



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
GESTANTES NO MUNICÍPIO DE COARI, AMAZONAS, BRASIL**

SUZANA DOS SANTOS NUNES

MANAUS-AM

2017

SUZANA DOS SANTOS NUNES

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
GESTANTES NO MUNICÍPIO DE COARI, AMAZONAS, BRASIL**

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

Área de Concentração: Biotecnologia para saúde

Orientadora: Dra. CRISTINA MARIA BORBOREMA DOS SANTOS

Co-orientadora: Dra. DANIELLE ALBUQUERQUE PIRES ROCHA

MANAUS-AM

2017

N972p Nunes, Suzana dos Santos
Prevalência da infecção pelo papilomavírus humano em gestantes no município de Coari, Amazonas, Brasil / Suzana dos Santos Nunes. 2017
84 f.: il.; 31 cm.

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

1. Amostra cérvico-vaginal. 2. Gestação. 3. Papilomavírus humano. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Urina. I. Santos, Cristina Maria Borborema dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

SUZANA DOS SANTOS NUNES

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM
GESTANTES NO MUNICÍPIO DE COARI, AMAZONAS, BRASIL**

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

Área de Concentração: Biotecnologia para saúde

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos
Presidente

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
Membro 1

Prof. Dr. Deyvylan Araujo Reis
Membro 2

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e força para realizar esta pesquisa.

Ao meu esposo Jeremias Reis, pelo apoio e incentivo no decorrer de toda essa jornada.

À coordenação do PPGBiotec-UFAM, pelo oportunidade e desafio em estender uma turma de mestrado para o ISB-UFAM.

Aos professores do PPGBiotec-UFAM, que fizeram parte desta conquista, em especial a prof^a. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos pela orientação.

À prof^a. Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha, pela orientação em todas as fases desta pesquisa e por não ter medido esforço para a conclusão da mesma.

À pesquisadora Maria Joana Nunes de Azevedo, pela parceria e aprendizado que me proporcionou ao longo desta pesquisa.

À prof^a. Dra. Kátia Luz Torres Silva, pela colaboração na realização desta pesquisa.

À acadêmica de Enfermagem do ISB/UFAM Jarlene Mesquita, pela colaboração na coleta das amostras.

Ao médico Ricardo Farias, pelo apoio prestado as gestantes no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Felicien Gonçalves Vásquez, pela análise estatística dos dados.

Ao pesquisador e colega de trabalho Renato Reis, pelo apoio de sempre.

À Secretaria Municipal de Saúde de Coari, pela autorização da pesquisa.

Aos meus colegas do mestrado, pelo incentivo mútuo ao longo dessa jornada.

Aos meus colegas do ISB-UFAM, pelo apoio ao longo deste estudo, em especial a prof^a. Me. Josiane Montanho Mariño, pela contribuição na minha qualificação do mestrado.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo, minha eterna gratidão.

RESUMO

Durante a gravidez, as gestantes sofrem profundas e contínuas alterações anatômicas e fisiológicas para que possam lidar com o aumento das exigências físicas e metabólicas necessárias para permitir o desenvolvimento do feto e as demandas do parto. Estas alterações deixam a gestante mais suscetível às infecções, tais como a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), podendo trazer consequências tanto para mãe quanto para o seu conceito. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a prevalência da infecção pelo HPV em gestantes e verificar a concordância da detecção do HPV entre amostras de urina e cérvico-vaginal. Grávidas no segundo trimestre de gestação em acompanhamento pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Coari foram convidadas a participar desta pesquisa, tendo sido colhidas amostras cérvico-vaginal e urinária. A detecção molecular do HPV foi feita através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se o conjunto de iniciadores PGMY09/11. Os resultados obtidos mostraram que 24,6% (27/110) das gestantes estavam infectadas pelo HPV. Em relação a cada tipo de amostra, foi encontrado HPV em 13 (11,8%) amostras de urina e em 26 (23,6%) amostras cérvico-vaginais. Houve uma concordância observada de 86,4% (IC de 95%, 78,7% - 91,6%) e índice de concordância moderado entre as amostras biológicas ($\kappa = 0,543$, IC de 95%, 0,372 - 0,715). Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e as variáveis: idade das gestantes ($p = 0,014$), primigestação ($p = 0,027$) e nuliparidade ($p = 0,046$). Portanto, a prevalência do HPV encontrada em nosso estudo, reforça a necessidade de se obter mais informações sobre a infecção pelo HPV na fase gestacional da mulher, tendo em vista as complicações causadas pelo HPV na gestação, como os condilomas gigantes na mãe e a papilomatose respiratória recorrente no conceito.

Palavras-chave: Amostra cérvico-vaginal; Gestação; Papilomavírus humano; Reação em cadeia da polimerase; Urina.

