresentado um incidência maior de câncer do colo do útero. Outros mecanismos, além da depleção dos linfócitos CD4+, estão envolvidos no sinergismo entre o HIV e o HPV como o que favorece a entrada do HPV. As citocinas inflamatórias produzidas pelas células expostas as glicoproteínas do HIV diminuem a junção entre as células e por consequência diminui a barreira epitelial aumentando assim a suscetibilidade das células basais ao HPV (Guidry e Scott, 2017).

O uso de anti-retrovirais pode estar relacionado com uma baixa prevalência de infecções por genótipos de alto risco oncológico em mulheres HIV soropositivas inclusive com uma baixa incidência de diagnósticos histológicos de HSIL/NIC2 e câncer cervical invasivo (Kelly *et al.*, 2018). Em contra partida, no presente estudo, apesar de uma frequência de positividade para DNA do HPV abaixo do observado na maioria dos estudos, a frequência dos genótipos de alto risco foi alta sendo que praticamente todas as pacientes faziam uso de terapia anti-retroviral (96,5%).

Outros fatores que estão associados com o desenvolvimento de câncer do colo do útero são o uso de tabaco, contraceptivos orais, número de gestações, o número de parceiros sexuais e infecções sexualmente transmissíveis (Moreno *et al.*, 2002; Berraho *et al.*, 2017; Chagas *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018). Apesar do presente estudo não ter avaliado as lesões pré cancerosas que poderiam estar presente nas pacientes no momento do estudo, 16,7 % das mulheres relataram histórico de algum tipo de lesão no colo do útero. Não houve relação significativa entre o histórico de lesões e a positividade para o HPV ou os genótipos de alto risco. Seria necessário a realização de testes como o de Papanicolaou ou testes histológicos para avaliar a possibilidade de associação real entre o HPV e possíveis lesões pré-cancerosas.

Existem algumas limitações no desenho do presente estudo. Por se tratar de uma população mais restrita, o número de amostras dependia das mulheres irem ao Centro Especializado em Aconselhamento e

Prevenção da cidade de Palhoça/SC para exame preventivo e que apesar do pouco tempo em que ocorreram as coletas conseguiu-se uma quantidade amostral relativamente boa. Sabe-se que quanto maior a amostragem mais precisos e robustos são os resultados, porém, ainda assim os dados obtidos nesse estudo estiveram de acordo com o observado na literatura atual. Outro fator relevante foi a reutilização das amostras, pois em cada nova extração as amostras eram submetidas a descongelamentos e congelamentos, isso poderia diminuir a qualidade através de possíveis degradações do DNA ali presente. Apesar da PCR possuir uma alta sensibilidade a metodologia utilizada possuía algumas limitações de sensibilidade e especificidade principalmente por se tratar de um método "in house" quando comparada com outros métodos moleculares comerciais. A utilização de *primers consensu* PGMY09 e PGMY11 possuem uma sensibilidade melhor do que seu antecessor MY09/MY11 (Gravitt *et al.*, 2000; Koliopoulos *et al.*, 2017).

Atualmente a detecção por metodologias moleculares está sendo cada vez mais utilizada para a detecção viral e genotipagem do HPV em amostras de tecidos e células esfoliativas (Koliopoulos *et al.*, 2017). A PCR-RFLP, utilizada neste trabalho, apesar de possuir uma sensibilidade relativamente menor quando comparado com outras metodologias de genotipagem, como *microarray*, é um método que pode ser utilizado como teste primário para identificação de genótipos de alto e baixo risco oncológico principalmente em países que possuem baixa renda (Golfetto *et al.*, 2018).

Quando se compara com o método de sequenciamento, a identificação de infecções com um único genótipo do HPV por PCR-RFLP tem concordância na identificação dos genótipos, principalmente os de alto risco oncológico. Para múltiplas infecções pelo HPV, o PCR-RFLP possui uma sensibilidade mais reduzida comparada com a metodologia de *microarray* (PapilloCheck®), no qual se observa a detecção de múltiplas infecções em apenas 25% das amostras por RFLP enquanto que pelo PapilloCheck® 62,5% (Golfetto *et al.*, 2018).

