



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

CARINA DE ABREU ELIAS
RAFAEL MIRANDA PANTOJA BAIA

**DETECÇÃO DOS SUBTIPOS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM LESÕES
PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO UTERINO EM MULHERES JOVENS**

BELÉM-PA
2020

CARINA DE ABREU ELIAS
RAFAEL MIRANDA PANTOJA BAIA

**DETECÇÃO DOS SUBTIPOS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM LESÕES
PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO UTERINO EM MULHERES JOVENS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Centro Universitário do Estado do Pará,
como requisito parcial para a conclusão da
graduação em Medicina.

Orientador (a): prof. Doutora Elcimara da
Paixão Chagas

BELÉM-PA

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca do CESUPA, Belém – PA

Elias, Carina de Abreu.

Detecção dos subtipos do papilomavírus humano em lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens / Carina de Abreu Elias, Rafael Miranda Pantoja Baia; orientadora Elcimara da Paixão Chagas. – 2020.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro Universitário do Estado do Pará, Medicina, Belém, 2020.

1. Papilomavírus. 2. HPV (Vírus). 3. Colo uterino - Câncer. I. Baia, Rafael Miranda Pantoja. II. Chagas, Elcimara da Paixão, orient. III. Título.

616.99465

CDD 23^a ed.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que me apoiaram nesta jornada, a Deus, pelo consolo e por me permitir realizar este sonho, e à minha orientadora, por sua paciência e oportunidade de tanto aprendizado.

AGRADECIMENTO

Não foi fácil chegar até aqui. A caminhada acadêmica certamente possui muitos percalços e entraves, devendo ser realizada com muita paciência e perseverança. Diversas foram as vezes que pensamos em desistir, porém, pessoas maravilhosas nos ajudaram a trilhar esse caminho.

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir viver este sonho, por me dar forças para continuar e nunca desistir.

Agradeço a minha mãe, Sônia Abreu da Silva Elias, por me proporcionar este sonho de infância, pela paciência, pelo apoio e carinho que com certeza foram fundamentais para a minha persistência.

Agradeço ao meu pai, Márcio André de Paiva Elias, que não está presente em vida, mas sempre no meu coração. Tenho certeza de que está muito orgulhoso, olhando lá dos altos.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Elcimara da Paixão Chagas, pela oportunidade de aprender sempre, pelos conselhos, por se tornar uma amiga. Sou grata a Deus por tê-la colocado em nossos caminhos.

Por fim, não menos importante, aos meus filhos do coração: Nicole, minha cadelinha, e Jorginho, meu hamster, que muito me distraíam em momentos de tensão. Não posso me queixar da falta de um amigo se tenho vocês.

A todos vocês, minha eterna gratidão!

“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.” – William Shakespere

RESUMO

Introdução: O câncer do colo uterino é o terceiro tipo de neoplasia mais prevalente no Brasil e o primeiro no Estado do Pará. É causado pelo Papilomavírus humano (HPV), que possui mais de 200 subtipos, sendo sua lesão precursora do câncer diferenciada em baixo e alto grau. **Objetivo:** detectar os subtipos de HPV mais prevalentes em lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens.

Método: As amostras são oriundas de um laboratório de referência de Belém e consta de 27 biópsias de pacientes, que tiveram PCR positivo para HPV, divididas em 3 grupos, sendo 9 amostras de pacientes com lesão intraepitelial de baixo grau; 3 amostras de lesão intraepitelial de alto grau; e 7 amostras com cervicite utilizadas como grupo controle. As amostras tiveram o DNA isolado com kit de extração de DNA para bloco parafinado. Foram realizadas nested-PCR para detecção da presença do DNA-HPV, e as amostras positivas foram submetidas a PCR em tempo real para 7 sondas dos seguintes subtipos virais: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58. **Resultado:** das 27 amostras, 19 amostras estavam DNA HPV positiva. A prevalência de LIEBG foi superior a de LIEAG. O subtipo de HPV mais prevalente foi o HPV 16, totalizando 3 amostras. Não foram encontrados DNA HPV 18, 31, 58 e 11 em nenhuma das amostras. **Conclusão:** A prevalência de HPV em mulheres jovens foi de 70,3%. Nas mulheres com cervicite, a prevalência foi de 58,3%, em LIEBG foi de 81,8% e em LIEAG de 75%. O subtipo mais prevalente de HPV foi o 16, com 15,7% do total das amostras. Em relação à cervicite, os subtipos mais prevalentes foram HPV 33 e HPV 52. Em LIEBG não houve detecção de nenhum subtipo testado nas amostras. Em LIEAG o subtipo mais prevalente foi HPV 16, seguido do HPV 35.