ABSTRACT

During pregnancy, pregnant women undergo deep and continuous anatomical and physiological changes so that they can cope with the increased physical and metabolic demands necessary to allow the development of the fetus and the demands of childbirth. These changes make the pregnant woman more susceptible to infections, such as Human Papillomavirus (HPV) infection, which may have consequences for both mother and her baby. The objective of this study was to evaluate the prevalence of HPV infection in pregnant women and to verify the agreement of HPV detection between urine and cervicovaginal samples. For this, pregnant women in the second trimester of gestation under prenatal care at the Basic Health Units (UBS) of the municipality of Coari were invited to participate in this study, having collected cervico-vaginal and urinary samples. Molecular detection of HPV was done through Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primer set PGMY09/11. The results showed that 24.6% (27/110) of the pregnant women were infected by HPV. For each type of sample, HPV was found in 13 (11.8%) urine samples and 26 (23.6%) cervicovaginal samples. There was an observed agreement of 86.4% (95% CI, 78.7% - 91.6%) and moderate concordance index among biological samples (kappa = 0.543, 95% CI, 0.372-0.715). A statistically significant association was found between HPV infection and the variables: age of the pregnant women ($p = 0.014$), primigestation ($p = 0.027$) and nulliparity ($p = 0.046$). Therefore, the prevalence of HPV found in our study reinforces the need to obtain more information about HPV infection in the gestational phase of the woman, in view of the complications caused by HPV during pregnancy, such as giant condylomata in the mother and papillomatosis in the baby.

Keywords: Cervical-vaginal sample; Gestation; Human papillomavirus; Polymerase chain reaction; Urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo conceitual da infecção pelo HPV e a progressão para o câncer ..	17
Figura 2 - Morfologia do capsídeo do Papilomavírus Humano.....	20
Figura 3 - Organização do genoma dos Papilomavírus Humano Alpha, Mu e Beta..	21
Figura 4 - Expressão superficial de moléculas de MHC impedida por HPV E5 e E7	23
Figura 5 - Relação evolutiva entre os Papilomavírus Humano.....	25
Figura 6 - Sítios de infecção pelo Papilomavírus Humano	26
Figura 7 - Tipos de infecção ocasionada pelos Papilomavírus Humano	27
Figura 8 - Manifestações clínicas na progressão do câncer do colo do útero	29
Figura 9 - Eventos moleculares durante o NIC I, II, III e o câncer no colo do útero ..	29
Figura 10 - Zona de transformação cervical e diferentes graus de lesões intraepiteliais	30
Figura 11 - Hiperplasia epitelial focal e Papilomatose Respiratória Recorrente causada pelo Papilomavírus Humano.....	31
Figura 12 - Condiloma acuminado em gestante.....	37
Figura 13 - Papilomatose Respiratória Recorrente causada pelo HPV6 e 11	38
Figura 14 - Fluxograma das etapas desenvolvidas nesta pesquisa	42
Figura 15 - Análise da eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da PCR obtidos com os iniciadores PGMY09/11 e PCO4/GH20.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos brasileiros sobre a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres não gestantes	18
Quadro 2 - Estudos no Estado do Amazonas sobre a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres não gestantes.....	19
Quadro 3 - Estudos realizados no mundo sobre a prevalência da infecção pelo HPV em gestantes	35
Quadro 4 - Estudos realizados no Brasil sobre a prevalência da infecção pelo HPV em gestantes.....	36
Quadro 5 - Sequências do <i>primer</i> PGMY09/11	45
Quadro 6 - Sequências do <i>primer</i> PCO4/GH20	46
Quadro 7 - Componentes e volumes da PCR multiplex para amplificação de 268 pb do gene da β -globina humana e amplificação de 450 pb da região L1 do HPV utilizando os iniciadores PCO4/GH20 e PGMY09/11	46
Quadro 8 - Processamento da PCR multiplex no termocilador <i>Veriti</i> para amplificação do fragmento do gene da β -globina humana e do gene L1 do HPV	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características sócio-demográficas das gestantes recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017.....	49
Tabela 2 - Características do comportamento sexual das gestantes recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017	50
Tabela 3 - Características obstétricas das gestantes recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017.....	51
Tabela 4 - Características obstétricas e ginecológicas da gestação atual das mulheres recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017	52
Tabela 5 - Distribuição segundo os resultados da PCR para HPV em amostras da urina e cérvico-vaginal de gestantes amostradas no município de Coari – AM	54
Tabela 6 - Resultado do HPV em relação aos dados sociodemográficos e econômicos das gestantes amostradas no município de Coari – AM	54
Tabela 7 - Resultado do HPV em relação aos dados de comportamento sexual das gestantes amostradas no município de Coari - AM.....	55
Tabela 8 - Resultado do HPV em relação as gestantes amostradas no município de Coari - AM	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
E	<i>Early</i> (precoce)
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
hCG	<i>Human chorionic gonadotrophin</i> (Gonadotrofina coriônica humana)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
hPL	<i>Human placental lactogen</i> (lactogênio placentário humano)
HPV	<i>Humanpapillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (lesão intraepitelial escamosa de alto grau)
HSV	<i>Herpes simplex virus</i> (Vírus herpes simples)
HSV-2	<i>Herpes simplex virus 2</i> (Vírus herpes simples tipo 2)
IC	Intervalo de confiança
ISB	Instituto de Saúde e Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, localizado em Coari/AM
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
L	<i>Late</i> (tardia)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle)
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Maior)
MSD	<i>Merck Sharp & Dhome</i>
NIC I	Neoplasia intraepitelial cervical grau I

NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical grau II
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical grau III
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Região Aberta de Leitura)
p53	Proteína p53
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PRR	Papilomatose Respiratória Recorrente
Th1	Células <i>T helper</i> tipo 1
Th2	Células <i>T helper</i> tipo 2
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VLPs	<i>Virus-like particles</i> (partículas semelhantes a vírus)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Gestação e Infecções sexualmente transmissíveis	15
2.2 Papilomavírus Humano	16
2.2.1 Epidemiologia da infecção pelo Papilomavírus Humano	16
2.2.2 Estrutura e classificação do Papilomavírus Humano	20
2.2.3 Patogênese do Papilomavírus Humano	25
2.2.4 Manifestações clínicas do Papilomavírus Humano	28
2.2.5 Diagnóstico molecular do Papilomavírus Humano	32
2.2.6 Prevenção contra o Papilomavírus Humano	33
2.3 Infecção pelo Papilomavírus Humano na gestação	34
2.3.1 Epidemiologia do Papilomavírus Humano na gestação	34
2.3.2 Manifestações clínicas do Papilomavírus Humano em gestantes e seus conceptos	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 População e amostra	41
4.2 Entrevista e coleta das amostras	43
4.3 Processamento laboratorial	44
4.3.1 Extração do DNA	45
4.3.2 Detecção do HPV e verificação da eficiência da extração do DNA	45
4.4 Análise estatística	47

5 RESULTADOS	48
5.1 Caracterização geral da amostra	48
5.2 Infecção pelo Papilomavírus Humano e análise de concordância na detecção do Papilomavírus Humano entre amostras de urina e cérvico-vaginal.....	52
5.3 Associação entre as variáveis e a infecção pelo HPV.....	54
6 DISCUSSÃO	57
6.1 Caracterização geral da amostra	57
6.2 Infecção pelo Papilomavírus Humano e análise de concordância na detecção do Papilomavírus Humano entre amostras de urina e cérvico-vaginal	60
6.3 Associação entre as variáveis e a infecção pelo HPV.....	64
CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) são um grande problema de saúde pública no mundo, principalmente nos países mais pobres. Elas causam profundo impacto na saúde sexual e reprodutiva da mulher e estão entre as infecções mais comuns no mundo. Nos Estados Unidos, por exemplo, as IST são as doenças mais comumente notificadas e acarretam custos médicos anuais estimados em mais de US\$ 16 bilhões de dólares (GININDZA *et al.*, 2017; HUGHES e FIELD, 2015; NEWMAN *et al.*, 2015; PEARSON *et al.*, 2017).

Estima-se que no mundo todos os dias mais de um milhão de pessoas adquiram uma IST, e que todos os anos surjam cerca de 499 milhões de novos casos de IST curáveis (gonorréia, clamídia, sífilis e tricomoníase). Calcula-se que no mundo 536 milhões de pessoas vivam com a infecção pelo vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2) e que aproximadamente 291 milhões de mulheres estejam infectadas pelo Papilomavírus Humano (HPV). Além disso, as IST podem aumentar a infecciosidade e susceptibilidade ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2013; UNEMO *et al.*, 2017).

A gestação é uma fase da vida da mulher em que ocorrem profundas mudanças anatômicas, fisiológicas, hormonais e imunológicas, a fim de manter a gravidez, permitir o desenvolvimento do feto e atender as demandas do parto. Estas modificações que ocorrem no corpo da mulher durante essa fase a torna mais suscetível às infecções, especialmente as IST. E na gestação, as IST têm impacto tanto na saúde materna quanto na fetal, podendo desencadear gravidez ectópica, aborto espontâneo, parto prematuro, baixo peso ao nascer, infecções puerperais, entre outras. Portanto, a medida mais efetiva para a prevenção de IST no recém-nascido é o diagnóstico e tratamento da gestante e de sua parceria sexual (BRASIL, 2017a; GUPTA e BOWMAN, 2012; ÖRGÜL *et al.*, 2017; TALBOT e MACLENNAN, 2016).

No Brasil, estudos mostram que a prevalência do HPV em gestantes varia entre 17,8% a 61,9%, podendo chegar até 84,3% quando realizados em gestantes HIV positivas (BRANDÃO, LACERDA e XIMENES, 2010; FRANCISCATTO *et al.*, 2014; MEYRELLES *et al.*, 2013). Em um estudo multicêntrico realizado em algumas capitais brasileiras, a prevalência do HPV encontrada em gestantes na cidade de

Manaus foi 45,3% (BRASIL, 2008). No entanto, no interior do estado do Amazonas ainda não são conhecidos estudos sobre a prevalência do HPV em gestantes.