Quando se tem infecções múltiplas, as amostras com 3 ou mais genótipos formam um padrão complicado para identificação de qualquer genótipo pelo algoritmo utilizado nesse estudo, tornando o resultado inconclusivo. Por conta disso algumas amostras neste estudo não foram possíveis de afirmar qual o genótipo estava presente, pois apresentaram padrões de fragmentos impossíveis de identificar. Nesse ponto a utilização de testes completos mais precisos e sensíveis como, por exemplo, o sequenciamento, se faz necessário para identificação dessas amostras.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

De acordo com o dados observados no presente estudo pôde-se observar que a frequência de mulheres HIV soropositivas infectadas com o HPV é alta, ainda que menor quando comparado com estudos de prevalência. Nesse mesmo contexto as mulheres estudadas apresentaram uma frequência alta dos genótipos de alto risco oncológico (43,2%), com o HPV 16 e HPV 53 os mais frequentes, corroborando com o observado em outros estudos. Diante disso, é possível notar o quanto mulheres HIV soropositivas estão susceptíveis a infecções por HPV, principalmente por genótipos de alto risco oncológico, incluindo genótipos não tão frequentes na população em geral.

O método foi capaz de detectar e identificar praticamente todas as amostras com exceção de 11 delas, sendo que em 7 não foi possível identificar o genótipo pela complexidade do padrão resultante e 4 acabaram por não ter material biológico suficiente. Em um primeiro momento o PCR-RFLP foi suficiente para identificar e quantificar os genótipos do HPV, porém testes complementares são necessários para a identificação das amostras dadas como inconclusivas.

Apesar das poucas associações estatisticamente significativas, pôde-se observar que as mulheres que iniciaram a vida sexual muito cedo estão mais propensas à infecção pelo HPV e diante de todo o contexto em que estas mulheres vivem (idade e portadoras do HIV) isso acaba sendo um agravante para a persistência do HPV no organismo e o desenvolvimento de lesões neoplásicas.

Devido a frequência de genótipos de alto risco em mulheres HIV soropositivas, no qual pode facilitar o prognóstico do câncer do colo do útero, deve-se considerar este tipo de população em termos de controle de vacinação e acompanhamento para triagem, a fim de reduzir os riscos para o desenvolvimento de câncer nessas mulheres.

Para as amostras consideradas inconclusivas por apresentarem um padrão de difícil identificação sugere-se que seja associada uma outra metodologia como por exemplo por hibridização com o objetivo que obter o número máximo possível de amostras com resultados precisos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAMOWO, S. N. et al. Persistent Low-Risk and High-Risk Human Papillomavirus Infections of the Uterine Cervix in HIV-Negative and HIV-Positive Women. **Front Public Health**, v. 5, p. 178, 2017. ISSN 2296-2565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785554> >.

APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT, T. C. The 2001 Bethesda System terminology. **Am Fam Physician**, v. 68, n. 10, p. 1992-8, Nov 2003. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14655809> >.

ARAÚJO, A. C. et al. Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV-infected women. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 117, n. 3, p. 211-6, Jun 2012. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445392> >.

BADIAL, R. M. et al. Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) in HIV-infected women and its relationship with HPV/HIV co-infection. **Medicine (Baltimore)**, v. 97, n. 14, p. e9545, Apr 2018. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29620669> >.

BAUER, H. M. et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, v. 265, n. 4, p. 472-7, 1991 Jan 23-30 1991. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845912> >.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 2010. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206957> >.

BERRAHO, M. et al. HPV and cofactors for invasive cervical cancer in Morocco: a multicentre case-control study. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 435, Jun 2017. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28633667> >.

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 4, p. 321-2, Apr 2009. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350698> >.

BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS. **Informações de Saúde (TABNET), Sistema de informações sobre mortalidade.** Disponível em:<<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10> >. Acesso em 26 de março de 2018a.

_____. Ministério da Saúde. INCA. **Diretrizes Brasileiras para o rastreamento do Câncer do Colo do Útero.** Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf >. Acesso em 03 de maio de 2018.

_____. Ministério da Saúde. INCA. **Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp> >. Acesso em 16 de abril de 2018b.

_____. Ministério da Saúde. **Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil): Resultados preliminares - Associação Hospitalar Moinhos de Vento - Porto Alegre.** Novembro, 2017. Disponível em: < <https://www.sboc.org.br/images/downloads/LIVRO-POP.pdf> >. Acesso em 17 de Fevereiro de 2019.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Informe técnico da ampliação da oferta das vacinas papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) – vacina HPV quadrivalente e meningocócica C (conjugada).** Brasília, 2018. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/14/Informe-Tecnico-HPV-MENINGITE.pdf> >. Acesso em 11 de maio de 2018c.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593> >.

BROWN, D. R. et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16-26 years. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 926-35, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236279> >.

BULK, S. et al. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. **Br J Cancer**, v. 94, n. 1, p. 171-5, Jan 2006. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16404371> >.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1-17, Jan 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525422> >.

CANCER, I. C. O. H. A. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 22, p. 1823-30, Nov 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078759> >.

CARTER, J. J. et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **J Infect Dis**, v. 181, n. 6, p. 1911-9, Jun 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837170> >.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 110, n. 3 Suppl 2, p. S4-7, Sep 2008. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760711> >.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental cofactors in HPV carcinogenesis. **Virus Res**, v. 89, n. 2, p. 191-9, Nov 2002. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445659> >.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 20-8, 2003. ISSN 1052-6773. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807941> >.

CDC - Centers for Disease Control. **Risk for cervical disease in HIV-infected women—New York City. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.** 39 (47), 846–849, 1990. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001844.htm>>. Acesso em 03 de maio de 2018.

CHAGAS, B. S. et al. Synergic effect of oral contraceptives, GSTP1 polymorphisms, and high-risk HPV infection in development of cervical lesions. **Genet Mol Res**, v. 16, n. 3, Aug 2017. ISSN 1676-5680. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28829907>>.

CHEN, H. C. et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection and increased long-term risk of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n. 18, p. 1387-96, Sep 2011. ISSN 1460-2105. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900119>>.

CHOO, K. B. et al. Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. **J Med Virol**, v. 21, n. 2, p. 101-7, Feb 1987. ISSN 0146-6615. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029316>>.

CLIFFORD, G. M.; TULLY, S.; FRANCESCHI, S. Carcinogenicity of Human Papillomavirus (HPV) Types in HIV-Positive Women: A Meta-Analysis From HPV Infection to Cervical Cancer. **Clin Infect Dis**, v. 64, n. 9, p. 1228-1235, 05 2017. ISSN 1537-6591. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199532>>.

COLLINS, S. I. et al. Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study. **Int J Cancer**, v. 114, n. 3, p. 498-500, Apr 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551326>>.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 47, p. 2-13, Feb 2018. ISSN 1532-1932. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28964706>>.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 2004. ISSN 0042-6822. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>>.

DIAMANTIS, A.; MAGIORKINIS, E.; KOUTSELINI, H. 50 years after the death of George Nicholas Papanicolaou (1883-1962): evaluation of his

scientific work. **Acta Med Hist Adriat**, v. 12, n. 1, p. 181-8, 2014. ISSN 1334-4366. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310617> >.

FREITAS, B. C. et al. HPV Infection and Cervical Abnormalities in HIV Positive Women in Different Regions of Brazil, a Middle-Income Country. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 18, p. 8085-91, 2015. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26745043> >.

FU, T. C. et al. Re-detection vs. new acquisition of high-risk human papillomavirus in mid-adult women. **Int J Cancer**, v. 139, n. 10, p. 2201-12, 11 2016. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448488> >.