Palavras chave: Papilomavírus Humano; Prevalência; Colo uterino.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the third most prevalent type of cancer in Brazil and the first in the State of Pará. It is caused by HPV, which has more than 200 subtypes, and its precursor lesion is differentiated into low and high grade. **Objective:** to detect the most prevalent HPV subtypes in precursor lesions of cervical cancer in young women. **Method:** The samples come from a reference laboratory in Belém and consist of 27 biopsies of patients, who had positive PCR for HPV, divided into 3 groups, with 9 samples from patients with low-grade intraepithelial lesions, 3 samples from high-grade intraepithelial lesions and 7 samples with cervicitis used as a control group. The samples had the DNA isolated with a DNA extraction kit for paraffined block. Nested-PCR were performed to detect the presence of HPV DNA, and positive samples were subjected to real-time PCR for 7 probes of the following viral subtypes: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 and 58. **Result:** A total of 19 samples were HPV DNA positive. The prevalence of LIEBG was higher than that of LIEAG. The most prevalent HPV subtype was HPV 16, with a total of 3 samples in relation to the total subtypes. No HPV DNA 18, 31, 58 and 11 were found in any of the samples. **Conclusion:** The prevalence of HPV in young women was 70,3%. In women with cervicitis, the prevalence was 58,3%, in LIEBG it was 81,8% and in LIEAG 75%. The most prevalent HPV subtype was 16, with 15.7% of the total samples. Regarding cervicitis, the most prevalent subtypes were HPV 33 and HPV 52. In LIEBG there was no detection of any subtype tested in the samples. In LIEAG the most prevalent subtype was HPV 16, followed by HPV 35. **Keywords:** Human Papillomavirus; Prevalence; Uterine lap.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA – Câncer

HPV – Papilomavírus humano

P53 – Proteína 53

NIC – Neoplasia intraepitelial cervical

CCU – Câncer do colo uterino

MS – Ministério da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction)

dNTPS – Desoxirribonucleico trifosfato

INCA – Instituto Nacional do Câncer

TBE 1X – Trisborato - EDTA

pB – Pares de bases

LIEBG – Lesão intraepitelial de baixo grau

LIEAG – Lesão intraepitelial de alto grau

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos.....	14
3	MÉTODOS	15
3.1	Critérios de inclusão	15
3.2	Critérios de exclusão.....	15
3.3	Métodos moleculares de pesquisa do HPV	16
3.4	Extração de DNA pelo kit QIAamp® DNA FFPE Tissue kit da Qiagen: ...	16
3.5	Amplificação da amostra através do kit REPLI-g® da QIAGEN	17
3.6	Qualidade da amostra de DNA por PCR de β -globina.....	17
3.7	Preparo do gel de agarose a 1% p/v.....	18
3.8	Aplicação da amostra.....	18
3.9	Corrida eletroforética	18
3.10	Detecção e tipagem de HPV.....	18
3.11	PCR para detecção do HPV.....	18
3.12	PCR com MY9/11	19
3.13	PCR com GP5/6.....	19
3.14	qPCR ou PCR em tempo real – Para Tipagem do HPV	20
4	RESULTADOS.....	21
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	26
	REFERÊNCIAS.....	27
	APÊNDICE A	11
	APÊNDICE B	14
	ANEXO A	15
	ANEXO B	19

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino (CCU) é um problema de saúde pública mundial, sendo a quarta causa mais comum de câncer e, de acordo com as estimativas GLOBOCAN¹, levou a taxas estimadas de 310 mil óbitos de mulheres em 2018^{1,2}. No Brasil, este tipo de câncer (CA) é o segundo tipo mais incidente na região Norte, sendo a taxa de incidência equivalente ao do câncer de mama, sem considerar o CA de pele não melanoma. Em 2020, as estimativas são de 16.590 casos novos no Brasil, sendo 780 casos novos no Estado do Pará, e estima-se, com base em dados de 2017, 6.385 óbitos no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)³ do ano de 2020.

O agente etiológico do CCU é o Papilomavirus humano (HPV), um vírus da família Papillomaviridae, de formato icosaédrico, não envelopado, com DNA de fita dupla e circular⁴. Existem mais de 200 tipos de HPV, classificados de acordo com o seu potencial oncogênico, sendo que aproximadamente 40 infectam a região anogenital^{4,5}.

A família *Papillomaviridae* é constituída por vírus pequenos, com DNA de fita dupla e subdividida em duas subfamílias: *Firstpapillomavirinae* e *Secondpapillomavirinae*. Na subfamília *Firstpapillomavirinae*, há gêneros que infectam a espécie humana, como o *Alphapapillomavirus*, que engloba as espécies *Alphapapillomavirus 7* e *Alphapapillomavirus 9*. Nesse último estão contidos os vírus de nome HPV (Papillomavirus Humano) -16, -32, -35 e -52 e naquele, os vírus HPV-18,-45, os quais são considerados os principais subtipos de risco para o Câncer de Colo Uterino⁴.

O HPV produz pelo menos 5 proteínas, E1, E2, E4, L1 e L2, no entanto, a maioria deles também produz as proteínas E5, E6 e E7, envolvidas no crescimento celular⁶. A patogenia do HPV está relacionada com a transcrição das proteínas E1, E2, E6, E7^{4,7,8}. A proteína E6 forma um complexo, por meio da Proteína associada a E6 (E6-AP), com a Proteína 53(p53), inativando-a, resultando na perda da capacidade de apoptose em resposta a danos no DNA^{7,8}. A proteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRB), e essa interação libera fatores de transcrição que permitem a estimulação do crescimento celular. Por essas ações, E6 e E7 são denominadas oncoproteínas⁹. Há indícios que as proteínas E6 e E7 eram uma única proteína e que por meio de mutações, separaram-se e exercem funções complementares⁶.

