



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
CURSO DE MEDICINA

EMANUELLE FERREIRA ALVES
MARÍLIA ALVINO DE MAGALHÃES

**DETECÇÃO DO HPV NAS LESÕES PRÉ-CÂNCER DE COLO UTERINO EM
LABORATÓRIO NA REGIÃO AMAZÔNICA**

BELÉM-PA
2022

EMANUELLE FERREIRA ALVES
MARÍLIA ALVINO DE MAGALHÃES

**DETECÇÃO DO HPV NAS LESÕES PRÉ-CÂNCER DE COLO UTERINO EM
LABORATÓRIO NA REGIÃO AMAZÔNICA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Centro Universitário do Estado do Pará,
como requisito parcial para conclusão da
graduação em Medicina.
Orientadora: Prof.^a Elcimara da Paixão
Ferreira Chagas

BELÉM-PA
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

Biblioteca do CESUPA, Belém – PA

Alves, Emanuelle Ferreira.

Detecção do HPV nas lesões pré-câncer de colo uterino em laboratório na região amazônica / Emanuelle Ferreira Alves, Marília Alvino de Magalhães; orientadora Elcimara da Paixão Ferreira Chagas. – 2022.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro Universitário do Estado do Pará, Medicina, Belém, 2022.

1. HPV (Vírus). 2. Colo uterino – Câncer. 3. Doenças do papilomavírus – Amazônia. I. Magalhães, Marília Alvino de. II. Chagas, Elcimara da Paixão Ferreira, orient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Manoel e Rosene, por me darem a oportunidade de estar neste curso com o qual sonhamos durante tanto tempo. A caminhada não foi fácil, mas espero poder orgulhá-los ainda mais com o novo ciclo que irei iniciar em breve. Espero fazer valer a pena cada dia que passamos longe um do outro, cada minuto de saudade e cada noite de pouco sono. Sua luta me inspira a cada dia, e espero me tornar uma pequena parte do que vocês representam. Não chegaria onde estou hoje sem seu apoio, e essa vitória é de todos nós. Amo vocês.

Ao meu irmão, por ser um amigo e ansiar com carinho pelo meu sucesso. Aprendo muito com você e espero contribuir para sua formação com bons exemplos. Obrigada por compreender os períodos em que precisei me fazer ausente para a conclusão desta jornada.

Ao meu namorado, pela cumplicidade de sempre e por ser fonte de serenidade e bons conselhos nos meus momentos de apreensão. Sua presença torna meus dias mais leves, e nossa parceria é essencial.

Aos demais familiares, em especial minha avó Hilda, e aos meus amigos, tanto os de perto como os de longe. Obrigada pelo apoio, confidências e momentos divertidos que compartilhamos; eles tornaram nossos laços mais fortes.

Emanuelle Alves

DEDICATÓRIA

A Deus pela oportunidade de estar no curso que sonhei durante os longos anos de cursinho. Agradeço porque me manteve até aqui com saúde e força para enfrentar os desafios que surgiam a cada etapa do curso.

À minha mãe, Maura Alvino, que lutou ao meu lado na busca por este sonho, e que diariamente me sustenta com seu cuidado, amor, altruísmo e o mais importante, com a sua fé. Agradeço a essa mulher que há 14 anos tem cumprido a função de mãe e pai com êxito, sem sequer demonstrar fraqueza ou desânimo durante essa tarefa. Todas as minhas conquistas têm o seu nome, e para sempre seremos eu e você contra o mundo. Eu te amo mãe.

Ao meu falecido pai, João Magalhães, que involuntariamente despertou em mim o desejo pela medicina quando lutávamos contra a sua doença. Agradeço por todo seu empenho na construção do meu futuro, este que acontece agora, como fruto do seu trabalho. Te amo pai.

Ao meu namorado, Paulo Brito, por compartilhar comigo o passado, o presente e o futuro. Obrigada pelo conforto nos momentos de inquietude, pelo entusiasmo durante as conquistas, pelos conselhos que me firmam os pés no chão sem que a esperança no futuro se perca. Você sempre será meu exemplo, minha dupla e o meu porto seguro. Te amo meu bem.

Ao demais familiares que de alguma maneira se fizeram presente, e que torcem pelo meu sucesso. Minha eterna gratidão a vocês.

Marília Alvino

AGRADECIMENTOS

À nossa querida orientadora, professora Elcimara Chagas, que gentilmente nos ajudou, mesmo em meio a tantas outras responsabilidades. Agradecemos por todos os recursos investidos na construção deste trabalho, contribuindo para a nossa formação acadêmica e profissional. Nossa eterna gratidão.

Aos nossos mestres, por toda dedicação e trabalho na construção do nosso conhecimento e desenvolvimento profissional. Obrigada por todas as aulas ministradas, por todas as experiências compartilhadas e por todo amor dedicado ao ato de ensinar.

À nossa instituição, CESUPA, a qual tem sido nossa casa por todos esses anos, nos dando o suporte necessário para o aprendizado e desenvolvimento de habilidades necessárias para nos tornarmos médicos capacitados e humanos.

A todos os participantes desta pesquisa, que concordaram em compartilhar suas informações pessoais e contribuíram, direta ou indiretamente, para o avanço da pesquisa científica.

RESUMO

Introdução: o câncer do colo do útero é o quarto mais comum entre a população feminina brasileira e, em termos globais, também figura entre as primeiras posições. Em 99% dos casos, este câncer é causado pela infecção pelo HPV, sendo os genótipos 16 e 18 os mais envolvidos. **Objetivos:** identificar os genótipos de HPV mais presentes nas lesões classificadas como LIEBG e LIEAG. **Métodos:** amostras do colo uterino foram coletadas e submetidas a análise citopatológica, e aquelas com diagnóstico de LIEBG ou LIEAG tiveram seu DNA extraído e amplificado. Para a detecção do HPV foi utilizada a técnica “Nested-PCR” com oligonucleotídeos iniciadores MY9/MY11, e também GP5 e GP6; e para tipagem dos subtipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58 foi realizada PCR em tempo real com sondas específicas. **Resultados:** o HPV esteve presente em 45 (90%) das 50 pacientes com LIEBG ou LIEAG. Nas 23 pacientes que tinham LIEBG e DNA de HPV positivo, o genótipo mais comum foi HPV 58 (34,78%). Por outro lado, nas 22 pacientes com LIEAG e DNA de HPV positivo, o genótipo mais comum foi HPV 16 (50%). Desconsiderando o grau da lesão intraepitelial presente, o HPV 16 foi o mais comum entre as 45 mulheres com DNA de HPV positivo. **Conclusão:** a infecção pelo HPV foi detectada na maioria das pacientes com lesão intraepitelial escamosa, sendo os tipos 16 e 58 os mais comuns. Os genótipos de vírus encontrados foram semelhantes entre LIEBG e LIEAG, entretanto o HPV 16 teve uma prevalência duas vezes maior nas lesões de alto grau em relação às lesões de baixo grau.

Palavras-chave: Lesões Intraepiteliais Escamosas Cervicais; Papilomavírus Humano; Neoplasias do Colo do Útero.

ABSTRACT

Introduction: cervical cancer is the fourth most common among the Brazilian female population and, in global terms, it also ranks among the top positions. In 99% of cases, this cancer is caused by HPV infection, with genotypes 16 and 18 being the most involved. **Objectives:** to identify the most common HPV genotypes in lesions classified as LIEBG and LIEAG. **Methods:** samples of the uterine cervix were collected and submitted to cytopathological analysis, and those diagnosed with LIEBG or LIEAG had their DNA extracted and amplified. For HPV detection, the “Nested-PCR” technique was used with oligonucleotide primers MY9/MY11, and also GP5 and GP6; and for 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 and 58 subtypes typing, real-time PCR was performed with specific probes. **Results:** HPV was present in 45 (90%) of the 50 patients with LIEBG or LIEAG. In the 23 patients who had LIEBG and positive HPV DNA, the most common genotype was HPV 58 (34.78%). On the other hand, in the 22 patients with LIEAG and positive HPV DNA, the most common genotype was HPV 16 (50%). Disregarding the degree of intraepithelial lesion present, HPV 16 was the most common among the 45 women with positive HPV DNA. **Conclusion:** HPV infection was detected in most patients with squamous intraepithelial lesion, with types 16 and 58 being the most common. The virus genotypes found were similar between LIEBG and LIEAG, however HPV 16 had a prevalence twice as high in high-grade lesions in relation to low-grade lesions.

Keywords: Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix; Human papillomavirus; Uterine Cervical Neoplasms.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGC	Células glandulares atípicas de significado indeterminado
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AIS	Adenocarcinoma in situ
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOI	Células atípicas de Origem Indefinida
ASC-H	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se podendo afastar lesão intraepitelial de alto grau.
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas
CA	Câncer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
KCI	Cloreto de potássio
LCR	Região de controle do locus
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase chain reaction ou reação em cadeia da polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunizações
qPCR	PCR em tempo real
RPM	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Epidemiologia do câncer de colo uterino	10
1.2	HPV	11
1.2.1	Morfologia	11
1.2.2	Classificação	11
1.2.3	Dados epidemiológicos	12
1.2.4	Patogênese	12
1.2.5	Diagnóstico	13
1.3	Anatomia e histologia do colo uterino	13
1.4	Lesões intraepiteliais do colo uterino	14
1.4.1	Citologia	15
1.4.2	Histologia	17
1.5	Prevenção do câncer de colo uterino	18
1.5.1	Vacinação contra o HPV	18
1.5.2	Rastreamento das lesões pré-câncer de colo uterino	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	MÉTODO	22
3.1	Aspectos éticos	22
3.2	Tipo de estudo	22
3.3	Local	22
3.4	Coleta do material	22
3.5	Métodos moleculares de pesquisa pelo HPV	22
3.5.1	Extração do DNA pelo kit QIAamp® DNA FFPE Tissue kit da Qiagen:	23
3.5.2	Amplificação da amostra através do kit REPLI-g® da QIAGEN	23
3.6	Qualidade da amostra de DNA por PCR de β -globina	24
3.6.1	Preparo do gel de agarose a 1% p/v	25
3.6.2	Aplicação da amostra	25
3.6.3	Corrida eletroforética	25
3.7	Detecção e tipagem do HPV	25
3.7.1	PCR para detecção do HPV	26
3.7.1.1	PCR com MY9/11	26

3.7.1.2 PCR com GP5/6.....	26
3.7.2 qPCR ou PCR em tempo real – Para Tipagem do HPV.....	27
3.8 Amostra	27
3.9 Variáveis do estudo	28
3.10 Critério de inclusão	28
3.11 Critérios de exclusão.....	28
3.12 Apresentação e análise dos dados	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÃO.....	36
Apêndice A.....	40
Apêndice B.....	41
Anexo A.....	43
Anexo B.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de colo uterino

O CA (câncer) do colo do útero é definido como a multiplicação inadequada das células que o formam. Células escamosas originam 75% dos casos (carcinoma epidermoide), enquanto 20% provêm tanto de células colunares (adenocarcinomas) quanto de células escamosas somadas a células colunares (adenoescamosos mistos), e os 5% restantes correspondem a carcinomas neuroendócrinos de pequenas células¹.