O HPV é uma infecção que na gestação representa impacto tanto para mãe quanto para o feto e/ou recém-nascido. Para a mãe deve-se destacar a suscetibilidade para o desenvolvimento de condilomas gigantes, aborto espontâneo, rotura prematura de membrana em pré-termo e o risco de progressão para o câncer cervical. Para o recém-nascido as principais consequências da infecção pelo HPV são a papilomatose respiratória recorrente (PRR) e verrugas que podem se manifestar no nascimento ou no decorrer da infância (COTTON-CABALLERO *et al.*, 2017; DOERFLER *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014; MARTINS, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015; SULLIVAN, CURTIS e MOUZAKES, 2017).

Embora o HPV seja uma das IST mais comuns em todo o mundo, as rotas verticais e horizontais (autoinoculação, heteroinoculação e fômites) também representam uma proporção significativa das infecções. Apesar de a transmissão vertical ser uma via conhecida, estudos sugerem que não há evidências de que o parto cesáreo previna a transmissão vertical do HPV, e que, portanto, o parto cesariano é indicado somente em casos em que existe risco de sangramento excessivo ou de obstrução do canal de parto devido ao tamanho e a localização das lesões (BRASIL, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016; SABEENA *et al.*, 2017).

Apesar de várias pesquisas evidenciarem a transmissão vertical do HPV, ainda existem poucas informações do mecanismo desta infecção. Além disso, são poucas as publicações de estudos epidemiológicos sobre o HPV em gestantes, principalmente no Brasil, o que dificulta nosso conhecimento sobre os riscos de transmissão vertical desta infecção. Portanto, estudos epidemiológicos das IST em gestante são fundamentais para conhecer a prevalência das infecções e suas repercussões na saúde materna e fetal, além de possibilitar informações necessárias para o desenvolvimento de políticas públicas sobre a questão, tais como a inclusão do rastreio obrigatório de outras IST durante o pré-natal e incentivo de pesquisas científicas que apresentem ótimos resultados na detecção dos patógenos por meio do uso de métodos menos invasivos para obtenção da coleta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gestação e Infecções sexualmente transmissíveis

Durante a gravidez, as gestantes sofrem profundas e contínuas alterações anatômicas e fisiológicas para que possam lidar com o aumento das exigências físicas e metabólicas necessárias para permitir o desenvolvimento do feto e as demandas do parto. Estas alterações interligadas afetam todos os sistemas do corpo das gestantes, principalmente os sistemas: cardiovascular, respiratório, hematológico, renal, gastrointestinal, endócrino e imunológico, sendo influenciados pelos hormônios circulantes reprodutivos, incluindo o estrogênio, progesterona, relaxina, lactogênio placentário humano (hPL-human placental lactogen) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (TALBOT e MACLENNAN, 2016; TAN e TAN, 2013).

Durante este período da vida da mulher, os hormônios estradiol, progesterona e cortisol têm concentrações elevadas e desempenham vários efeitos imunológicos para manter o desenvolvimento do feto e garantir a duração normal da gravidez. Estas alterações estão relacionadas à estimulação do sistema imunológico inato (especialmente uma neutrofilia fisiológica) e a redução das atividades do sistema imunológico adaptativo. Na gravidez, a atividade inflamatória se encontra reduzida e ocorre diminuição das células T *helper* tipo 1 (Th1) em favor das células T *helper* tipo 2 (Th2) para evitar a rejeição do feto (NEVES, MEDINA DELGADO, 2007; TALBOT e MACLENNAN, 2016). As modificações do sistema imunológico vivenciada pelas gestantes expõem as mesmas a risco de infecções, incluindo as IST, que têm profundo impacto na saúde materna e fetal (MARTINS, 2014; WHO, 2013).

Vários patógenos sexualmente transmissíveis podem ter implicações significativas na gravidez, tais como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Papilomavírus Humano, Herpesvírus Simples (HSV), *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* e o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). Estas infecções podem causar gravidez ectópica, aborto espontâneo, parto prematuro, baixo peso ao nascer, infecções oculares, pneumonia, infecções puerperais,

papilomatoses respiratórias, anomalias congênitas e óbito fetal ou neonatal (GUPTA e BOWMAN, 2012; UNEMO *et al.*, 2017).

No Brasil, durante as consultas de pré-natal, é obrigatório solicitar no primeiro e terceiro trimestres de gravidez, além do momento do parto, os exames para sífilis, hepatite B e HIV. Dessa forma, a ocorrência dessas IST pode ser rastreada com sucesso, mas o diagnóstico das demais IST é negligenciado. As IST, se diagnosticadas e tratadas precocemente, teriam seus efeitos minimizados para a mãe e o feto, bem como diminuiria os gastos com internações e hospitalizações prolongadas (BRASIL, 2017a; MARTINS, 2014; VIEIRA, 2009).