A principal forma de infecção pelo HPV ocorre através da lesão da membrana basal das células epiteliais do hospedeiro por meio de microtraumas que possam ocorrer durante o ato sexual^{4,10}. O papilomavírus pode permanecer no seu hospedeiro por longos períodos de vida e até mesmo sofrer “*clearance*” (clareamento) viral pelo sistema imune ou induzir a duplicação celular nas camadas mais superficiais, liberando mais partículas virais^{5,10}.

A geração de neoplasias está associada à perda da regulação das oncoproteínas do HPV, a qual ocorre em infecções persistentes, principalmente com tipos de alto risco oncogênico. Com a persistência da infecção, o vírus acaba por se integrar no genoma da célula hospedeira^{11,12}. Quando isso acontece, há a ruptura do gene E2, o qual é responsável por controlar a expressão de E6 e E7. Com isso, há a desregulação da expressão de E6 e E7, assim a célula entra em ciclo celular e sem o controle dado por p53, aumentam as chances de haver erros no DNA, levando a carcinogênese^{13,14}.

As lesões do colo do útero constituem um importante problema de saúde pública^{15,16}. As Lesões Intraepiteliais Cervicais 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^{15,16}.

Microscopicamente, verifica-se que, inicialmente, as lesões caracterizam-se por apresentar atipia celular e graus variados de displasia ou neoplasia intraepitelial cervical antes da progressão ao CA invasivo¹⁷. As lesões intraepiteliais cervicais são possíveis de regressão espontânea ou podem ser tratadas ambulatorialmente, inclusive com intervenções cirúrgicas mais simples, se necessário^{18,19}.

Essas lesões têm como características morfológicas a coilocitose, o pleomorfismo celular, núcleo hiper cromático e a cromatina densa²⁰. As lesões pelo HPV podem ser diferenciadas em baixo grau (quando a camada de células imaturas atípicas está confinada em até 1/3 da altura do epitélio, contada a partir da camada de células basais normais) e alto grau (quando possuem mais de 1/3 de alterações)²⁰. As lesões de alto grau podem ocorrer pela evolução de uma lesão prévia de baixo grau ou pela aquisição de uma lesão de alto grau²⁰.

As lesões são precursoras do câncer do colo uterino e ocorrem quando a doença atravessa a membrana basal e converte-se em neoplasia invasiva, estendendo-se aos órgãos adjacentes. A invasão pode atingir o sangue e vasos

linfáticos e, assim, a doença se dissemina aos gânglios linfáticos e órgãos à distância^{15,18}.

O CCU é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância²⁰. Há duas principais categorias de carcinomas invasores do colo do útero, dependendo da origem do epitélio comprometido: o carcinoma epidermóide ou escamoso, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso, que produz células com diferenciação escamosa, (representa cerca de 80% dos casos), e o adenocarcinoma, tipo mais raro e que acomete o epitélio glandular, produzindo células com diferenciação glandular (10% dos casos)²¹.

O vírus do HPV é altamente prevalente na população, com números aproximados em quase 300 milhões. Esta infecção é a mais frequente em jovens, estando o pico na faixa etária entre 20 e 24 anos¹⁶. A maior parte dessas infecções é assintomática, porém as que desenvolvem lesões regridem espontaneamente entre 12 a 18 meses, com eliminação do vírus por mecanismos imunológicos. Cerca de 10% das mulheres não apresentam clareamento, o que torna a infecção persistente e isso é um grande fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino, pois este vírus é o agente etiológico deste câncer (CA)¹⁶.

O rastreamento do HPV é feito, segundo o Ministério da Saúde (MS), em mulheres com vida sexual iniciada entre 25 a 64 anos, anualmente, através da colpocitologia oncótica¹⁹. Após a coleta de dois exames anuais consecutivos normais, deve ser realizado novo exame a cada 3 anos. Após os 64 anos não deve ser mais realizado¹⁹.

O desenvolvimento do câncer do colo uterino é progressivo e demora cerca de 10 anos para se estabelecer, sendo reversível quando em estágios iniciais das lesões⁵. Assim, o rastreio em mulheres jovens da presença do HPV é um parâmetro norteador para evitar o desenvolvimento do câncer do colo uterino.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar dos subtipos de HPV mais prevalentes em lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens.

2.2 Específicos

Identificar a prevalência de HPV em lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens.

Determinar os subtipos de HPV em mulheres jovens.

Comparar as lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens com os subtipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico.