No mundo, segundo dados do IARC (International Agency for Research on Cancer), a incidência de câncer de colo de útero em 2020 foi de 604.127 casos, com total de 341.831 óbitos. Neste ano, o câncer de colo de útero foi a quarta neoplasia mais comum na população feminina mundial, excluindo o câncer de pele não melanoma².

No Brasil, dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer) mostram que, desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o câncer de colo uterino é o terceiro tumor maligno mais frequente nas mulheres (atrás do câncer de mama e do câncer colorretal), e foi a terceira maior causa de morte por câncer nesta população³.

A nível regional, o câncer de colo de útero é o primeiro mais incidente no Norte (26,24/100 mil), e o segundo no Centro-Oeste e Nordeste. Foi na região Norte que ocorreu o maior número de óbitos pela doença, e este foi o câncer que mais matou mulheres em 2019³.

O câncer de colo de útero tem maior incidência entre os 45 e 50 anos, e a mortalidade também aumenta conforme a idade avança. Segundo a American Cancer Society, muitas mulheres com idade avançada não se dão conta de que o risco ainda existe, mesmo à medida em que envelhecem⁴.

Inúmeros fatores elevam o risco de desenvolver o câncer de colo de útero; porém, o mais importante permanece sendo a infecção pelo HPV (papilomavírus humano), em especial por seus subtipos oncogênicos, sendo 16 e 18 os mais comuns³.

1.2 HPV

A infecção pelo HPV constitui o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CA de colo uterino, visto que está associada a 99% dos casos desse tipo de câncer⁵.

A principal via de transmissão do vírus é a sexual. Entretanto, a contaminação pode ocorrer mesmo na ausência de penetração vaginal ou anal, pois apenas o contato direto com pele e mucosa infectadas é suficiente para que haja o contágio⁶.

1.2.1 Morfologia

O HPV pertence à família Papillomaviridae e ao gênero Papillomavirus. Este pequeno vírus não encapsulado, medindo cerca de 52-55nm, é formado por uma única molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) circular de fita dupla⁷.

O genoma do HPV é dividido em 3 regiões: precoce ou “early” (subdividida em E1, E2, E4, E5, E6 e E7); tardia ou “late” (subdividida em L1 e L2); e a região de controle do locus (LCR). A região precoce codifica proteínas envolvidas no ciclo produtivo do vírus e nas transformações celulares induzidas pela infecção. Enquanto isso, a região tardia codifica proteínas do capsídeo viral. Por fim, a LCR não codifica proteínas, mas está envolvida na transcrição dos genes das regiões precoce e tardia, assim como atua na replicação do DNA viral⁸.

1.2.2 Classificação

Apesar de mais de 200 genótipos de HPV terem sido identificados, apenas cerca de 45 causam infecção epitelial do trato anogenital. Estes subtipos patogênicos são identificados por números e podem ser categorizados em grupos de alto e baixo risco, de acordo com seu potencial carcinogênico, sendo comum a coinfeção por mais de uma variedade de HPV⁹⁻¹⁰.

Os de alto risco mais prevalentes incluem os tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82. Estes são os mais frequentes em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (LIEAG) e em carcinomas. Em contrapartida, os de baixo risco são os mais comuns em lesões benignas e em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LIEBG). Estes são representados principalmente pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81⁹.

1.2.3 Dados epidemiológicos

Estima-se que 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas pelo vírus em algum momento da vida, e as maiores taxas de infecção ocorrem em duas faixas etárias diferentes: a primeira em jovens menores de 25 anos e a segunda em idades mais avançadas, acima de 45 anos⁵.

A nível mundial, a prevalência de HPV em pacientes sem anormalidades cervicais é de 11-12% e os tipos mais frequentes nestas mulheres são o 16 (3,2%), 18 (1,4%), 52 (0,9%), 31 (0,8%) e 58 (0,7%)⁵.

Existem 4 genótipos de maior relevância: 16, 18, 6 e 11. Isso se deve ao fato de que 70% dos cânceres genitais estão associados aos vírus HPV 16 e HPV 18. De forma semelhante, os tipos 6 e 11 são encontrados em 90% das verrugas genitais⁵.

Cerca de 91% das infecções pelo HPV são eliminadas espontaneamente nos primeiros 2 anos. Os 10% restantes (infecções persistentes) podem levar à carcinogênese. Este processo leva de 10 a 20 anos, justificando o pico de câncer do colo uterino (45-50 anos) ocorrer décadas após o primeiro ápice de infecção (até 25 anos)^{4,11}.

1.2.4 Patogênese

A infecção pelo HPV se inicia nas células basais, as quais tornam-se expostas por meio de microlesões no epitélio pavimentoso estratificado⁸.

Na infecção produtiva, o material genético do vírus encontra-se em sua forma episossomal circular, não interferindo no ciclo da célula hospedeira. Este tipo de infecção é o mais comum em verrugas genitais e LIEBG. Por outro lado, na infecção não produtiva ocorre integração irreversível do DNA viral com o DNA hospedeiro, levando a alterações celulares e, conseqüentemente, à LIEAG e ao câncer de colo uterino⁸.

A infecção não produtiva tem ação dos oncogenes E6 e E7. O gene E6 leva à degradação da proteína p53, a qual é responsável pela reparação do DNA danificado e pela apoptose de células mutantes. Enquanto isso, o gene E7 liga-se à proteína RB, levando ao prolongamento da fase S do ciclo celular. Vale lembrar que é durante a fase S que ocorre a replicação do DNA, e quando prolongada pode levar à instabilidade do genoma hospedeiro. Destaca-se que HPVs de alto risco apresentam maior afinidade pelas proteínas p53 e pRB quando comparados aos de baixo risco¹¹⁻

Por outro lado, a infecção produtiva é iniciada quando o gene E2 reprime a transcrição dos oncogenes E6 e E7, permitindo que o ciclo celular ocorra normalmente. Concomitante a isto, o gene E1 leva à replicação do genoma viral como elemento extracromossomal. Em seguida, o gene E5 induz a proliferação e diferenciação dessas células basais infectadas, que quando diferenciadas sofrem ação do gene E4. Por sua vez, o gene E4 leva ao prolapso da rede de citoqueratina (resultando na coilocitose) e à maturação/liberação de partículas virais para o meio extracelular^{8,11,12}.

Apesar da integração DNA viral/ DNA hospedeiro ser um evento essencial para a carcinogênese, mutações adicionais são necessárias para que células infectadas tornem-se malignas. Prova disso são as várias lesões intraepiteliais que não progridem para o câncer^{9,11}.

Além do tipo, carga e capacidade de persistência do vírus, fatores genéticos, ambientais, imunológicos e hormonais também contribuem para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. São exemplos desses fatores o tabagismo e a coinfeção com vírus da imunodeficiência humana (HIV)^{1,9}.

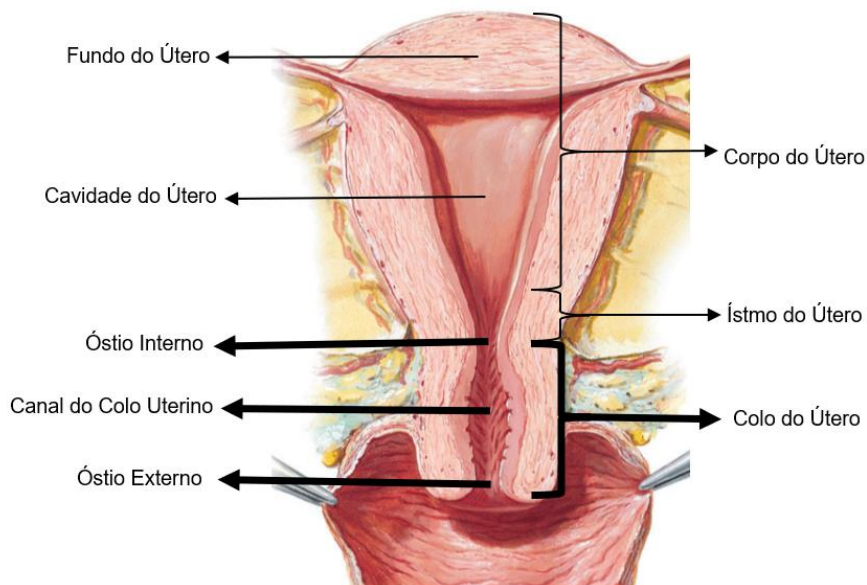
1.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HPV inclui métodos morfológicos e de biologia molecular. Os métodos morfológicos (citologia oncótica, colposcopia e histopatologia) analisam apenas alterações secundárias à presença do vírus. Por outro lado, os métodos de biologia molecular (captura híbrida, reação em cadeia de polimerase) identificam a infecção propriamente dita e seus subtipos¹¹⁻¹².

1.3 Anatomia e histologia do colo uterino

O útero é um órgão oco, de formato piriforme e dividido em 3 regiões: corpo, istmo e colo. O colo situa-se no terço inferior do órgão, e se comunica com a cavidade uterina através do óstio interno, e com a vagina por meio do óstio externo. Entre os dois óstios é encontrado o canal cervical (Ilustração 1)¹³⁻¹⁴.

Ilustração 1 – Anatomia do útero.



Fonte: Adaptado de Atlas of Human Anatomy, 7a ed¹⁵.

O colo do útero possui 2 epitélios de revestimento. O primeiro é o estratificado pavimentoso, o qual recobre a porção do colo que se projeta para a vagina (ectocérvice). O segundo é o colunar simples, que reveste o canal cervical (endocérvice). O local onde ocorre a troca desses epitélios é chamado de zona de transformação (Ilustração 2). Essa região é vulnerável ao surgimento de lesões intraepiteliais devido à exposição das células basais na troca abrupta dos epitélios, principalmente durante a idade reprodutiva, quando essa zona está localizada fora do canal cervical^{11,16}.

Ilustração 2 – Zona de transição do epitélio do colo uterino.



Fonte: Adaptado de Histologia Texto e Atlas, 7a ed¹⁶.

1.4 Lesões intraepiteliais do colo uterino

As lesões precursoras são atipias celulares, induzidas pelo HPV, a partir das quais os carcinomas invasivos de colo de útero se desenvolvem. A progressão para o

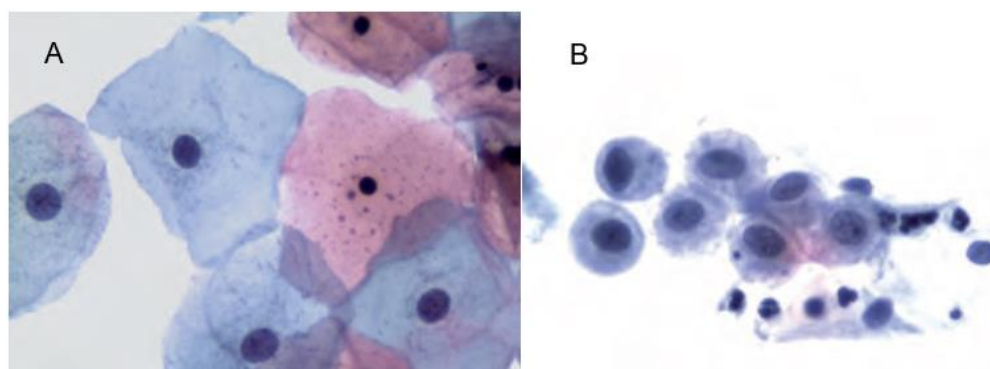
câncer de células escamosas se inicia com as lesões intraepiteliais de baixo grau, evoluindo para lesões intraepiteliais de alto grau, que por fim tornam-se o carcinoma invasor. Vale frisar que essas lesões podem regredir, sendo as taxas de regressão maiores em LIEBG (60%) do que em LIEAG (30-40%)^{1,5,10,17}.