2.2 Papilomavírus Humano

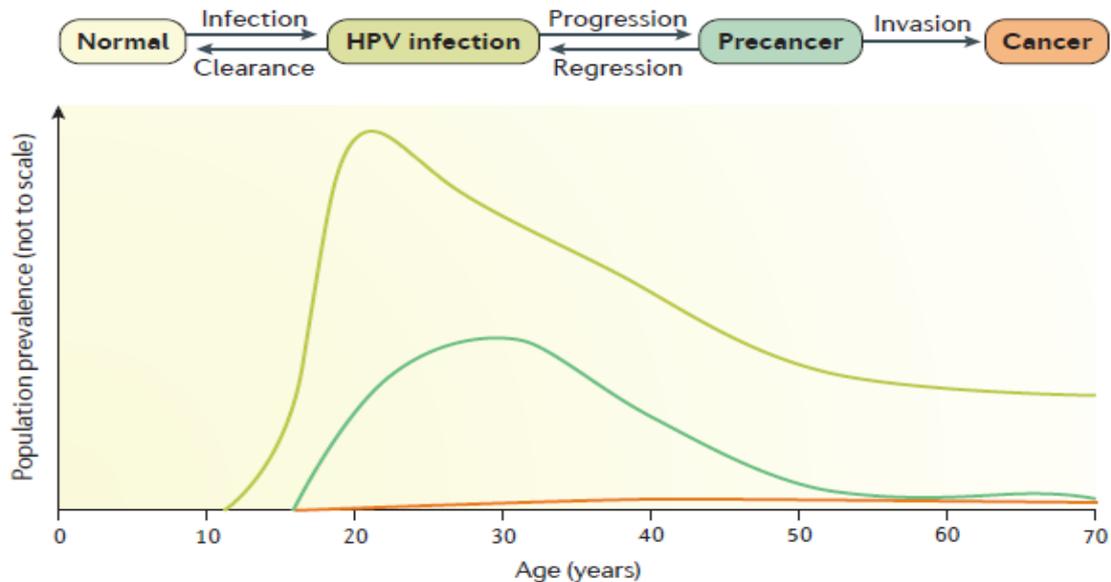
2.2.1 Epidemiologia da infecção pelo Papilomavírus Humano

Estima-se que cerca de 291 milhões de mulheres estejam infectadas pelo HPV no mundo e que praticamente todas as pessoas com vida sexual ativa terão esta infecção em algum momento da vida e algumas destas pessoas serão infectadas repetidas vezes. O pico da infecção pelo HPV ocorre logo após o início da vida sexual, mas a maioria destas infecções tem resolução espontânea dentro de 1 ou 2 anos, sem causar sintomas ou doença. Porém, a infecção persistente por tipos específicos de HPV de alto risco (mais comumente os tipos 16 e 18) podem trazer como consequência lesões pré-cancerosas que evoluem para o câncer (figura1) (WHO, 2013; OMS, 2013; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Acredita-se que é incomum a persistência do HPV após 2 anos de infecção, sendo que dentro de 5-7 anos mais de 90% das infecções não são detectadas, pois o vírus é eliminado inteiramente do tecido ou mantido pelo sistema imune a um nível indetectável por testes moleculares (período de latência). No entanto, cerca de 5-10% de todas as mulheres infectadas desenvolvem infecções persistentes pelo HPV. A prevalência do HPV no mundo entre mulheres com achados citológicos normais é estimada em 11,7%, variando de 1,6% a 41,9% entre os diversos países. Os tipos de HPV 16, 18, 31, 39, 51, 52, 56, 58 e 59 são os mais prevalentes em todo o mundo, com destaque para o HPV16 como o mais prevalente. A prevalência da

infecção pelo HPV atinge seu pico em jovens menores de 25 anos, com uma prevalência de 21,8% (SCHIFFMAN *et al.*, 2016; WHO, 2017).

Figura 1 - Modelo conceitual da infecção pelo HPV e a progressão para o câncer.



Fonte: SCHIFFMAN *et al.*, 2016. A prevalência máxima da infecção pelo HPV está altamente associada à transmissão sexual na juventude. O pico secundário de lesões precursoras do câncer ocorre alguns anos depois, dependendo da intensidade do rastreamento, enquanto que o pico ou platô do câncer invasivo ocorre muitos anos depois do início da infecção.

Estudos brasileiros apresentam a prevalência do HPV variando de 23% a 59% em mulheres não gestantes e sem diagnóstico de alterações citológicas (quadro 1), sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a técnica mais utilizada nestas pesquisas. Especificamente no Estado do Amazonas, estudos apontam para uma prevalência de infecção por HPV variando de 6,5% a 48,78% em mulheres não gestantes e sem diagnóstico de alterações citológicas, chegando a 100% de prevalência em mulheres com alterações citológicas, sendo a PCR a técnica mais utilizada nestas pesquisas (quadro 2).