3 MÉTODOS

Foram incluídas neste estudo amostras de pacientes que apresentaram lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas na colposcopia e/ou citopatologia com biópsia colhida, oriundas do Laboratório Paulo Azevedo, que atende pacientes de toda a região metropolitana de Belém. A coleta de dados foi prospectiva, e os dados das pacientes foram recolhidos, conforme protocolo, após o material ter sido coletado para análise histopatológica e observação de lesões e seus graus, realizadas no próprio laboratório. Todas as pacientes foram esclarecidas e consultadas previamente sobre o uso do material biológico.

Os espécimes coletados foram provenientes de biópsias de colo uterino já devidamente armazenados em solução de formalina 10% tamponada. Em seguida, as amostras foram submetidas à avaliação macroscópica, processadas em histotécnico e incluídas em blocos parafinados, ainda no setor de Patologia do Laboratório Paulo Azevedo, onde tiveram os laudos histopatológicos analisados. 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 em microtubos de 1,5 para extração de DNA e detecção do DNA do HPV, utilizando a técnica de biologia molecular.

Vinte e sete biópsias foram coletadas e divididas em 3 grupos distintos, conforme o resultado do exame histopatológico liberado pelo laboratório positivas para DNA HPV. Essas amostras foram classificadas da seguinte forma: 7 amostras de paciente com Cervicite, 9 amostras de pacientes com lesão intraepitelial de baixo grau, 3 amostras de lesão intraepitelial cervical de alto grau, de mulheres com a faixa etária de 18 anos até 24 anos.

3.1 Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão: mulheres maiores de 18 anos e menores de 24 anos, com vida sexual iniciada, que apresentaram, cervicite ou lesão intraepitelial cervical de baixo ou alto grau ou câncer, e que tinham suas biópsias cadastradas no Laboratório Paulo Azevedo.

3.2 Critérios de exclusão

A não observância de um dos critérios acima implicou na exclusão do indivíduo da pesquisa, bem como pacientes menores de 18 anos ou maiores de 24 anos; que não fossem do gênero feminino; sem vida sexual iniciada; que não apresentaram

cervicite ou lesão intraepitelial cervical ou câncer, e com biópsias externas ao Laboratório Paulo Azevedo.

3.3 Métodos moleculares de pesquisa do 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 as amostras foram submetidas à reação com o kit REPLI-g (Qiagen).

3.4 Extração de 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 vórtex 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 vórtex com centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos em 20°C. Outra remoção do sobrenadante por pipetagem foi realizada, seguida de incubação à 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 vórtex, 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 a 1 minuto por 15°C por 11.000 rpm.

Em seguida foi colocado 200 µL *buffer* AL e o microtubo levado ao vórtex. Após, foi efetuada a adição de 200 µL de etanol e procedida agitação no vórtex e rápida centrifugação. O conteúdo do microtubo foi transferido para a coluna e centrifugado a 1 minuto por 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 foi 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 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 µL de *stop solution* e 4,25 µL de água cada reação.

Em microtubo de 1,5 ou 0,5 mL foram colocados 2,5 µL de DNA e 2,5 µL de *buffer* D1, com agitação no vórtex e centrifugação rápida. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos, e 5,0 µL de *buffer* N1 adicionado na amostra com agitação no vórtex e centrifugação rápida.

A seguir ocorreu o preparo do Master Mix, usando 29 µL de *buffer reaction*, 1 µL de DNA polimerase e 10 µL de água para cada reação. 40 µL do Master Mix foram adicionados em 10 µL 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 *Polimerase Chain Reaction*) utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificou 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 µl. Para isso foram adicionados 2 µl de solução tampão (10X) a um microtubo de 0,2 ml; 0,8 µl de Cloreto de Magnésio a 50 mM; 0,8 µl de Desoxirribonucleotídeo Trifosfato (dNTPs) a 10 mM; 0,8 µl de Oligonucleotídeo Iniciador 5' - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3' 10 µM e Oligonucleotídeo Iniciador reverso 5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC- 3' 10 µM; 0,15 µl de *Taq Polimerase* 5U/µl ; 14,45 µl de água destilada/deionizada. Logo em seguida, 1 µl da amostra de DNA extraído.

As reações ocorreram no termociclador (Eppendorf) onde foram submetidas à seguinte ciclagem: primeiro, um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos. Em seguida, 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.

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

Em um *becker*, foram adicionado 1 grama de agarose e 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 colocados pentes para a formação de poços. Uma vez geleificado, o gel foi colocado na cuba de eletroforese contendo TBE (1X).

3.8 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.

3.9 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 essa 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 apresentou 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 à presença de DNA nas amostras extraídas, foram realizadas as PCRs para detecção do DNA de HPV.

3.10 Detecção e tipagem de HPV

Para pesquisa de HPV foram utilizados 2 procedimentos de PCR: o primeiro para a detecção, constando de duas etapas, e as amostras positivas seguiram para uma segunda técnica de PCR para a tipagem de 9 subtipos virais que são: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58. Para cada tipo de HPV existe uma sonda específica na detecção dos subtipos virais.

3.11 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.

3.12 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 à 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.

3.13 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 utilizada 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´). Depois 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, as quais foram submetidas à eletroforese (Procedimento similar ao explicado anteriormente). Foram consideradas positivas as amostras que o produto da PCR apresentou uma banda de 150 pb à visualização sob luz ultravioleta.