1.4.1 Citologia

Nos esfregaços da citologia oncológica, as células epiteliais comumente encontradas são as superficiais e as intermediárias. Por outro lado, células parabasais e basais são raras e, quando presentes (como em mulheres com atrofia na pós-menopausa), se mostram em pequenos agrupamentos. Vale frisar, que apesar de as células infectadas pelo HPV serem inicialmente basais, estas ascendem para a superfície epitelial, sendo descamadas durante a coleta do exame Papanicolau⁸.

As células escamosas superficiais e intermediárias são grandes, apresentam núcleo picnótico com cromatina densa, e seu citoplasma é abundante, poligonal e transparente (Ilustração 3A). Em contrapartida, células parabasais e basais são pequenas, possuem núcleo redondo com cromatina granular, o qual ocupa metade da célula. O citoplasma destas células é denso e relativamente escasso (Ilustração 3B)^{8,18}.

Ilustração 3 – Células normais do epitélio do colo uterino.



Fonte: Adaptado de Caderno de referência 1: citopatologia ginecológica, publicado em 2012⁸.

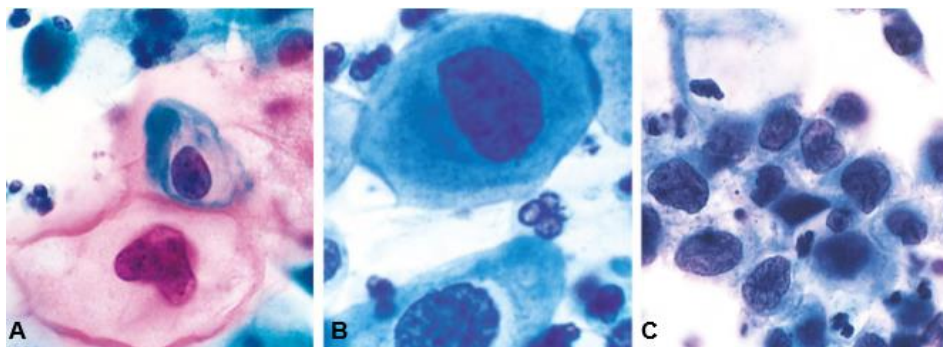
As atipias nucleares incluem núcleo aumentado, hiper cromasia, polimorfismo nuclear, irregularidade da borda nuclear, multinucleação e anisocariose (variação do tamanho nuclear). Essas alterações costumam ser discretas em LIEBG, e tornam-se cada vez mais marcantes com a progressão da lesão. Além disso, com a evolução

das lesões, a maturidade citoplasmática é cada vez menor, e pode ser avaliada pela relação núcleo/citoplasma (quanto maior, mais imatura a célula)⁸.

Nas LIEBG as células são grandes, com citoplasma abundante (maduro) com discretas atipias nucleares (Ilustração 4A). Além disso, podem ser encontradas células com alterações típicas da infecção pelo HPV (coilocitos): núcleo atípico e halo perinuclear delimitado por uma borda citoplasmática densamente corada (ilustração 5)¹⁸.

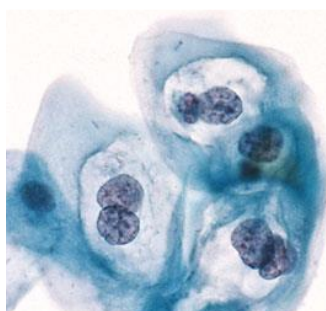
Diferente disto, as LIEAG possuem células pequenas, redondas, de citoplasma escasso (imaturas) e com atipias nucleares frequentes e significativas (Ilustração 4B). Ademais, estas células costumam se apresentar em agrupamento (Ilustração 4C). Tendo isso em vista, é necessária a procura por atipias nucleares em todos os agrupamentos de células basais/parabasais para diferenciá-los dos formados em LIEAG^{8,18}.

Ilustração 4 – Células das lesões pré-câncer de colo uterino.



Fonte: Adaptado de Robbins Patologia Básica, 9ª ed¹.

Ilustração 5 – Coilocitose.



Fonte: The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, 3th¹⁸.

1.4.2 Histologia

Em 1952, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou histologicamente as lesões pré-câncer em displasia leve, moderada e acentuada/carcinoma in situ. Posteriormente, em 1967, Richart estabeleceu a nomenclatura NIC (neoplasia intraepitelial cervical), dividida em NIC 1, 2 e 3. Atualmente, o sistema de classificação utilizado é o Bethesda, atualizado em 2001, o qual categoriza essas lesões em LIEBG e LIEAG (Quadro 1)^{8,19}.

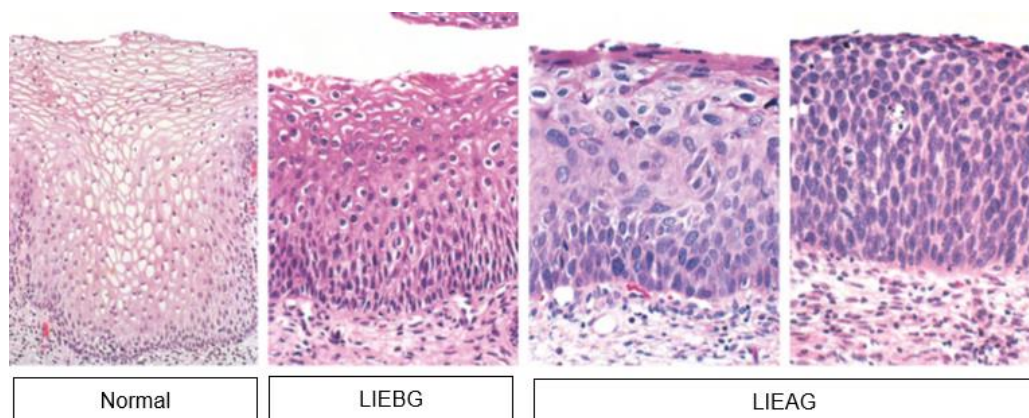
Quadro 1 – Sistemas de classificação histológica das lesões pré-câncer de colo uterino.

OMS (Displasia)	Richart (Neoplasia Intraepitelial Cervical)	Bethesda (Lesão Intraepitelial Escamosa)
Displasia leve	NIC 1	LIEBG
Displasia moderada	NIC 2	LIEAG
Displasia acentuada/ carcinoma in situ	NIC 3	

Fonte: Adaptado de Caderno de referência 1: citopatologia ginecológica, publicado em 2012⁸.

A gradação histológica das lesões pré-câncer leva em conta a espessura do epitélio ocupada por células displásicas. Quando essas células indiferenciadas se restringem apenas ao terço inferior do epitélio são chamadas de LIEBG, e quando ultrapassam esse limite passam a ser chamadas de LIEAG, as quais podem ocupar toda a espessura do epitélio (Ilustração 6)⁸.

Ilustração 6 – Histologia das lesões pré-câncer de colo uterino.



Fonte: Adaptado de Robbins Patologia Básica, 9a ed¹.

1.5 Prevenção do câncer de colo uterino

A prevenção do câncer de colo de útero pode ser dividida em primária e secundária: a prevenção primária visa reduzir a incidência da patologia, e no Brasil é bem representada pela vacinação. Já em termos de prevenção secundária, a OMS incentiva a detecção precoce do câncer de colo uterino por meio do diagnóstico precoce e do rastreamento³.

1.5.1 Vacinação contra o HPV

A vacina tetravalente inativada contra o HPV está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) e protege contra os subtipos oncogênicos (16 e 18) e não oncogênicos do HPV (principalmente 6 e 11, que causam verrugas genitais e estão presentes em 90% dos condilomas genitais e papilomas laríngeos). A vacina foi aprovada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), assim como a vacina bivalente – que protege apenas contra os subtipos oncogênicos –, e está disponível para meninos de 11 a 14 anos e meninas de 9 a 14 anos – preferencialmente ainda sem vida sexual iniciada, para que a resposta imunológica gerada seja mais eficaz²⁰. Para esta população, o esquema vacinal proposto pelo PNI (Programa Nacional de Imunizações) é composto de duas doses separadas por um intervalo de 6 meses.

Para a população imunossuprimida, tanto a faixa etária quanto o esquema vacinal são adaptados. Devem ser administradas 3 doses: a segunda, 1 a 2 meses após a primeira, e a terceira, 6 meses após a primeira. A faixa etária inicialmente indicada pelo Ministério da Saúde (em 2017) foi de 9 a 26 anos de idade para a população imunossuprimida masculina e feminina. Porém, desde 2021, a faixa etária feminina foi estendida para 9 a 45 anos, e em julho de 2022 esta ampliação foi adotada também para a população masculina. A imunossupressão causada por doença (HIV/AIDS) ou tratamento (quimio ou radioterapia, transplante de órgão sólido ou de medula óssea), além de ser um importante fator de risco para a infecção e persistência do HPV, também causa maior risco de desenvolver outras neoplasias associadas a este vírus. Destaca-se que gestantes não devem ser vacinadas, mesmo que estejam incluídas na faixa etária de recomendação²⁰⁻²¹.

1.5.2 Rastreamento das lesões pré-câncer de colo uterino

No Brasil, o rastreamento deve ser iniciado em mulheres com 25 anos, se houver vida sexual ativa, e deve ser encerrado a partir dos 64 anos, quando houver dois exames consecutivos com resultado negativo nos últimos 5 anos. Os primeiros 2 exames da vida da mulher devem ser feitos com intervalo de 1 ano e, se ambos forem negativos, os próximos podem ser feitos a cada 3 anos. É importante mencionar que, de acordo com a lesão encontrada, a periodicidade do rastreio e o método utilizado para este fim podem ser alterados¹⁹.

O exame citopatológico do colo do útero, também chamado Papanicolaou ou preventivo, é o método empregado atualmente no Brasil para detecção precoce das lesões precursoras do câncer de colo do útero. Nele, é realizada a “colheita dupla” (material da ectocérvice e da endocérvice), e a amostra obtida é analisada em lâmina usando corantes específicos. As possíveis alterações do exame, antes chamadas “classes”, hoje têm sua nomenclatura baseada no Sistema de Bethesda, como elucidado no Quadro 2^{8,22}.

Quadro 2 – Resultados alterados do exame de citopatologia oncótica.

Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS)	Possivelmente não neoplásicas (ASC-US)
	Não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H)
Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGC)	Possivelmente não neoplásicas
	Não se pode afastar lesão de alto grau
Células atípicas de origem indefinida (AOI)	Possivelmente não neoplásicas
	Não se pode afastar lesão de alto grau
Lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG)	
Lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG)	
Lesão intraepitelial de alto grau não podendo excluir microinvasão	
Carcinoma escamoso invasor	
Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS) ou invasor	

Fonte: Adaptado de Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero, publicado em 2016¹⁹.

A depender da idade da paciente e de qual alteração foi identificada, pode ser necessário realizar outros exames, como a colposcopia ou mesmo a biópsia do colo uterino²³.

A colposcopia consiste em avaliar o colo do útero utilizando o colposcópico, um aparelho que possui lentes de aumento e uma câmera digital acoplada, para registro em prontuário das imagens visualizadas. É um exame muito útil para guiar o local de realização da biópsia, mas também para que sejam visualizadas as lesões subclínicas do HPV, bem como sua evolução. Durante a colposcopia, são utilizadas soluções de ácido acético (para evidenciar áreas de maior atividade celular) e de Schiller (para evidenciar áreas iodo negativas, que são suspeitas)²³.

A biópsia de colo uterino é indicada para confirmação do diagnóstico obtido na citologia, após realização de colposcopia. Consiste na retirada de um pequeno fragmento da lesão suspeita para posterior análise histopatológica, a qual poderá demonstrar resultados como: lesão intraepitelial de baixo grau, lesão intraepitelial de alto grau, adenocarcinoma in situ e carcinoma invasor^{19,22}.

Diante do exposto, indaga-se: como esteve a detecção do HPV nas lesões pré-câncer de colo uterino na região amazônica nos anos de 2014 a 2017? Considerando que o câncer de colo uterino é muito prevalente no Brasil – e sobretudo no Pará –, e com altas taxas de mortalidade, conhecer os genótipos mais frequentes de HPV é essencial. Importante mencionar que a progressão do estágio de lesão intraepitelial escamosa para lesão neoplásica é lenta, proporcionando tempo hábil para identificar a presença de HPV e tomar as medidas necessárias. Portanto, os dados aqui obtidos contribuirão tanto para a epidemiologia local quanto para a criação de medidas de promoção de saúde, uma vez que estas serão mais assertivas se construídas de acordo com o perfil exato das pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar o HPV em lesões pré-câncer do colo uterino.

2.2 Específicos

- Identificar a prevalência de HPV em lesões pré-câncer do colo uterino.
- Determinar os subtipos de HPV presentes nas lesões pré-neoplásicas do colo do útero.
- Comparar os subtipos de HPV presentes nas LIEBG e nas LIEAG.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

A coleta de dados foi prospectiva e as informações das pacientes foram selecionadas conforme protocolo (Apêndice A). Os dados foram selecionados após diagnóstico das amostras coletadas para análise histopatológica, a qual foi realizada no Laboratório Paulo Azevedo. Todas as participantes foram esclarecidas e consultadas previamente sobre o uso do material biológico (Apêndice B).

3.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo transversal analítico que foi realizado no período de junho de 2014 a outubro de 2017.

3.3 Local

Foram incluídas neste estudo amostras oriundas do Laboratório Paulo Azevedo, o qual atende pacientes de toda região metropolitana de Belém do Pará.

3.4 Coleta do material

Os espécimes coletados foram provenientes de blocos de material parafinado de biópsias de colo uterino já devidamente armazenados em solução de formalina 10% tamponada. Após as amostras terem sido submetidas à avaliação macroscópica, processadas em histotécnico e incluídas em blocos parafinados, tiveram seus laudos histopatológicos avaliados e a presença de atividade viral (coilocitose) analisada, ainda no setor de Patologia do Laboratório Paulo Azevedo.

Posteriormente, os blocos parafinados foram transportados para o Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da UFPA (Universidade Federal do Pará), onde foram realizados cortes, com ajuda de um micrótomo, tanto em lâminas silanizadas – para proceder à técnica de imunoistoquímica – quanto em microtubos de 1,5 ml – para proceder à biologia molecular para extração de DNA e detecção do DNA do HPV.

3.5 Métodos moleculares de pesquisa pelo HPV

Para extração de DNA das amostras teciduais parafinadas foram, inicialmente, cortadas com o auxílio de uma navalha em micrótomo, 05 a 100 µm de material. Em

seguida, os cortes foram desparafinizados e hidratados para posterior digestão do tecido por proteína K. Após a digestão do tecido, o DNA foi recuperado utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen). Para amplificação da amostra de DNA, todas foram submetidas à reação com o kit REPLI-g (Qiagen).

3.5.1 Extração do DNA pelo kit QIAamp® DNA FFPE Tissue kit da Qiagen:

Em microtubo de 2mL contendo o corte foi adicionado 1 mL de xilol. O microtubo foi fechado, levado ao vortex por 10 segundos e centrifugado em velocidade de 13.000 rpm por 2 minutos a 20°C. Foi removido o sobrenadante por pipetagem cuidadosamente e 1 mL de etanol 96-100% foi adicionado no pellet e misturado no vortex com centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos em 20°C. Outra remoção do sobrenadante por pipetagem foi realizada, seguida de incubação a temperatura ambiente, mantendo o tubo aberto, por 10 minutos ou até todo o etanol residual evaporar.

O pellet foi ressuscitado em 180 µL de buffer ATL com adição de 20 µL de proteinase K e agitação no vortex, seguida de incubação a 56°C por 1 hora ou até a amostra lisar completamente. Nova incubação a 90°C por 1 hora foi realizada com mais uma centrifugação por 1 minuto a 15°C por 11.000 rpm.

Em seguida foi colocado 200 µL buffer AL e o microtubo levado ao vórtex, foi efetuada a adição de 200 µL de etanol e procedida agitação no vortex e rápida centrifugação. O conteúdo do microtubo foi transferido para a coluna e centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm, em seguida procedeu-se a troca do tubo coletor e foi adicionado 500 µL de buffer AW1 na mistura seguido de centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. Nova troca do tubo coletor foi executada e 500 µL de buffer AW2 adicionado com outra centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. O tubo coletor foi removido e uma centrifugação seca por 3 minutos a 13.00 rpm foi executada.

A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril e 50 µL de buffer ATE adicionado na coluna, que será fechada e incubada por 1 minuto a 25°C e posterior centrifugação por 1 minuto em velocidade máxima para a obtenção do DNA e armazenamento a -20°C.

3.5.2 Amplificação da amostra através do kit REPLI-g® da QIAGEN

Inicialmente foi preparado o buffer D1 e N1 nas seguintes concentrações:

- Buffer D1: 0,50 µL de DLB e 2 µL água para cada reação.

- Buffer N1: 0,75 μ L de stop solution e 4,25 μ L de água para cada reação.

Em microtubo de 1,5 ou 0,5 mL foi colocado 2,5 μ L de DNA e 2,5 μ L de buffer D1, com agitação no vortex e centrifugação rápida. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 3 minutos e 5,0 μ L de buffer N1 adicionado na amostra com agitação no vortex e centrifugação rápida.

A seguir ocorreu o preparo do Master Mix usando 29 μ L de buffer reaction, 1 μ L de DNA polimerase e 10 μ L de água para cada reação. Foram adicionados 40 μ L do Master Mix em 10 μ L do DNA desnaturado, com incubação a 30° por 08 a 16 horas e posterior incubação a 65° por 3 minutos.

3.6 Qualidade da amostra de DNA por PCR de β -globina

Como controle da extração de DNA das amostras foi realizada uma reação de amplificação em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificaram o gene da globina (a presença da globina atesta a quantidade suficiente de DNA na amostra para a PCR).

Para a realização da técnica de PCR foi utilizado o kit Platinum® Taq DNA (Invitrogen, Brasil) em uma reação com volume final de 20 μ L. Para isso foi adicionado 2 μ L de solução tampão (10X) a um microtubo de 0,2 mL; 0,8 μ L de Cloreto de Magnésio 50 mM; 0,8 μ L de Desoxirribonucleotídeo Trifosfato (dNTPs) a 10 mM; 0,8 μ L de Oligonucleotídeo Iniciador 5' - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3' 10 μ M e Oligonucleotídeo Iniciador reverso 5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC- 3' 10 μ M; 0,15 μ L de Taq Polimerase 5U/ μ L ; 14,45 μ L de água destilada/deionizada. Logo em seguida, 1 μ L da amostra de DNA foi extraído.

As reações ocorreram no termociclador (Eppendorf) onde foram submetidas à seguinte ciclagem: Primeiramente, um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos. Após 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, ciclo de hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores a 56°C por 30 segundos, e ciclo de extensão da Taq polimerase a 72°C por 30 segundos. Após a ciclagem, foi realizado um ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos e a reação foi estabilizada em 4°C.

Posteriormente as amostras foram submetidas a eletroforese conforme protocolo abaixo.

3.6.1 Preparo do gel de agarose a 1% p/v

Em um becker, foi adicionado 1 grama de agarose e adicionado 100 ml de Tris-Borato-EDTA (TBE 1X). Logo em seguida, foi levado ao forno microondas por 90 segundos até que a agarose dissolvesse completamente no tampão. Quando a solução do gel atingiu 60-70°C foi adicionado 1 µl de Brometo de Etídio (10mg/ml). A solução de gel foi despejada em uma cuba de acrílico e foram colocados pentes para a formação de poços. Uma vez geleificado, o gel foi colocado na cuba de eletroforese contendo TBE (1X).

3.6.2 Aplicação da amostra

Em cada poço foi colocado 8 µl de produto da PCR com 2 µl de tampão de aplicação no poço do gel.

3.6.3 Corrida eletroforética

A fonte da cuba de eletroforese foi programada para 100 V, 500 mA para efetuar a eletroforese por 30 minutos. Nesse tempo, o DNA da amostra migrou até o polo positivo da cuba e o brometo de etídeo se intercalou entre as bases do ácido nucleico. Após esta etapa, o gel foi levado para a visualização sob luz ultravioleta no transiluminador Gelliance 200™, Perkin Elmer®, EUA e as bandas de DNA visualizadas através do software GeneSnap.

As amostras foram consideradas positivas quando o produto da PCR em gel de agarose apresentar uma banda de 269 pb à visualização sob luz ultravioleta e captura fotográfica no Gealiance 200 (Imaging System, PerkinElmer® através do software GeneSnap (Perkin Elmer). Nos casos em que o DNA não foi detectado na amostra, foi repetido o processo de extração até obter um resultado positivo na PCR.

Uma vez confirmada a presença de DNA nas amostras extraídas, foram realizados os PCRs para detecção do DNA de HPV.

3.7 Detecção e tipagem do HPV

Para pesquisa de HPV foram utilizados 2 procedimentos de PCR: o primeiro para a detecção, constando de duas etapas, e o segundo para a tipagem de 9 subtipos virais que são: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58. A segunda etapa foi realizada apenas nas amostras positivas da primeira etapa. Para cada tipo de HPV há uma sonda específica na detecção dos subtipos virais.