Quadro 1 - Estudos brasileiros sobre a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres não gestantes

Prevalência	n	População	Amostra	Local	Técnica	Autores
27,4%	66/241	Alunas de escolas públicas	Cervical	Rio de Janeiro	PCR MY09/11	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010
14,6%	65/444	Mulheres em exame de rotina para o câncer cervical	Cervical	Belém e Tucuruí/PA	PCR MY09/11	PINTO, FUZII e QUARESMA, 2011
67,7%	69/102	Mulheres profissionais do sexo	Cervical	Botucatu/SP	PCR não identificada	POGETTO, SILVA, PARADA, 2011
31%	103/334	Mulheres em exame citopatológico de rotina	Cervical	Porto Velho/RO	PCR-RFLP	SANTOS <i>et al.</i> , 2013
23%	32/139	Estudantes universitárias	Cérvico-vaginal	Mato Grosso do Sul	PCR MY09/11	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2015
59%	121/206	Mulheres com LSIL e HSIL	Cervical	Sergipe e Alagoas	PCR MY09/11	GURGEI <i>et al.</i> , 2015
37,1%	60/160	Mulheres em exame de rotina	Cervical	Minas Gerais	PCR não identificada	CECCATO JUNIOR <i>et al.</i> , 2015
55,5%	95/171	Mulheres HIV positivas				
48,6%	323/665	403 mulheres em rastreio de rotina / 262 mulheres com papanicolau anormal	Cervical	São Paulo e Barretos	Cobas 4800 Hybrid Capture 2	MARTINS <i>et al.</i> , 2016
27,5%	55/200	Mulheres em exame ginecológico de rotina	Cérvico-vaginal	Rio Grande/RS	Nested-PCR PGMY/GP5/6	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2016
23,2%	62/271	Mulheres HIV negativas	Cervical	Rio Grande/RS	PCR animhada PGMY/GP5/6	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2017
28,5%	24/84	Mulheres HIV positivas	Cervical			
91%	82/90	Mulheres com lesões intraepiteliais	Biópsia Cervical			

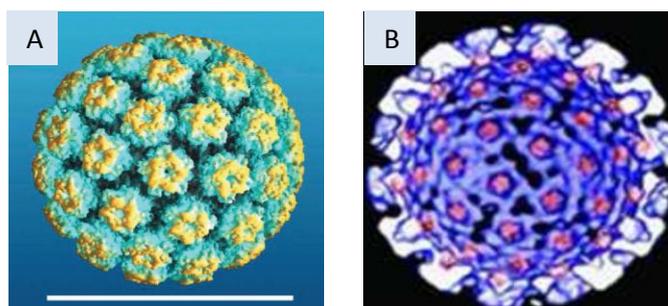
Quadro 2 - Estudos no Estado do Amazonas sobre a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres não gestantes

Prevalência	n	População	Amostra	Local	Técnica	Autores
100%	42/42	Mulheres portadoras de HSIL e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino	Cervical	Manaus/AM	Nested-PCR MY09/11GP5+/GP6+	CORRÉA, 2005
64,2%	301/469	Mulheres atendidas em clínica de IST	Cérvico-Vaginal	Manaus/AM	Captura híbrida	BRASIL, 2008
48,78%	80/164	Mulheres com resultado citopatológico inflamatório	Cervical	Manaus/AM	Nested-PCR MY09/11GP5+/GP6+	LIRA, 2010
94,74%	144/152	Mulheres com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero				
6,5%	4/61	Mulheres sem diagnóstico de alterações citológicas	Cervical	Manaus/AM	PCRMY09/11	CASTRO <i>et al.</i> , 2011
38,5%	32/83	Mulheres com lesões citológicas pré-malignas e malignas				
29,1%	105/361	Mulheres em exame ginecológico de rotina	Cervical	Coari/AM	Nested-PCR MY09/11GP5+/GP6+	ROCHA <i>et al.</i> , 2013
18,7%	77/412	Mulheres ribeirinhas	Cérvico-Vaginal	Coari/AM	PCRPGMY09/11	MARIÑO, 2015
31,1%	93/299	Mulheres HIV positiva	Cervical	Manaus/AM	PCRBD <i>Onclearity</i> ®	TEIXEIRA, 2015
28,6%	20/70	Mulheres com lesão intraepitelial	Cervical	Manaus/AM	Nested-PCR MY09/11 GP5+/GP6+	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2015
61,6%	191/310	Mulheres HIV positiva	Cervical	Manaus/AM	HC2DIGENE®	SILVA <i>et al.</i> , 2015
36,09%	48/133	Mulheres em exame ginecológico de rotina	Cervical	Manaus/AM	Nested-PCR MY09/11 GP5+/GP6+	COSTA-LIRA <i>et al.</i> , 2017
93,61%	44/47	Mulheres com alterações cervicais				

2.2.2 Estrutura e classificação do Papilomavírus Humano

O HPV é um vírus não envelopado, de formato icosaédrico (figura 2), com capsídeo de 50-60 nanômetros de diâmetro, formado pelas proteínas L1 e L2. Este capsídeo contém 360 moléculas de proteína L1 dispostas em 72 capsômeros, sendo cada um composto de 5 moléculas de L1. As interações entre os capsômeros requerem a cauda C-terminal da proteína L1, que se estende para os capsômeros vizinhos e os liga na sua base através de ligações dissulfeto. A proteína L2 possui um número ainda não definido para a formação do capsídeo, sendo estimada a necessidade entre 12 a 72 moléculas de L2, que não estão totalmente expostas na superfície do vírus, com exceção do seu N-terminal de 120 ou mais aminoácidos (BAKER *et al.*, 1991; DOORBAR *et al.*, 2016; WANG e RODEN, 2013).