GHEBRE, R. G. et al. Cervical cancer control in HIV-infected women: Past, present and future. **Gynecol Oncol Rep**, v. 21, p. 101-108, Aug 2017. ISSN 2352-5789. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28819634> >.

GOLFETTO, L. et al. PCR-RFLP assay as an option for primary HPV test. **Braz J Med Biol Res**, v. 51, n. 5, p. e7098, Mar 2018. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29590262> >.

GOODMAN, M. T. et al. Hawaii cohort study of serum micronutrient concentrations and clearance of incident oncogenic human papillomavirus infection of the cervix. **Cancer Res**, v. 67, n. 12, p. 5987-96, Jun 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553901> >.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 357-61, Jan 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618116> >.

GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. **Viruses**, v. 9, n. 10, 09 2017. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28934151> >.

GUIDRY, J. T.; SCOTT, R. S. The interaction between human papillomavirus and other viruses. **Virus Res**, v. 231, p. 139-147, 03 2017.

ISSN 1872-7492. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826043> >.

HARDEN, M. E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 772, p. 3-12, 2017 Apr - Jun 2017. ISSN 1388-2139. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528688> >.

HERBERT, A. et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for cervical cytology terminology. **Cytopathology**, v. 18, n. 4, p. 213-9, Aug 2007. ISSN 0956-5507. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635161> >.

JENKINS, D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. **Dis Markers**, v. 23, n. 4, p. 199-212, 2007. ISSN 0278-0240. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627056> >.

HPV Center. **International Human Papillomavirus Reference Center**. Karolinska Institute. Disponível em: <
http://www.nordicehealth.se/hpvcenter/reference_clones/ >. Acesso em 01 de maio de 2018.

KELLY, H. et al. Association of antiretroviral therapy with high-risk human papillomavirus, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive cervical cancer in women living with HIV: a systematic review and meta-analysis. **Lancet HIV**, v. 5, n. 1, p. e45-e58, 01 2018. ISSN 2352-3018. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29107561> >.

KJÆR, S. K. et al. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 19, p. 1478-88, Oct 2010. ISSN 1460-2105. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20841605> >.

KOLIPOULOS, G. et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 8, p. CD008587, 08 2017. ISSN 1469-493X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796882> >.

KRAWCZYK, E. et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. **Am J Pathol**, v. 173, n. 3, p. 682-8, Sep 2008. ISSN 1525-2191. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688031> >.

KREMER, W. W. et al. HPV16-Related Cervical Cancers and Precancers Have Increased Levels of Host Cell DNA Methylation in Women Living with HIV. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Oct 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30360578> >.

LIU, S. H. et al. Characterizing the temporal dynamics of human papillomavirus DNA detectability using short-interval sampling. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 1, p. 200-8, Jan 2014. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130223> >.

MAIMAN, M. et al. Human immunodeficiency virus infection and cervical neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 38, n. 3, p. 377-82, Sep 1990. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2227552> >.

MARKOWITZ, L. E. et al. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**, v. 63, n. RR-05, p. 1-30, Aug 2014. ISSN 1545-8601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25167164> >.

MARTINS, T. R. et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Virol J**, v. 13, p. 138, 08 2016. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515763> >.

MERCADO GUTIÉRREZ, M. R. et al. [Influence of Age in the Prevalence of High-Risk Human Papiloma Virus in Women with Pre-Neoplastic Cervical Lesions in Navarra, Spain]. **Rev Esp Salud Publica**, v. 91, 02 2017. ISSN 2173-9110. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28181989> >.

MIRANDA, A. E. et al. High-risk papillomavirus infection among women living with human Immunodeficiency virus: Brazilian multicentric study. **J Med Virol**, v. 89, n. 12, p. 2217-2223, 12 2017. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28771777> >.

MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1085-92, Mar 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943255> >.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259> >.

N'GOLET, A. Unified terminology for pathology of the cervix. **Bull World Health Organ**, v. 78, n. 1, p. 146, 2000. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686750> >.