3.7.1 PCR para detecção do HPV

Para detecção do HPV foi utilizada a técnica de biologia molecular conhecida como “Nested-PCR” capaz de detectar a presença de um ácido nucleico desse vírus, mesmo que em quantidades ínfimas. Essa técnica nada mais é do que a reação de polimerase em cadeia (PCR) realizada em duas etapas, o que permite amplificação em milhões de vezes de um determinado trecho de DNA.

3.7.1.1 PCR com MY9/11

Inicialmente foi realizada uma PCR com iniciadores externos que amplifica um fragmento de 440 pares de bases (pb). Os iniciadores universais MY9 e MY11 que são capazes de detectar os diferentes tipos de HPV devido ao seu anelamento em uma área conservada do genoma viral (L1) e amplificará na reação de PCR um segmento de 440 pares de bases.

Nesta primeira reação de PCR foram utilizados 100ng de DNA da amostra extraída em um volume final de reação de 20µL contendo 2,5 ul de tampão 10X (200 mM de Tris-HCL pH 8,6 e 500 mM de KCl), 1,5 ul de Mg Cl₂ a 50 mM, 1 ul de DNTp a 10 mM, 200 nM de iniciadores universais MY9 (5´-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3´) e MY11 (5´- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG - 3´) e 0,25 unidades de Taq DNA polimerase. A reação foi de um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, e 35 ciclos da amplificação de PCR foram executados. Cada ciclo consistiu em 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C por 5 minutos.

Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. O preparo do gel, a aplicação do produto de PCR e a eletroforese foram realizados como explicados anteriormente.

As amostras positivas apresentaram uma banda de 440 pares de bases (pb) à visualização sob luz ultravioleta e captura fotográfica no Gealiance 200 (Imaging System, PerkinElmer®) através do software GeneSnap (Perkin Elmer). As amostras negativas nesta PCR foram submetidas a uma segunda PCR.

3.7.1.2 PCR com GP5/6

A segunda PCR utilizando os oligonucleotídeos GP5 e GP6 aumenta a sensibilidade da técnica na detecção do vírus. Para a segunda PCR2 foi utilizado 1 µL do produto amplificado na primeira reação adicionando os oligonucleotídeos internos

à região amplificada na reação anterior, GP05 (5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC- 3') e GP06 (5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3'). A seguir as reações foram colocadas no termociclador (Eppendorf) e submetidas a ciclagem como descrito no item anterior.

Em seguida, foram aplicadas as amostras em gel de agarose e elas foram submetidas à eletroforese (procedimento similar ao explicado anteriormente). Foram consideradas positivas as amostras em que o produto da PCR apresentou uma banda de 150 pb à visualização sob luz ultravioleta.

3.7.2 qPCR ou PCR em tempo real – Para Tipagem do HPV

Realizada por PCR em tempo real (qPCR), utilizando o kit Platinum® qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), com sondas específicas para 9 subtipos (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58). Para cada amostra foi utilizado 0,1 mg de DNA, 200 nM de cada oligo iniciador, 0,1 mL de ROX Dye, 10 mL de tampão de reação e água Milli Q autoclavada qsp 20 mL. Foram executados 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 60°C por 60 segundos. Ao final foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle de qualidade da reação. Os resultados foram analisados pelo StepOnePlus 2.0v software, e foram consideradas positivas as amostras que tiveram curva de amplificação para o subtipo analisado.

3.8 Amostra

Foram incluídas 50 pacientes (N=50) que apresentavam lesões de colo uterino neoplásicas ou pré-neoplásicas demonstradas por meio de biópsias analisadas no Laboratório Paulo Azevedo. A amostra foi dividida em 2 grupos, conforme resultado histopatológico: 25 pacientes com LIEBG e 25 pacientes com LIEAG. O Quadro 3 apresenta o esquema de divisão das participantes.

Quadro 3 – Divisão da amostra.

TIPO HISTOPATOLÓGICO	QUANTIDADE
LIEBG	25
LIEAG	25
TOTAL (N)	50

Fonte: elaborado pelos autores.

3.9 Variáveis do estudo

Foram analisadas como variáveis: presença de HPV, tipo de HPV e tipos de lesão pré-câncer de colo uterino.

3.10 Critério de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão: pacientes do sexo feminino; maiores de 18 anos; com vida sexual iniciada; que apresentam cervicite, LIEBG, LIEAG ou CA de colo uterino; e com suas biópsias oriundas do Laboratório Paulo Azevedo.

3.11 Critérios de exclusão

A não observância de um dos critérios acima implicará na exclusão do indivíduo da pesquisa, bem como foram excluídas pacientes que não sejam do sexo feminino; menores de 18 anos; sem vida sexual iniciada; que não apresentam cervicite, lesão intraepitelial do colo do útero ou CA de colo uterino; e com biópsias externas ao Laboratório Paulo Azevedo.

3.12 Apresentação e análise dos dados

Para a organização e exposição dos dados coletados foram utilizadas tabelas, gráficos e outras ferramentas, utilizando os programas Microsoft Office Word e Excel 2021.

4 RESULTADOS

Dentre as 25 participantes com LIEBG, 23 apresentavam DNA de HPV positivo; já entre as 25 pacientes com LIEAG, 22 estavam infectadas pelo vírus. Diante disso, verificou-se um total de 45 pacientes HPV positivo (Tabela 1).

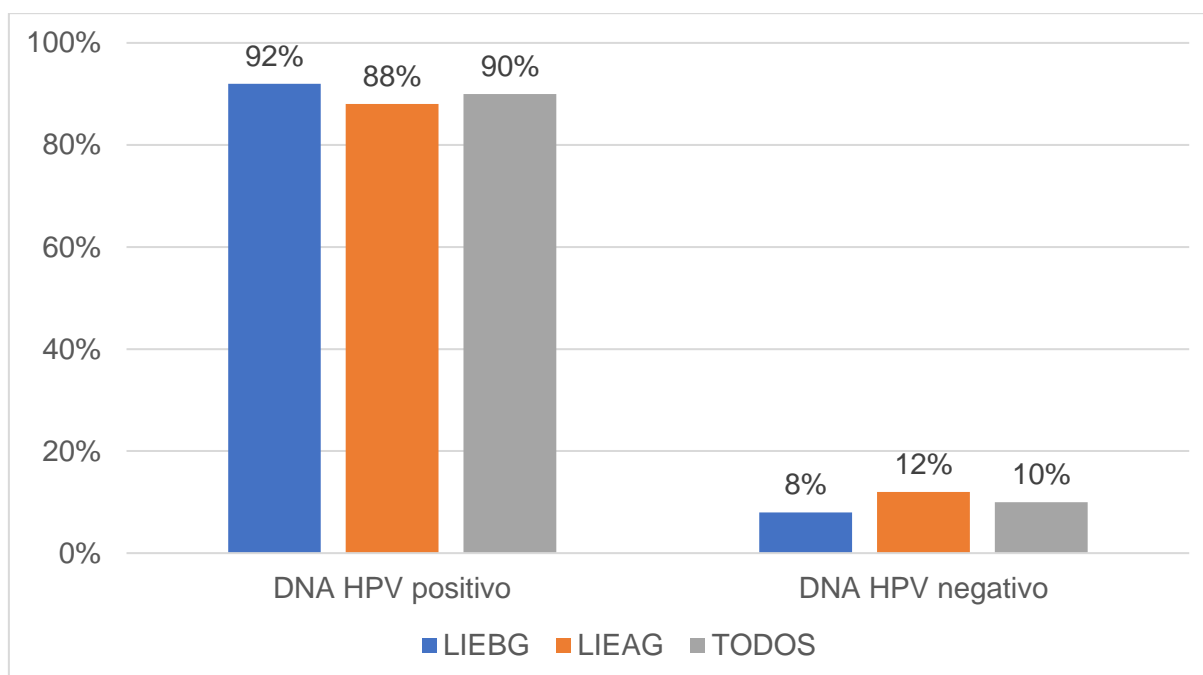
Tabela 1 – Detecção de DNA do HPV nas pacientes com lesão intraepitelial de colo do útero no laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.

	LIEBG	LIEAG	TOTAL	Valor de p*
DNA de HPV positivo	23	22	45	< 0.0001
DNA de HPV negativo	2	3	5	
TOTAL	25	25	50	

* Teste de Mann Whitney. Fonte: elaborado pelos autores.

Observou-se que a prevalência da infecção é maior no grupo com LIEBG (92%) quando comparada à das pacientes com LIEAG (88%), e que a detecção do DNA viral em toda a amostra estudada (N=50) foi de 90% (Gráfico 1).

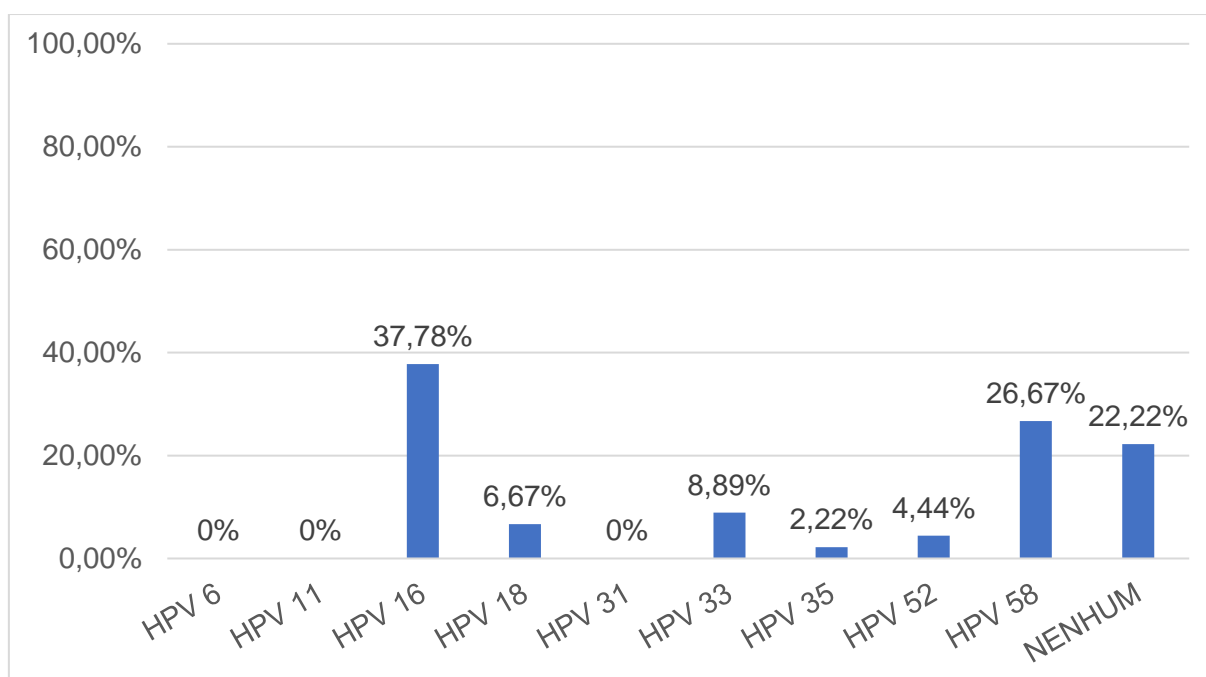
Gráfico 1 – Prevalência da infecção pelo HPV de acordo com o tipo de lesão intraepitelial do colo uterino em pacientes do Laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.