3.14 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 subtipos de baixo risco (HPV 6 e 11) e de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 52, e 58), totalizando 9 subtipos. Para cada amostra foram utilizados 0,1 µg de DNA; 200 nM de cada oligo iniciador; 0,1 µL de ROX Dye; 10 µL de tampão de reação e água Milli Q autoclavada qsp 20 µL. Foram executados 40 ciclos de 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.

4 RESULTADOS

Das 27 pacientes (n=27) atendidas no laboratório Paulo Azevedo que tiveram seus dados coletados e DNA extraídos, 12 apresentavam cervicite, 11 apresentavam lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) e 4 apresentavam lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG). Foram positivos 19 pacientes para DNA HPV e negativos 8 pacientes para DNA HPV. A prevalência na amostra de DNA HPV positivo foi de 70,37% e de HPV negativo foi 29,63%. (Quadro 1).

Quadro 1 – Resultado do PCR nas mulheres

	N	n		
		DNA HPV +	DNA HPV -	Frequência (%) DNA HPV +
Cervicite	12	7	5	58,3
LIEBG	11	9	2	81,8
LIEAG	4	3	1	75,0
Total	27	19	8	70,3

Fonte: protocolo de pesquisa

Dentre os pacientes que apresentavam DNA HPV positivo, 7 tiveram o diagnóstico histológico de cervicite, 9 de LIEBG e 3 de LIEAG. Já nas amostras histológicas das pacientes com DNA HPV negativo, 5 possuíam cervicite, 2 possuíam LIEBG e 1 possuía LIEAG (Quadro1).

Nas amostras das pacientes que apresentavam cervicite com DNA HPV positivo, foram encontrados 1 paciente com HPV 16, 2 pacientes com HPV 33, 1 paciente com HPV 35, 2 pacientes com HPV 52 e 1 paciente com HPV 6. Não foram encontrados nessas amostras HPV 18, 31, 58 e 11 (Quadro 2).

Quadro 2 – Subtipos de HPV encontrado nas pacientes

	N	n								
		HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35	HPV 52	HPV 58	HPV 6	HPV 11
Cervicite	7	1	0	0	2	1	2	0	1	0
LIEBG	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIEAG	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	19	3	0	0	2	2	2	0	1	0

Fonte: protocolo de pesquisa

Dentre as pacientes com LIEBG DNA HPV positivas, nenhum dos subtipos de HPV pesquisados foram encontrados. Já nas pacientes com LIEAG DNA HPV positivas, foram encontradas duas amostras com HPV 16 e 1 com HPV 35, não sendo encontrados HPV 18, 31, 33, 52, 58, 6 e 11 (Quadro 2).

Do total de DNA HPV obtido nas análises, 3 possuíam HPV 16, 2 possuíam HPV 33, 2 possuíam HPV 35, 2 possuíam HPV 52 e 1 possuía HPV 6. Não foram encontrados DNA HPV 18, 31, 58 e 11 (Quadro 2).

5 DISCUSSÃO

A infecção genital pelo HPV é a DST mais comum em todo o mundo. Esse vírus é considerado o agente etiológico do câncer de colo uterino, porém, apenas uma pequena porcentagem das mulheres infectadas desenvolve este câncer^{3,5,9}. Isso ocorre porque o HPV não é suficiente, havendo a necessidade da associação de outros fatores de risco, principalmente a persistência da infecção^{2,3,5,9}.

Um estudo realizado por Cavalcante²² avaliou que a prevalência de biópsias com cervicite como minoria, que constituíram 9,26% das amostras de mulheres do estado do Ceará. Esse estudo contrasta com os dados do presente trabalho, que evidenciam citologia de cervicite em quase 44,4% da amostra. As discrepâncias os percentuais de prevalência ocorreram provavelmente pela população de estudos realizados em Estados diferentes: Pará e Ceará. Porém, o estudo realizado por Silva²³ mostra que 86,3% das alterações celulares ao exame citopatológico foi de inflamação, concordando com os dados analisados neste trabalho.

A prevalência de LIEBG foi superior a de LIEAG em relação ao total das amostras no presente estudo, entrando em consenso com estudos realizados por Rama²⁴ e Silva²³, porém indo de encontro com estudos realizados por Pitta²⁵, os quais demonstraram prevalência de 70,8% de LIEAG nos diagnósticos histológicos realizados. Acreditamos que o principal motivo para discordância foi o fato da amostra utilizada por Pitta ter resultado de colpocitologia oncótica ou colposcopia sugestiva de lesão de alto grau ou lesão de baixo grau persistente.