NATPHOPSUK, S. et al. Risk factors for cervical cancer in northeastern Thailand: detailed analyses of sexual and smoking behavior. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 11, p. 5489-95, 2012. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317205> >.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. **Acta Cytol**, v. 61, n. 4-5, p. 359-372, 2017. ISSN 1938-2650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28693017> >.

NOBRE, R. J.; DE ALMEIDA, L. P.; MARTINS, T. C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **J Clin Virol**, v. 42, n. 1, p. 13-21, May 2008. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304866> >.

ORLANDO, G. et al. Cervical Human Papillomavirus genotypes in HIV-infected women: a cross-sectional analysis of the VALHIDATE study. **J Prev Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. E259-E265, Dec 2017. ISSN 1121-2233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29707656> >.

PASSOS, M. R. L. et al. Papilomavírose Humana em Genital, Parte I. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 108-124, 2008. ISSN 0103-4065.

PETROSKY, E. et al. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 64, n. 11, p. 300-4, Mar 2015. ISSN 1545-861X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25811679> >.

PRIGGE, E. S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; REUSCHENBACH, M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 772, p. 51-66, 2017

Apr - Jun 2017. ISSN 1388-2139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528690> >.

RALPH M. RICHART, M. D. **NATURAL HISTORY OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA**. Clinical Obstetrics and Gynecology. 10: 748-784 p. 1967.

RIBEIRO, J. et al. Characterization of human papillomavirus genotypes and HPV-16 physical status in cervical neoplasias of women from northern Portugal. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 125, n. 2, p. 107-110, May 2014. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513260> >.

RIJKAART, D. C. et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 1, p. 78-88, Jan 2012. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177579> >.

ROCHA-BRISCHILIARI, S. C. et al. Risk factors for cervical HPV infection and genotypes distribution in HIV-infected South Brazilian women. **Infect Agent Cancer**, v. 9, n. 1, p. 6, Feb 2014. ISSN 1750-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24517499> >.

RODRIGUES, L. L. S. et al. Cervico-vaginal self-collection in HIV-infected and uninfected women from Tapajós region, Amazon, Brazil: High acceptability, hrHPV diversity and risk factors. **Gynecol Oncol**, v. 151, n. 1, p. 102-110, 10 2018. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30087059> >.

SAMWEL, K. et al. Analytical performance of a low-cost multiplex polymerase chain reaction human papillomavirus genotyping assay for use in Sub-Saharan Africa. **J Med Virol**, v. 91, n. 2, p. 308-316, Feb 2019. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30281790> >.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, Sep 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826171> >.

_____. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16086, 12 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27905473> >.

_____. A long-term prospective study of type-specific human papillomavirus infection and risk of cervical neoplasia among 20,000 women in the Portland Kaiser Cohort Study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 7, p. 1398-409, Jul 2011. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602310> >.

SERRANO, B. et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 47, p. 14-26, Feb 2018. ISSN 1532-1932. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29037457> >.

SHEW, M. L. et al. Episodic detection of human papillomavirus within a longitudinal cohort of young women. **J Med Virol**, v. 87, n. 12, p. 2122-9, Dec 2015. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26112742> >.

SHI, N. et al. Analysis of risk factors for persistent infection of asymptomatic women with high-risk human papilloma virus. **Hum Vaccin Immunother**, v. 13, n. 6, p. 1-7, 06 2017. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28409676> >.

SHINGLETON, H. M. et al. The current status of the Papanicolaou smear. **CA Cancer J Clin**, v. 45, n. 5, p. 305-20, 1995 Sep-Oct 1995. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656133> >.

SHIRASAWA, H. et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. **J Gen Virol**, v. 67 (Pt 9), p. 2011-5, Sep 1986. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3018133> >.

SHUKLA, S. et al. Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. **Indian J Med Res**, v. 139, n. 4, p. 531-43, Apr 2014. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927339> >.