Figura 2 - Morfologia do capsídeo do Papilomavírus Humano



Fonte: WANG e RODEN, 2013; ZHAO *et al.*, 2013. A) Modelo atômico do HPV16; B) Arranjo de áreas de densidade L2 (vermelho) sobrepostas na visão interior de L1 (em azul).

O genoma do HPV consiste em uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que possui em média 8.000 pares de bases (pb), de cadeia dupla, circular, covalentemente fechada, com um peso molecular de aproximadamente 5×10^6 (COGGIN e ZUR HAUSEN, 1979; DOORBAR *et al.*, 2016).

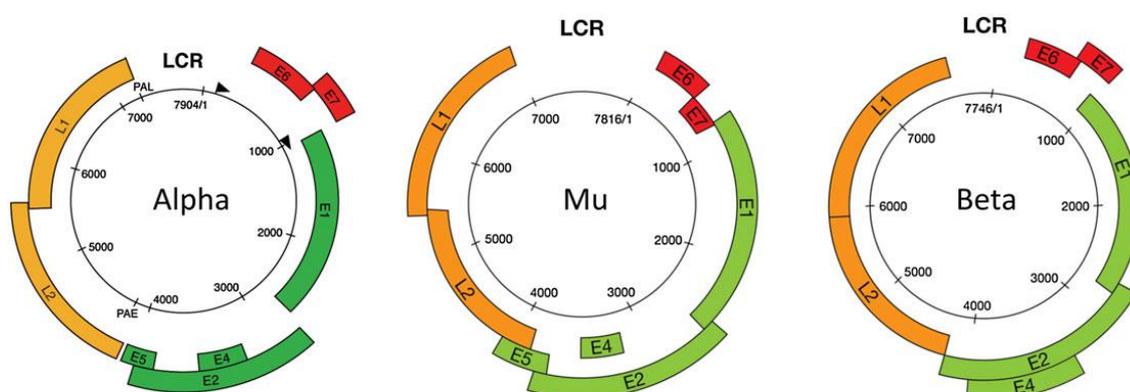
O genoma do HPV, independentemente do gênero, pode ser dividido em três regiões (figura 3): A região de controle longo (Long Control Region– LCR), a região precoce (*Early* – E) e a região tardia (*Late* – L). A LCR está envolvida na transcrição e controle de replicação. A região E codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que desempenham funções importantes na transcrição e replicação viral. A região L

codifica as proteínas L1 e L2, que são necessárias à produção do capsídeo, sendo também chamadas de proteína principal e proteína menor, respectivamente (BERTI *et al.*, 2017; QUINT *et al.*, 2015).

A molécula de DNA do HPV contém de 8 a 9 sequências de leitura aberta (*Open Reading Frames –ORFs*). Embora o número de genes seja limitado pelo pequeno tamanho do genoma do papilomavírus, o número de proteínas codificadas é muito maior, uma vez que a expressão genética envolve o uso de múltiplos promotores e padrões complexos de *splicing*. E apesar da variação no tamanho, no número e na organização dos ORFs, todos os papilomavírus contêm genes de núcleo bem conservados envolvidos na embalagem (L1 e L2) e na replicação (E1 e E2), com maior diversidade nos genes restantes (E6, E7, E5, e E4), que têm papéis na condução do ciclo celular, evasão imune e liberação do vírus. Mas, diferente de outros vírus, somente uma das fitas do DNA viral apresenta ORFs, de forma que a transcrição ocorre apenas em um sentido, isto é, da esquerda para adireita quando se toma como referência o mapa linear convencional ou sentido horário no mapa circular (DOORBAR *et al.*, 2016; LIMA, SILVA e RABENHORST, 2013).

A LCR contém elementos reguladores (sítios de ligação ao fator de transcrição envolvido na regulação da expressão protéica, elementos intensificadores e elementos promotores) e a origem de replicação viral. A LCR possui entre 300 a 1000 pb, separando as regiões precoce e tardia (BERTI *et al.*, 2017; QUINT *et al.*, 2015; TOMMASINO, 2017).

Figura 3 - Organização do genoma dos Papilomavírus Humano Alpha, Mu e Beta



Fonte: DOORBAR *et al.*, 2016. Os HPVs compartilham uma organização genética comum, mas o tamanho e a posição dos principais ORFs podem variar, com tipos de Beta-HPV sem uma ORF E5.