Observa-se uma prevalência de 70,37% de DNA HPV positivo, indicando um predomínio da infecção em mulheres de 18 a 24 anos, supondo-se uma introdução mais precoce das mulheres na atividade sexual segundo Pinto²⁶. Tal estudo revela que a maior infecção de mulheres jovens pelo HPV deve-se a maior rotatividade de parceiros, uso irregular de métodos contraceptivos de barreira e atividade sexual mais intensa nessa faixa etária²⁶. Além disso, em um estudo com amostra mais recente, coletada de janeiro a outubro de 2017, a prevalência geral de infecção pelo HPV em Belém foi de 50,8% (estudo pop-brasil), concordando com o presente trabalho. Nesse estudo, acreditamos que a prevalência mais baixa que o nosso seja por causa da vacinação implementada pelo PNI em 2014²⁷. Entretanto, a prevalência aumentada se contrapõe ao estudo de Santos²⁸, o qual analisa que apenas 28,4% de suas amostras positivaram para o DNA HPV.

A maioria das alterações histológicas encontradas no presente estudo com DNA HPV positivo corresponde a LIEBG, encontrando-se em 47,36% das amostras realizadas. Um estudo realizado por Santos²⁸ também observou LIEBG como maioria em suas amostras, seguido por citologia normal e cervicite. Entretanto, um estudo realizado por Gamba²⁹ demonstrou que os resultados mais prevalentes foram de LEIAG, totalizando 59% em relação às amostras.

Em relação às amostras das pacientes com PCR negativo para DNA HPV, foram encontrados cervicite como maioria, seguido por LIEBG e tendo LIEAG minoria nos diagnósticos histológicos. Esses resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Pitta²⁵, os quais verificaram que, das pacientes com DNA HPV negativos, apenas 10,2% apresentavam cervicite, sendo LIEAG a maioria, com 51,2%. Porém, reafirma-se, acredita-se que o motivo dessa discordância de resultados foi porque a amostra de Pitta²⁵ tinha resultado de colpocitologia oncótica ou colposcopia sugestiva de lesão de alto grau ou lesão de baixo grau persistente.

Dentre os subtipos de HPV encontrados nas amostras com cervicite e que possuíam DNA HPV positivos, os subtipos de HPV 33 e 52 foram encontrados em 28,57% cada. Já o HPV 16, 35 e 6 possuíram prevalência de 14,2% cada, nas amostras encontradas nesse estudo. A prevalência reduzida do HPV 16 contrasta com os resultados obtidos por Pitta²⁵, os quais encontraram como mais prevalentes na cervicite a infecção pelo HPV 16.

Em relação as LIEBG, não foram encontrados os subtipos de HPV pesquisados nesse estudo. Sugere-se que a atividade tumorigênica, iniciada em lesões de baixo grau propicie a inatividade viral, isto resultaria em uma possível redução na detecção, porém sem exclusão da presença para o desenvolvimento da lesão segundo Petry³⁰. Isso pode explicar a não detecção do DNA do HPV neste estudo. Embora houvesse dois grupos nas amostras que apresentavam lesão, um no qual o DNA HPV fosse detectável e outro grupo não, como já mencionado, todas as amostras apresentariam o vírus, já que o HPV é um fator necessário para o desenvolvimento de lesão. Mesmo que a atividade viral esteja indetectável o contato e a presença do vírus é confirmada pela evolução das displasias. Portanto, pode ser considerado que as amostras que apresentavam lesão estivessem infectadas por HPV de acordo com estudos de Huang³².

O HPV 16 foi maioria nas amostras de LIEAG, totalizando cerca de 67% dos resultados, seguido pelo HPV 35 com prevalência de 33%. Petry³⁰, em seu estudo,

conclui que o HPV 16 é o mais importante subtipo encontrado no câncer de colo uterino no mundo, sendo o mais prevalente²⁶.

Em relação a todas as amostras, o HPV 16 teve prevalência de aproximadamente 16%, seguido pelo HPV 33, 35 e 52, cuja prevalência foi de 10,52% cada e o HPV 6, com prevalência de 5,26%. Um estudo realizado por Pitta²⁵ mostrou que, em suas amostras, 40% da prevalência total de HPV detectado nos raspados da cérvix uterina foi pelo HPV 16, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Entretanto, Balbi³¹ descreve em seu trabalho que a prevalência de infecção pelo HPV 16 em mulheres entre 35 e 60 anos foi de apenas 4%, sendo o HPV 35 e o 6 os mais prevalentes, com 8%. Poucos estudos analisaram os subtipos de HPV, e a maioria avaliou em uma população limitada. Diante disso, é esperada uma variação de prevalência do HPV de acordo com a idade dos participantes da amostra e, além disso, a prevalência provavelmente é superestimada em amostras nas quais a biópsia foi solicitada como exame complementar a determinado quadro clínico, assim como pode ser subestimada ao analisar pacientes em consultas ginecológicas rotineiras.

6 CONCLUSÃO

A prevalência de HPV em mulheres jovens foi de 70,3%.

Nas mulheres com cervicite, a prevalência de HPV foi de 58,3%, já em lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau, foi de 81,8%, e em lesões intraepiteliais cervicais de alto grau, 75%.

O subtipo de HPV mais prevalente em lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens foi HPV 16, com 3 amostras, seguido de HPV 33, HPV 35 e HPV 52, com 2 amostras positivas cada.