SILVA, R. C. G. et al. Profile of women with cervical cancer attended for treatment in oncology center. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 695-702, dez. 2018. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1806-93042018000400002> >.

SMITH, R. A. et al. Cancer screening in the United States, 2017: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer

screening. **CA Cancer J Clin**, v. 67, n. 2, p. 100-121, 03 2017. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28170086> >.

SNIJDERS, P. J.; HEIDEMAN, D. A.; MEIJER, C. J. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 520-8, Jun 2010. ISSN 1600-0463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553532> >.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2114-9, Apr 2002. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11966386> >.

STOLER, M. H. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. **Int J Gynecol Pathol**, v. 19, n. 1, p. 16-28, Jan 2000. ISSN 0277-1691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638450> >.

TEIXEIRA, M. F. et al. High risk human papillomavirus prevalence and genotype distribution among women infected with HIV in Manaus, Amazonas. **Virologia J**, v. 15, n. 1, p. 36, 02 2018. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29454382> >.

TORNESELLO, M. L. et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants in human immunodeficiency virus-positive Italian women. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 6, p. 1380-9, Jun 2008. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474553> >.

TRAVASSOS, A. G. et al. Predictors of HPV incidence and clearance in a cohort of Brazilian HIV-infected women. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0185423, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28981551> >.

TSIKOURAS, P. et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. **J BUON**, v. 21, n. 2, p. 320-5, 2016 Mar-Apr 2016. ISSN 1107-0625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273940> >.

VAN DOORSLAER, K. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **J Gen Virol**, v. 99, n. 8, p. 989-990, Aug 2018. ISSN 1465-2099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29927370> >.

WEI, W. F. et al. [Study of integrated state of HPV-16 infection in cervical cancer and precancerous tissues]. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 35, n. 1, p. 47-50, Jan 2015. ISSN 1673-4254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25613608> >.

WHEELER, C. M. et al. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 1, p. 100-10, Jan 2012. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075170> >.

_____. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in sexually active women aged 16-26 years. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 936-44, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236277> >.

WHO. World Health Organization. **Cancer Fact Sheets: Cervical Cancer**. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=16&type=0&sex=2> >. Acesso em 18 de dezembro de 2018.

_____. World Health Organization. **Comprehensive Cervical Cancer Control A guide to essential practice**. 2^a ed. 2014. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/144785/9789241548953_eng.pdf?sequence=1 >. Acesso em 25 de abril de 2018.

_____. World Health Organization. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. Disponível em: < [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hvp\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hvp)-and-cervical-cancer) >. Acesso em 20 de fevereiro de 2019.

_____. World Health Organization. **Human papillomavirus vaccines: WHO position paper**. Maio, 2017. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255353/WER9219.pdf?sequence=1> >. Acesso em 11 de maio de 2018.

WILBUR, D. C.; NAYAR, R. Bethesda 2014: improving on a paradigm shift. **Cytopathology**, v. 26, n. 6, p. 339-42, Dec 2015. ISSN 1365-2303. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26767599> >.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, Jan 2007. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186016> >.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front Biosci**, v. 11, p. 2286-302, Sep 2006. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720315> >.

ZHU, H. et al. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 13, p. e3077, Mar 2016. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27043670> >.

ŞAHINER, F. et al. Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 80, n. 1, p. 43-9, Sep 2014. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953539> >.

ANEXOS

Anexo A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Detecção e genotipagem do HPV em amostras endocervicais de mulheres HIV soropositivas de Florianópolis/SC

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 49117315.1.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.487.654

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda solicitando a inclusão da realização da detecção da infecção por Chlamydia trachomatis nas mesmas amostras coletadas para detecção do HPV. O pesquisador responsável afirma que não será realizado nenhum procedimento adicional à paciente, e que as coletas ainda não iniciaram por motivos burocráticos junto à Instituição coparticipante.

Além disso, há também a solicitação para inclusão de novo pesquisador (Rafael Martins Mafetoni).