Fonte: elaborado pelos autores.

Dentre as 45 pacientes que apresentaram DNA do HPV positivo, o subtipo mais detectado foi o HPV 16, com 17 pacientes (37,78%), seguido pelo HPV 58, com 12 pacientes (26,67%). Taxas menores de detecção ocorreram com o HPV 33 (4 pacientes, correspondendo a 8,89%), HPV 18 (3 pacientes, correspondendo a 6,67%), HPV 52 (2 pacientes, correspondendo a 4,44%) e HPV 35 (apenas 1 paciente, correspondendo a 2,22%) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Prevalência dos subtipos pesquisados de HPV nas pacientes com DNA de HPV positivo no Laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.



Fonte: elaborado pelos autores.

Entre as 23 pacientes que possuíam DNA de HPV positivo e lesão intraepitelial de baixo grau, os tipos encontrados foram:

- HPV 16 (6 pacientes);
- HPV 18 (2 pacientes);
- HPV 33 (2 pacientes);
- HPV 52 (1 paciente);
- HPV 58 (8 pacientes);
- 6 pacientes não possuíam nenhum dos tipos de HPV pesquisados.

Nas 22 pacientes que possuíam DNA de HPV positivo e lesão intraepitelial de alto grau, foram encontrados os seguintes dados:

- HPV 16 (11 pacientes);
- HPV 18 (1 paciente);
- HPV 33 (2 pacientes);
- HPV 35 (1 paciente);
- HPV 52 (1 paciente);
- HPV 58 (4 pacientes);
- 4 pacientes não possuíam nenhum dos tipos de HPV pesquisados.

Entre as pacientes que possuíam DNA de HPV positivo, não foram encontrados os tipos 6, 11 e 31. Outrossim, o genótipo 35 não foi detectado nas participantes com LIEBG.

Observou-se que 10 das 45 pacientes (22,22%) com HPV positivo estavam infectadas por um subtipo que não foi incluído neste estudo – importante destacar que foram pesquisados os subtipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58. As Tabelas 2 e 3 detalham estas informações.

Tabela 2 – Subtipos de HPV encontrados nas pacientes com DNA de HPV positivo de alto risco oncogênico, no Laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.

		HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35	HPV 52	HPV 58	Valor de p*
LIEBG	23	6	2	0	2	0	1	8	0.09
LIEAG	22	11	1	0	2	1	1	4	
TOTAL	45	17	3	0	4	1	2	12	

Foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Fonte: elaborado pelos autores.

Tabela 3 – Subtipos de HPV encontrados nas pacientes com DNA de HPV positivo de baixo risco oncogênico e não subtipados, no Laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.

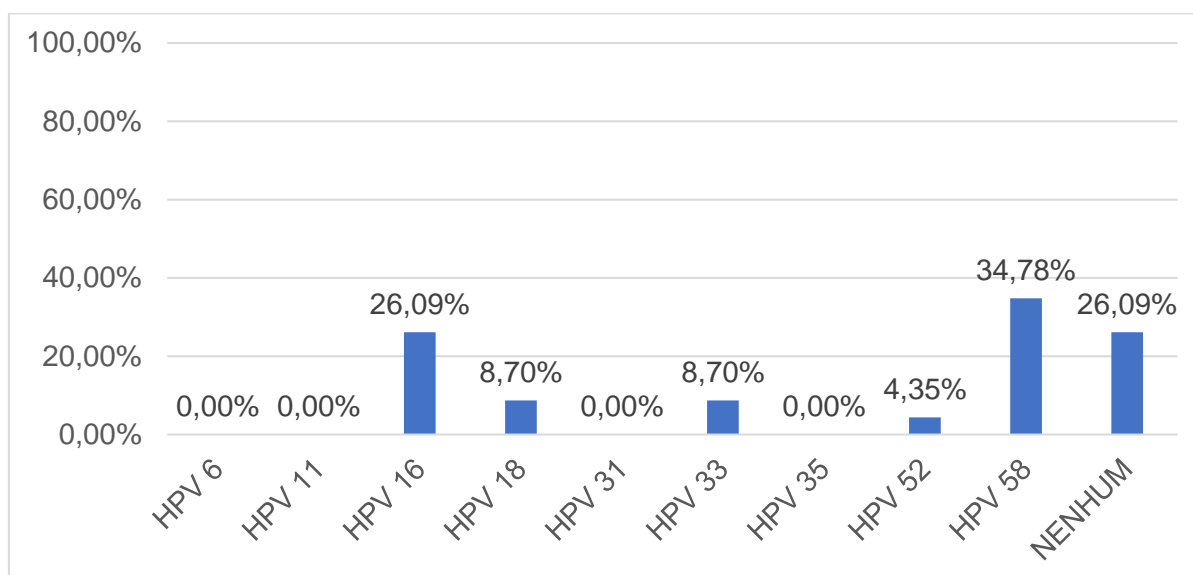
	HPV 6	HPV 11	NENHUM DOS TIPOS PESQUISADOS	Valor de p*
LIEBG 23	0	0	6	0.369
LIEAG 22	0	0	4	
TOTAL 45	0	0	10	

Foi utilizado o Teste G. Fonte: elaborado pelos autores.

É importante mencionar que a presença de um tipo de HPV não exclui a possibilidade de infecção por outro tipo; isto foi demonstrado no presente estudo, visto que 4 pacientes estavam infectadas por dois tipos diferentes de HPV, o que corresponde a 8,89% da população de 45 pacientes com DNA do HPV positivo, sendo que, destas 4 pacientes, 3 tinham o HPV 16 envolvido. Das participantes com LIEBG, 2 apresentavam coinfeção: uma com os tipos 16 e 33 e outra com os tipos 18 e 52. Da mesma forma, 2 pacientes com LIEAG apresentavam coinfeção, ambas pelos tipos 16 e 58.

Nas pacientes com LIEBG, o HPV 58 foi o mais presente, tendo sido detectado em 34,78% das pacientes. Em seguida, com 26,09% dos casos, esteve o HPV 16. Com relação ao terceiro lugar, houve coincidência de detecção entre os tipos 18 e 33, ambos presentes em 8,70% das pacientes. Esta posição foi muito inferior às duas primeiras; contudo, ainda representou o dobro da taxa de detecção do HPV 52, de apenas 4,35%. Em 26,09% das pacientes não foi detectado nenhum dos tipos de HPV incluídos no estudo (Gráfico 3).

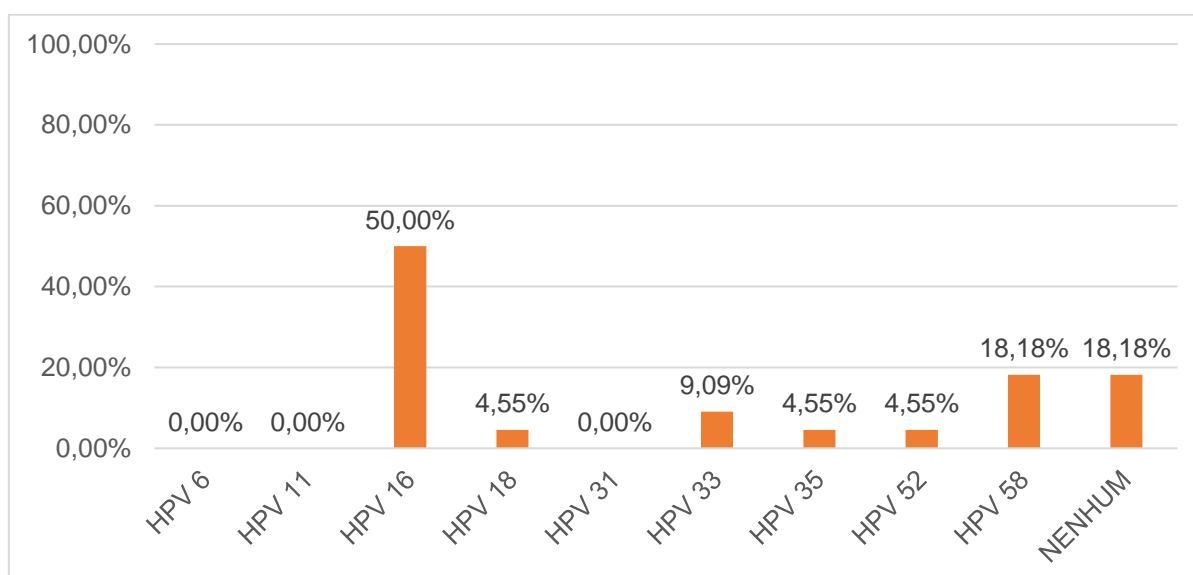
Gráfico 3 – Prevalência dos tipos de HPV em pacientes com LIEBG no Laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.



Fonte: elaborado pelos autores.

Observa-se que dentre os tipos de HPV pesquisados, o 16 foi o mais prevalente entre pacientes com LIEAG, sendo detectado em 50% deste grupo. Este valor supera, em mais de 2 vezes, a porcentagem alcançada pelo segundo vírus mais comum entre LIEAG, o HPV 58 (18%). Por fim, verificou-se que 18% dessas pacientes não estavam infectadas por nenhum dos tipos de papilomavírus humanos testados (gráfico 4).

Gráfico 4 – Prevalência dos tipos de HPV em pacientes com LIEAG no Laboratório Paulo Azevedo, em Belém, de 2014 a 2017.



Fonte: elaborado pelos autores.

5 DISCUSSÃO

De acordo com Fernandes e colaboradores²⁴, em estudo realizado em Natal-RN com 140 pacientes, a prevalência da infecção pelo HPV em pacientes com LIEBG e LIEAG foi de, respectivamente, 58,5% e 77,5%. Em contrapartida, um estudo realizado em Belém-PA observou uma detecção do DNA viral maior em pacientes com LIEBG (76,9%), quando comparada com a de participantes com LIEAG (66,7%). Da mesma forma, o resultado do presente trabalho apresenta prevalência da infecção ligeiramente maior em pacientes com LIEBG (92%) em relação às com LIEAG (88%)²⁵.

Destaca-se que a prevalência da infecção depende dos métodos de detecção do vírus. Além disso, quanto mais avançada estiver a lesão intraepitelial de colo uterino, menor a taxa de replicação do HPV e maior a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro. Isso dificulta a detecção do vírus, justificando a menor prevalência da infecção em LIEAG, quando comparadas às LIEBG, encontrada nesta pesquisa^{25,12}.

O subtipo mais comum nas pacientes com DNA de HPV positivo foi o 16 (37,78%), o que está de acordo com os resultados encontrados a partir do estudo POP Brasil²⁶, de 2020. No entanto, o segundo tipo mais detectado na presente análise foi HPV 58, diferindo do estudo em questão, no qual o tipo 52 ocupa o segundo lugar e o 58 ocupa o terceiro lugar na ordem dos HPV de alto risco.