Os subtipos de HPV de alto risco oncogênico mais prevalentes em mulheres com cervicite foram HPV 33 e HPV 52, com duas amostras em cada. Em lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau, não houve nenhuma detecção para os 9 subtipos testados. Em lesões intraepiteliais cervicais de alto grau de HPV, 2 amostras foram tipadas em HPV 16 e 1 amostra foi tipada em HPV 35.

Nenhuma amostra foi positiva para os subtipos HPV 18, HPV 31 e HPV 58.

O subtipo de baixo risco oncogênico foi detectado em apenas uma amostra de cervicite para o subtipo HPV 6.

Não houve nenhuma amostra positiva para o HPV 11.

REFERÊNCIAS

1. Bray, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.doi: 10.3322 / caac.21492.
2. Torre, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.doi:10.3322/caac.21262.
3. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva, INCA. Estimativa 2020: incidência de Câncer no Brasil. 2019 [acessado em 27/04/2020]. Disponível em:<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.
4. Van Doorslaer, K., Chen, Z., Bernard, H., Chan, PKS, DeSalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., McBride, AA, Villa, LL, Burk, RD e ICTV Report Consortium. Perfil da taxonomia do vírus ICTV: Papillomaviridae, 2018, *Journal of General Virology*, 99, 989–990.
5. Cruz, F.J.; Melo, V.H. Fatores associados à persistência da infecção pelo HPV na cérvix uterina. *Rev. Femina*, v.38, n. 8, ago. 2010. [acessado em: 27 de abril 2020] Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2010/v38n8/a1586.pdf>.
6. Van Doorslaer, koenraad. Evolution of the papillomaviridae, *Virology*, V. 455, n 1-2, p. 11-22, 2013. [acessado em: 27 abril 2020] Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213002924>
7. Burk, Robert D.; Chen, Zigu; Van Doorslaer, Koenraad. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. 2009, *Public health genomics*, v. 12, n. 5-6, p. 281-290.
8. Leto, Maria das Graças Pereira et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. 2011, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 2, p. 306-317.
9. Souza, Gláucia da Conceição Silva et al. Papilomavírus humano: biologia viral e carcinogênese. 2015, *Femina*, p. 189-192.
10. Cardoso, Eugênia Márcia Moreira. Aspectos históricos, fisiopatológicos e preventivos da infecção por Papiloma Vírus Humano-HPV. 2017.
11. Ggarwal, B. B. et al. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical pharmacology*, 2006, v. 72, n. 11, p. 1605-1621.
12. Azevedo, V. N. G.; Dias Junior, L. B.; Demachki, S.; Lima, F. A. S. Frequência das neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres portadoras do vírus

- imunodeficiência humana adquirida. *Revista Paraense de Medicina*, 2006, v. 20, n. 2, p. 35-39.
13. Boulet, G., Horvath, C., Broeck, D. V., Sahebali, S., & Bogers, J. (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; n. 39, p. 2006-2011.
14. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S7-15.
15. NCI Bethesda System. Bethesda system for reporting results of cervico-vaginal cytologic disease. 2001. [acessado em 10 de fevereiro de 2020.] Disponível em: <http://www.bethesda2001.cancer.gov>.
16. Solomon, D.; Nayar, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. p.89-90.
17. Stanley, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecology Oncology*, 2010; [acessado em 10 de fevereiro de 2020.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>.
18. Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, DN e Sankaranarayanan, R. Câncer do colo do útero. *Int J Gynecol Obstet*. 2018; [acessado em 26 de abril de 2020.] Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijgo.12611>.
19. Instituto Nacional de Câncer (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. Kumar, V.; Abbas, A.K; Aster, J.C. Patologia-Bases Patológicas das Doenças. Nona Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Capítulo 22, p. 1027-1032.
21. Sellors, John W.; Sankaranarayanan, R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiante. Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer. 2004, Capítulo 3, p. 21-24. [Acessado em 26 de Abril de 2020.] Disponível em: <https://screening.iarc.fr/doc/colpoptmanual.pdf>
22. Cavalcante, J. R. Imunoexpressão da caderina-E nas cervicites, nas lesões intraepiteliais escamosas e no carcinoma invasor do colo uterino. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2013 [Acessado em 26 de Abril de 2020] Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/6589>.