O pesquisador apresenta TCLE atualizado, contendo informações sobre o novo procedimento e também o nome do novo integrante da equipe de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

-

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A nova inclusão não traz riscos adicionais àqueles já previstos no projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexado novo TCLE, contendo todas as informações necessárias.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.487.654

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_692680_E1.pdf	05/04/2016 16:33:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	05/04/2016 16:30:19	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	Emenda.pdf	05/04/2016 16:30:09	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	05/04/2016 16:29:49	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	CartaResposta2.pdf	16/11/2015 14:55:14	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	DeclaracaoSMSPalhoca.pdf	16/11/2015 14:52:50	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	Cartaderesposta.pdf	28/10/2015 22:47:36	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.doc	28/10/2015 22:44:10	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDiretorGeral.pdf	10/09/2015 10:56:26	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoLMBM.pdf	10/09/2015 10:55:49	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoeRespons.pdf	10/09/2015 10:55:24	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestradoJoice.pdf	10/09/2015 10:53:55	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_Joice.pdf	10/09/2015 10:53:19	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400

UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.487.854

Ausência	TCLE_Joice.pdf	10/09/2015 10:53:19	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/08/2015 08:56:54	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SecretariadeSaude.pdf	24/08/2015 16:54:24	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	24/08/2015 16:51:06	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 11 de Abril de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Anexo B - Questionário



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
 Centro de Ciências da Saúde
 Programa de Pós-graduação em Farmácia (Análises Clínicas)
 Contatos: Joice de Souza Pereira - Farmacêutica Bioquímica (48) 3721-8148 / (48) 8416-5843 / (48) 9911-9228. e-mail: joice.souza90@hotmail.com
 Prof. Dr. Alexandre S. C. Onofre (48) 9615-6988. e-mail: asonofre@hotmail.com

B. Questionário

Local de Coleta (Nome do Posto de Saúde que frequenta)		<input type="checkbox"/> Palhoça	<input type="checkbox"/> Florianópolis
1	Qual a sua idade?	_____ anos	
2	Você tem HIV/Aids?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
3	Você tem vida sexual ativa?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
4	Se você respondeu SIM para a pergunta anterior, responda:	Com quantos anos você iniciou a vida sexual? _____ anos	
5		Qual o seu número de parceiros e/ou parceiras até hoje?	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 ou mais
6	Você usa Terapia Antirretroviral?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
7	Você tem HPV?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe
8	Você já teve alguma lesão genital ou lesão no colo do útero?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Se souber, assinale o tipo: <input type="checkbox"/> Verrugas genitais <input type="checkbox"/> NIC I <input type="checkbox"/> NIC II <input type="checkbox"/> NIC III <input type="checkbox"/> Carcinoma (câncer) <i>in situ</i>
9	Você já fez exame preventivo (Papanicolaou) anteriormente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
10	Você está grávida?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
11	Você tem algum corrimento vaginal?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Às vezes
12	Você já teve algum IST (Infecção Sexualmente Transmissível)?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Se souber, assinale o tipo: <input type="checkbox"/> Candidíase <input type="checkbox"/> Sífilis <input type="checkbox"/> Clamídia <input type="checkbox"/> Gardnerella <input type="checkbox"/> outra: _____
13	Se você respondeu SIM para a pergunta anterior, responda:	- Você continuou a sentir os sintomas após o tratamento? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
14	Você usa anticoncepcional oral (remédio para não ficar grávida)?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
15	Você fez terapia de reposição hormonal?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
16	Usa DIU (dispositivo intrauterino)?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não sabe
17	Você está na menopausa?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
18	Possui mais de um (a) parceiro (a) sexual atualmente?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
19	Você usa camisinha (preservativo) nas relações sexuais?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> Sempre
20	Você tem filhos?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim Quantos? _____
21	Você fuma cigarro (tabaco)?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
22	Você usa drogas? Maconha, crack, cocaína...	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> Sempre
23	Você faz uso de bebida alcoólica?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> Sempre