Segundo o estudo de Vieira e colaboradores²⁷, dentre as infecções por HPV de alto risco, HPV 16 e HPV 59 foram os genótipos mais prevalentes. O presente estudo está de acordo com Vieira²⁷, que não detectou HPV 11 em nenhuma de suas amostras. Porém, é importante referir que Vieira²⁷ trabalhou com resultados que não estiveram envolvidos nesta pesquisa, como ASCUS, ASC-H e citologias normais.

Neste estudo, 8,89% das pacientes com DNA do HPV positivo estavam infectadas por dois tipos diferentes de HPV, o que representa a minoria dos resultados. Da mesma forma, os estudos de Vieira²⁷ mostraram que a maior parte (59%) da população analisada apresentava infecção única, ou seja, por apenas um tipo de HPV. Vieira²⁷ também observou que eram os genótipos de baixo risco os mais associados às infecções únicas. Todavia, tendo em vista que houve desproporção entre os tipos de HPV que foram analisados por nós – a expressiva maioria dos tipos representava HPV de alto risco –, esta comparação se torna inconcebível.

Em contrapartida, em um estudo realizado no Nordeste brasileiro²⁸ com 211 mulheres, a maioria (57,3%) das amostras manifestou infecção múltipla pelo HPV. Esta divergência de resultados pode se dever a diferenças no local da amostragem, visto que foram abordadas diferentes regiões do Brasil.

Os subtipos mais comuns nas pacientes que possuíam DNA de HPV positivo e lesão intraepitelial de baixo grau foram HPV 58 e HPV 16. Este resultado está parcialmente de acordo com os de Miranda e colaboradores²⁸, que identificaram principalmente os tipos 16, 31, 35 e 18 nas pacientes com lesão de baixo grau e infecção única.

Em estudo realizado por Chagas e outros autores²⁹ com mulheres do Nordeste brasileiro, o HPV 31 foi o mais frequente em LIEBG com infecção única, seguido por HPV 16. Este resultado não está de acordo com a presente análise: o subtipo 31 não foi detectado em nenhuma das amostras.

Os HPVs de alto risco são os mais prevalentes em LIEAG. Isso pode ser justificado pela maior capacidade desses tipos virais de causarem infecções persistentes e de levarem a alterações importantes nas células hospedeiras, fatores necessários à progressão das lesões intraepiteliais de colo uterino.³⁰⁻³¹

De acordo com Bruni et al³², uma revisão de literatura sobre a prevalência dos tipos de HPV no mundo, o papilomavírus humano mais prevalente em LIEAG foi o 16 (45,1%), seguido pelos tipos 52 (11%), 31 (10,4%) e 58 (8,1%). Em contrapartida, os tipos 6 e 11 foram encontrados em apenas 2,3% e 1,3% respectivamente.³²

Da mesma forma, o presente estudo teve como HPV mais prevalente em LIEAG o tipo 16 (50%). O tipo 58 (18%) foi o segundo mais detectado nestas lesões, e os tipos de baixo risco 6 e 11 não foram encontrados em nenhuma participante com LIEAG.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados coletados, conclui-se que a infecção pelo HPV é altamente prevalente em pacientes com lesões intraepiteliais escamosas, evidenciando a associação do vírus com o desenvolvimento do câncer do colo do útero. O DNA do vírus esteve presente na maioria esmagadora das pacientes que possuíam lesão pré-câncer de colo do útero, fosse esta LIEBG ou LIEAG. Além disso, os tipos de HPV mais prevalentes foram os de alto risco, especificamente os genótipos 16 e 58, enquanto os de baixo risco (6 e 11) não foram detectados em nenhuma das 50 amostras.

Por fim, ao comparar os genótipos de HPV presentes nas lesões de alto e baixo grau, percebeu-se que o tipo 58 foi o mais prevalente em LIEBG, enquanto o 16 foi o mais prevalente em LIEAG. Este último, inclusive, teve prevalência praticamente duplicada nas LIEAG em relação às LIEBG (50% e 26,09%, respectivamente). Analisando as 45 pacientes com DNA de HPV positivo, o HPV 16 foi o mais encontrado.

Diante desses achados, percebe-se a importância de medidas preventivas voltadas para a região amazônica que sejam pautadas na epidemiologia local, uma vez que o HPV 58 (segundo mais prevalente na região) não está contemplado na vacina quadrivalente contra o HPV. Além disso, a carência de estudos sobre a prevalência desse vírus nesta região dificulta o levantamento de achados epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Patologia Básica. 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 685-689.
2. Estimated number of new cases in 2020, cervix uteri, females, all ages [internet]. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2020. [citado em 2021 out. 16]. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=23&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1.
3. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Controle do câncer do colo do útero [internet]. Brasil: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva; 2020. [citado em 2021 out. 16]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/utero>.
4. Key Statistics for Cervical Cancer [internet]. Atlanta (EUA): American Cancer Society, 2021. [citado em 2021 out. 16]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/key-statistics.html>.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Estratégias para acelerar a eliminação do câncer cervical em mulheres vivendo com HIV. 2021, maio; v.52, (n.18): p. 11-16.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância de doenças transmissíveis. Coordenação geral do programa nacional de imunizações. Guia Prático sobre o HPV. Brasília: MS; 2014. 6 p.
7. Campos ACA. Aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção genital pelo Papilomavírus humano (HPV) em adolescentes da região metropolitana de Belém [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical; 2012.
8. Barros ALS, Lima DNO, Azevedo MD, Oliveira ML. Caderno de referência 1: Citopatologia Ginecológica. Brasília: Ministério da Saúde, Rio de Janeiro: CEPESC; 2012.
9. Carvalho NS, Silva RJC, Val IS, Bazzo ML, Silveira MF. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo papilomavírus humano (HPV). Epidemiol. Serv. Saúde. 2021; 30 (spe1): p. 1-10.
10. Zimmer MF, Tonet C, Mezzomo LC. Coilocitose. RBAC. 2020; 52(3):286-91
11. Cavalcanti SMB, Carestiato FN. infecções causadas pelos papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. J bras Doenças Sex Transm. 2006; 18(1): p. 73-79.

12. Marcolino LS. Análise de carga viral e estado físico do Papilomavírus Humano (HPV) e perfil de citocinas em mulheres com lesão intraepitelial cervical e carcinoma cervical invasor [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2015.
13. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Anatomia orientada para a clínica. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
14. Borley NR, Collins P, Crossman AR, Gatzoulis MA, Healy JC, Johnson D e outros. Gray's Anatomia: a Base Anatômica da Prática Clínica. 40a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
15. Netter, FH. Atlas of Human Anatomy. 7a ed. Philadelphia: Elsevier, 2019.
16. Ross MH, Pawlina W. Ross Histologia texto e atlas. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
17. Martins NV. Patologia do trato genital inferior: diagnóstico e tratamento. 2a ed. São Paulo: Roca, 2014.
18. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: definitions, criteria, and explanatory notes.. 3a th. Switzerland: Springer, 2015.
19. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Coordenação de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. 2a. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA; 2016.
20. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). HPV – vacina para imunossuprimidas até 45 anos [internet]. Brasil: Fundação Oswaldo Cruz; 2021. [citado em 07/09/2022]. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/2279-hpv-vacina-para-imunossuprimidas-ate-45-anos>.
21. Ministério da Saúde. Vacina HPV quadrivalente é ampliada para homens de até 45 anos com imunossupressão [internet]. Brasil: Ministério da Saúde; 2022. [citado em 07/09/2022]. Disponível em: <https://ww.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/julho/vacina-hpv-quadrivalente-e-ampliada-para-homens-de-ate-45-anos-com-imunossupressao>.
22. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Parâmetros técnicos para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: Inca; 2019.
23. FEBRASGO. Manual de Orientação Trato Genital Inferior e Colposcopia [internet]. São Paulo: FEBRASGO; 2010. cap.1. [citado em 2021 out. 16]. Disponível em: https://www.febrasgo.org.br/images/arquivos/manuais/Manual_de_Patologia_do_Trato_Genital_Inferior/Manual-PTGI-Cap-01-Colposcopia.pdf.

24. Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MGF, Fernandes TAAM, Azevedo RPM, Villa LL. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2009 jan. 120 (1): p 21-24.
25. Monteiro JC, Fonseca RRdS, Ferreira TCdS, Rodrigues LLS, da Silva ARB, Gomes ST et al. Prevalence of High Risk HPV in HIV-Infected Women From Belém, Pará, Amazon Region of Brazil: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Public Health*, 2021 apr. 9(649152). p. 1-8.
26. Wendland EM, Villa LL, Unger ER, Domingues CM, Benzaken AS, POP-Brazil Study Group. Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. *Sci Rep* [internet]. 2020 março [citado em 2021 out. 16]; 10(4920). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61582-2>.
27. Vieira RC, Monteiro JSV, Manso EP, Santos MRM, Tsutsumi MY, Ishikawa EAY, et al. Prevalence of type-specific HPV among female university students from northern Brazil. *Infect Agents Cancer* [internet]. 2015 julho [citado em 2021 out. 16]; 10(21). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0017-x>.
28. Miranda PJC, Chagas BS, Coêlho MRCD, Silva Neto JDC. Correlation between human papillomavirus infection and histopathological diagnosis of women in Northeast Brazil. *J Med Virol* [internet]. 2020 mai. 30 [citado em 2021 out. 16]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32989777/>.
29. Chagas BS, Comar M, Gurgel APAD, Paiva S, Seraceni S, de Freitas AC, et al. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. *PLoS One* [internet]. 2015 jul. 15 [citado em 2021 out. 16]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26176537/>.
30. Cruz FJ, Melo VH. Fatores associados à persistência da infecção pelo HPV na cérvix uterina. *Femina*, 2010 ago. 38 (8). p. 423-427.
31. Sanjosé S, Brotons M, Pavon MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2017 feb. 47: 2-12. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015
32. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). *Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2 February 2022*. [Accessed in 20/03/2022].

APÊNDICE A
FICHA CLÍNICA

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

Projeto de Pesquisa de Doutorado: “Resposta imunológica inflamatória tecidual associada ao HPV (Papilomavírus Humano) em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino”

- 1- Id do bloco no laboratório _____
- 2 - Pedido: _____ 3 – Nº do Histopatológico _____
- 4 – Iniciais do Paciente: _____
- 5- Idade: _____ 6 - Data de Nascimento: _____
- 7 – Data da Coleta: _____
- 8- Descrições macroscópicas _____
- 9- Dimensões da lesão: _____
- 10- Diagnóstico clínico das lesões: _____
- 11 - Diagnóstico histopatológico: _____
- 12- Lesão Intraepitelial Cervical () LSIL (NIC I) () HSIL (NIC II) () HSIL (NIC III) () Câncer
- 13 – Fez CAF: () sim () não

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resposta imunológica inflamatória tecidual associada ao Papilomavírus Humano (HPV) em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino

O HPV é considerado o vírus causador do câncer de colo uterino. Em mais de 99% dos casos de câncer de colo uterino, ele está presente. A Sr^a está sendo convidada para participar desta pesquisa porque apresentava uma lesão que foi removida para exame. No nosso estudo queremos saber se as mulheres com essas lesões estão infectadas pelo HPV ou não e como o sistema de defesa do corpo está atuando nessas lesões.