23. Silva, D. S. M. D., Silva, A. M. N., Brito, L. M. O., Gomes, S. R. L., Nascimento, M. D. D. S. B., & Chein, M. B. D. C. Rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Maranhão, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2014, vol 19, 1163-1170
24. Rama, C. H., Roteli-Martins, C. M., Derchain, S. F. M., Longatto-Filho, A., Gontijo, R. C., Sarian, L. O. Z., ... & Aldrighi, J. M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Revista de saude publica*, 2008, v. 42, p. 123-130.
25. Pitta, Denise Rocha et al. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 2010, v. 32, n. 7, p. 315-320.
26. Pinto, D. D. S., Fuzii, H. T., & Quaresma, J. A. S. (2011). Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, 27, 769-778.
27. de Vento, A. H. M. Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil): Resultados preliminares. 2017, Porto Alegre: Associação Hospitalar Moinhos de Vento.
28. Santos, V. K. D., Igansi, C. N., Rodrigues, D. D. P., Herrera, E. C., Montanow, D., Aguiar, A., & Rossetti, M. L. R. Infecção genital por papilomavírus humanos oncogênicos subtipos hpv-16,-18,-31 e sua associação com lesões cervicais. Salão de iniciação Científica. Livro de resumos. 2005. [acessado em 26 de abril de 2020] Disponível em: https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/60304/Resumo_200501351.pdf?sequence=1
29. Giordani, B. F., Spinato, G., Gamba, G., Gonçalves, L. F., & Lorencetti, N. A.. Prevalência dos subtipos de papiloma vírus humano identificados pelo método de captura híbrida no meio-oeste catarinense. *Anais de Medicina*. 2014, v. 1, n. 1, p. 32-32.
30. Petry, Karl Ulrich. HPV and cervical cancer. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2014, v. 74, n. sup244, p. 59-62. DOI: 10.3109/00365513.2014.936683
31. Balbi, Florentina do Socorro Martins. Estudo da prevalência da infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) em mulheres no climatério em um hospital de referência de Belém. 2015; [acessado em 26 de abril de 2020] Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/7026>.

32. Huang, Lee-Wen; Chao, Shiouh-Lirng; Lee, Bor-Heng. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *Journal of clinical pathology*. 2008, v. 61, n. 5, p. 627-631.

APÊNDICE A

Termo de consentimento livre 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 Humanos 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: [REDACTED]

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.

APÊNDICE B

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

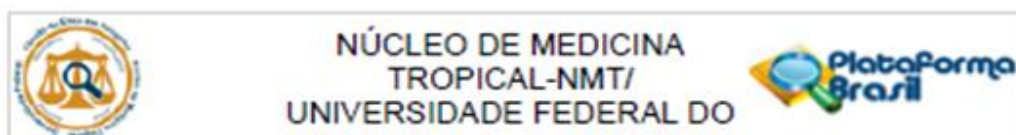
histopatológico:_____

12 - Lesão Intraepitelial Cervical () LSIL (NIC I) () HSIL (NIC II) ()
 HSIL (NIC III) () Câncer

13 – Fez CAF: () sim () não

ANEXO A

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 PRE-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS NO COLO UTERINO

Pesquisador: Elicmara da Paixão Ferreira Chagas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37237614.0.0000.5172

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Para - 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 progredem 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 a 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

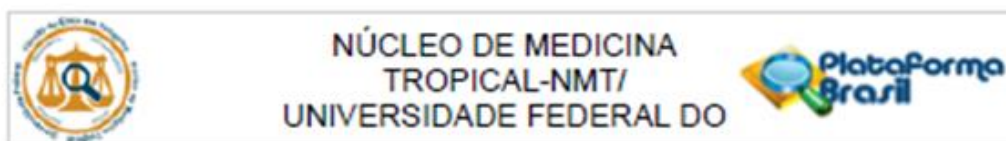
UF: PA

Telefone: (91)3201-0961

Município: BELEM

CEP: 66.065-240

E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Protocolo: 065.257

Papilomavírus 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, RepII-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 Imunoistoquímica 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 Imunoistoquímica 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, CD2071, 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	CEP:	66.055-240
Bairro:	Umarizal		
UF:	PA	Município:	BELEM
Telefone:	(91)3201-0961	E-mail:	cepbel@ufpa.br



NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 065.257

Serão mínimos os riscos físicos decorrentes da coleta de material biológico, pois o material será de biopsias 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

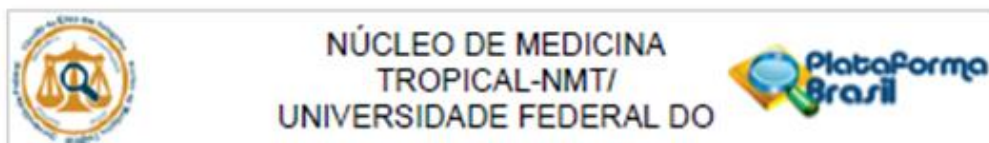
CEP: 66.055-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-0961

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: 66.065-240
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-0961 E-mail: cepbel@ufpa.br

ANEXO B

Parecer do orientador sobre a versão do TC para defesa pública

CARINA DE ABREU ELIAS
RAFAEL MIRANDA PANTOJA BAIA

**Deteção dos subtipos do Papilomavírus humano em lesões precursoras do
câncer do colo uterino em mulheres jovens**

Declaro junto a Coordenação do Trabalho de Curso do CESUPA que li a versão final do TC que tem como título: Deteção dos subtipos do Papilomavírus humano em lesões precursoras do câncer do colo uterino em mulheres jovens e considero que a mesma se encontra em condições de submissão à banca examinadora durante a Jornada de Defesa de Trabalho de Curso do Curso de Bacharelado em Medicina do Cesupa.

Belém, ____/____/____

Elcimara da Paixão Chagas

Prof. Doutora Elcimara da paixão chagas