O objetivo deste trabalho é estudar as defesas do corpo e sua relação com as lesões que ocorrem no colo do útero, quando está infectado pelo HPV.

A participação nesta pesquisa é voluntária e constará de dois procedimentos laboratoriais na lesão que você removeu no exame para confirmar a ausência ou presença do vírus, e para avaliar a defesa do corpo sobre a lesão. Sua lesão poderá ser fotografada nesta ocasião, porém sem identificá-la, por isso você não sofrerá risco físico e psicológico, já que o material já está previamente colhido durante o exame e você não será identificada. Sua participação não trará qualquer benefício direto, mas proporcionará um melhor conhecimento sobre a relação do vírus, as defesas do corpo e as lesões intraepiteliais cervicais.

Você terá a garantia de que as informações obtidas serão analisadas com a preocupação de evitar a identificação de qualquer um dos participantes da pesquisa. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Você também tem o direito de ser mantido informado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso solicite terá todas as informações disponíveis a qualquer momento.

Não existirão despesas ou compensações pessoais para os participantes da pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Comprometo-me a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados em artigos científicos de revistas especializadas ou

encontros científicos e congressos, sem nunca identificar os participantes. Qualquer informação ou esclarecimentos podem ser adquiridos no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanas do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, situado na Av. Generalíssimo Deodoro, 92, bairro: Umarizal, nos telefones: 3241-4681, 3201-0954, ou com o pesquisador responsável pelo projeto: Elcimara da Paixão Ferreira Chagas no telefone: 981136960.

Abaixo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

Consentimento livre e esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o trabalho **“Resposta imunológica inflamatória tecidual associada ao Papilomavírus Humano (HPV) em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino”**. Eu discuti com os pesquisadores sobre minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos constantes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Belém ____/____/____

Nome: _____

Documento de identidade: _____ Telefone: _____

Endereço: _____

Assinatura do paciente ou responsável legal: _____

Pesquisadora: MsC. Elcimara da Paixão Ferreira Chagas

Endereços para contato: Núcleo de Medicina Tropical – Laboratório
Imunopatologia

Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92 – Umarizal, Telefones: 3241-4681, 3201-0954.

ANEXO A
CONSENTIMENTO DO LABORATÓRIO PAULO AZEVEDO PARA O USO DAS
AMOSTRAS



LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLINICA DR PAULO C. AZEVEDO LTDA

CNPJ: 04.978.805/0001-65

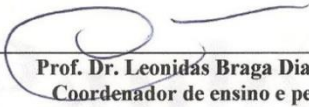
www.pazevedo.com.br

DECLARAÇÃO

Declaro em nome do **Laboratório Paulo C. Azevedo** ter conhecimento do projeto de pesquisa intitulado "**Resposta imunológica e inflamatória em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino**" de autoria de Elcimara da Paixão Chagas, dando-lhe consentimento para realizar o trabalho nesta Entidade e coletar dados em nosso serviço durante o período preestabelecido pelo cronograma.

Estou também ciente e concordo com a publicação dos resultados encontrados.

Belém - Pará, 03 de setembro de 2014.

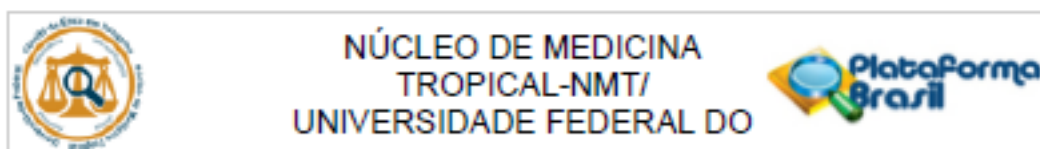


Prof. Dr. Leonidas Braga Dias Junior
Coordenador de ensino e pesquisa
Assinatura e carimbo

Matriz: Av. Braz de Aguiar, nº 99, Tel. (91) 4009-8899 Fax. (91) 3219-9404
Emails: atendimento@pazevedo.com.br – comercial@pazevedo.com.br

ANEXO B

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RESPOSTA IMUNOLÓGICA INFLAMATÓRIA TECIDUAL ASSOCIADA AO HPV (PAPILOMAVÍRUS HUMANO) EM LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS NO COLO UTERINO

Pesquisador: Eicimara da Paixão Ferreira Chagas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37237614.0.0000.5172

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 865.257

Data da Relatoria: 28/10/2014

Apresentação do Projeto:

Este projeto visa avaliar a resposta imunológica inflamatória tecidual associada ao HPV em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino. As lesões do colo do útero se constituem em um importante problema de saúde pública. São fases de transição neoplásica, que progridem de baixo grau para alto grau, posteriormente para o carcinoma in situ e o carcinoma escamoso invasivo do colo uterino. O principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e do câncer do colo do útero é a infecção pelo papilomavírus humano. A progressão tumoral, desde a infecção pelo HPV até o desenvolvimento de lesão maligna, está sujeita a outros fatores, como a resposta imunológica. Muitos estudos sobre a resposta imunológica foram desenvolvidos para elucidar os mecanismos envolvidos. Porém ainda há lacunas, principalmente com relação à resposta inata. As evidências demonstradas por um grande número de estudos sugerem que a transformação maligna envolve a perda da inibição de citocinas, estudos com marcadores para as citocinas envolvidas na resposta imunológica ao HPV oferecem um conhecimento melhor do que constitui uma resposta efetiva do hospedeiro contra a infecção, assim como quais deficiências nesta resposta estariam associadas à persistência do vírus e ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas. O objetivo geral é de Avaliação da resposta imunológica inflamatória tecidual em lesões intraepiteliais de baixo e alto grau de colo uterino associadas a presença/ausência do

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92

Bairro: Umarizal

UF: PA

Município: BELEM

CEP: 66.055-240

Telefone: (91)3201-0961

E-mail: cepbel@ufpa.br



NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 865.257

Papilomavirus Humano. As amostras serão de blocos parafinados de pacientes do Laboratório Paulo Azevedo, e serão realizados cortes histológicos em microtubos estéril de 1,5l para extração de DNA, Repli-g, PCR para detecção do HPV, e PCR em tempo real para subtipagem do HPV com 9 sondas específicas para os subtipos 6, 11, 16, 18, 31,33, 35, 52 e 58. Cortes histológicos em lâminas silanizadas serão realizados nas amostras, para a detecção dos antígenos específicos para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas diferentemente expressas em diferentes partes dos tecidos biológicos. Os dados serão armazenados em planilhas e analisados no Bioestat 5.2 e Epi Info e o gráficos gerados através do Graph Pad Prism 5.0.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterização da resposta Imunológica Inflamatória tecidual em lesões Intraepiteliais de baixo e alto grau de colo uterino infectadas e não infectadas pelo HPV.

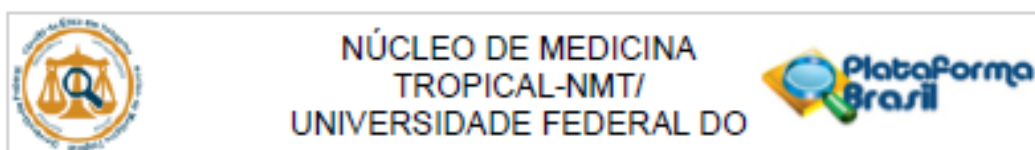
Objetivo Secundário:

- Determinar a prevalência da infecção genital por HPV e seus subtipos em lesões Intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau e câncer;
- Quantificar através de Imunistoquímica IFN, IFN, IFN, TGF, TNF, IL-2, IL-8, IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-12, IL-6, IL-22, IL-17 em amostras com lesões pré-malignas e malignas do colo uterino,
- Quantificar através de Imunistoquímica as defensinas, HBD1, HBD2 e HBD3 e E-Caderina em lesões Intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau e câncer;
- Quantificar as células dendríticas, e células de Langerhans através do marcadores S100,CD207, CD1a.
- Quantificar a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), o antígeno associado a função de linfócito 1 (LFA-1), o FOXP3, T-bet e GATA-3, ROR, CD206, CD40, CD95, CD207, CD57, CD4, CD8,CD45, CD3, CD68.
- Correlacionar os achados na expressão dos marcadores com a presença de HPV em lesões Intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau e câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos foram bem avaliados pelos proponentes da pesquisa, como sendo mínimos para as pacientes envolvidas, como segue:

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92	
Bairro: Umarizal	CEP: 66.055-240
UF: PA	Município: BELEM
Telefone: (91)3201-0961	E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Parecer: 065.257

Serão mínimos os riscos físicos decorrentes da coleta de material biológico, pois o material será de biópsias armazenadas no laboratório, sem necessidade de coleta de material. Será usado materiais descartáveis e a coleta será realizada por médicos experientes, utilização de dados exclusivamente para esta pesquisa, e o comprometimento com o sigilo das informações obtidas serão os procedimentos adotados para minimização dos riscos.

Os benefícios foram igualmente bem avaliados como segue:

Os benefícios proporcionados às pacientes são a possibilidade do diagnóstico precoce de possíveis lesões precursoras de câncer do colo do útero, bem como a detecção do vírus HPV, tipagem, classificação em grupo de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58) ou baixo risco (6 e 11), a avaliação da resposta imunológica do paciente às lesões.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto sem problemas éticos em relação aos sujeitos envolvidos ou às abordagens e técnicas propostas. É factível, com orçamento adequado e realista, bem como cronograma ajustado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto foi apresentada, assinada e carimbada.

O TCLE foi apresentado, em linguagem clara, contendo o telefone e endereço do CEP e da pesquisadora responsável.

A carta de anuência do Laboratório Paulo Azevedo foi apresentada.

O questionário a ser aplicado foi apresentado e não apresenta questões éticas.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92

Bairro: Umarizal

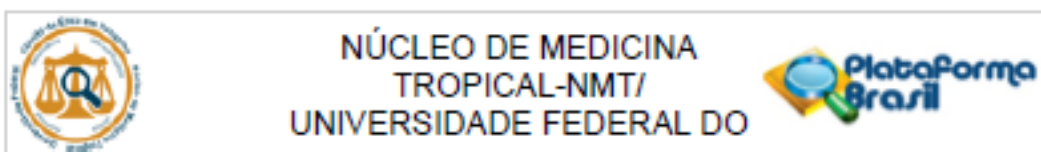
UF: PA

Telefone: (01)3201-0961

Município: BELEM

CEP: 66.055-240

E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Parecer: 065.257

Considerações Finais a critério do CEP:

BELEM, 10 de Novembro de 2014

Assinado por:
ANDERSON RAIOL RODRIGUES
(Coordenador)

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-0961 E-mail: cepbel@ufpa.br