A proteína E1 apresenta atividade de helicase de DNA dependente de ATP, necessária para a replicação e amplificação do genoma viral (BERTI *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015).

A proteína E2 atua na transcrição viral, na replicação e na divisão do genoma e pode ligar-se a sítios tanto no genoma viral como no genoma celular. Tal como acontece com a maioria dos produtos dos genes do HPV, as funções de E2 são dependentes da sua interação com produtos gênicos celulares e na modificação dos seus papéis normais em benefício do vírus. Tem a função de regular a transcrição de E6 e E7 (DREER, POEL e STUBENRAUCH, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015).

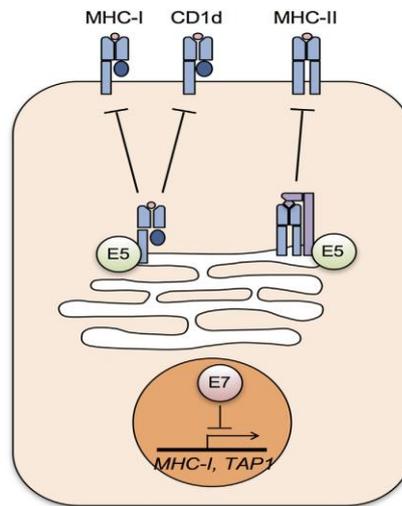
A proteína E4 se acumula em nível muito elevado em células que suportam a síntese do vírus e tem função principal na liberação do vírus, além de atuar para otimizar o sucesso de amplificação genômica do vírus (BERTI *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015).

A proteína E5 é transmembranar de três passagens com um C-terminal citoplasmático, constituída por 83 aminoácidos, geralmente localizada no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi, embora também possa ser encontrada nas superfícies de membrana plasmática e nuclear. Possui uma capacidade de formação de poros e pode interferir na apoptose, no tráfico intracelular de vesículas endocitóticas e também realiza importantes atividades anti-imunes, como a infrarregulação das classes I e II do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) na superfície celular (figura 4). No entanto, a função de E5 é divergente entre os tipos de HPV e curiosamente os *Beta-papillomavirus* não possuem o gene E5 (DOORBAR *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2017; GRAHAM e FAIZO, 2017; TOMMASINO, 2017; WESTRICH, WARREN e PYEON, 2017).

As proteínas E4 e E5 mostram uma considerável heterogeneidade de sequência entre os tipos de HPVs, o que é pensado para refletir os diferentes tropismos e as vias de transmissão dos papilomavírus (DOORBAR *et al.*, 2016).

Os genes E5, E6 e E7 estão envolvidos na evasão imune e na otimização da eficiência de amplificação do genoma e codificam proteínas que modificam o ambiente celular, em muitos casos, executam funções semelhantes, mas não necessariamente idênticas durante o ciclo de vida de diferentes papilomavírus (DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015).

Figura 4 - Expressão superficial de moléculas de MHC impedida por HPV E5 e E7



Fonte: WESTRICH, WARREN e PYEON, 2017. HPV E5 liga-se a MHC-I, CD1d e a cadeia invariante de MHC-II no complexo de golgi e retículo endoplasmático, impedindo o seu tráfego na superfície celular. O HPV E7 de alto risco reprime a transcrição do gene de MHC-I.

As proteínas de E6 de alto risco e baixo risco têm funções diferentes, pois nos HPVs de alto risco E6 apresenta a capacidade de: 1) degradar eficientemente p53; 2) modular vias de transporte endossômicas para manter nutrientes suficientes para a sobrevivência das células durante o ciclo de vida do HPV e na progressão para malignidade; 3) capacidade de aumentar a atividade da telomerase e manter a integridade dos telômeros nas divisões celulares repetidas, fornecendo um estado de immortalização celular. Mas apesar da importância da proteína E6 na amplificação do genoma, esta se encontra ausente nos HPV 101, 103 e 108 do gênero Gamma (BERTI *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016; GANTI *et al.*, 2016; KATZENELLENBOGEN, 2017).

Uma das principais funções da proteína E7 consiste na sua capacidade de reprogramar a célula infectada para entrar na fase S, pois E7 se liga à proteína retinoblastoma (pRb) e desloca o fator de transcrição E2F que normalmente está ligado a pRb. Assim, E2F livre ativa os genes necessários para a progressão do ciclo celular através do ponto de controle do ciclo celular G1 para S. Essa capacidade de E7 ligar-se à pRb e ainda degradar os membros da família Rb, como p105, p107 (que controlam a entrada do ciclo celular na camada basal) e p130 (que está envolvida na reentrada do ciclo celular nas camadas epiteliais superiores) via proteossomo é o que diferencia E7 de alto risco e baixo risco. Essas diferenças

fundamentais entre as proteínas E7 de alto risco e de baixo risco residem na metade do N-terminal. Além disso, E7 leva a célula a um estado de instabilidade genômica ao estimular a síntese de centrosoma anormal e interage com interferon (IFN) fator regulador 1 (IRF1) e p48, contribuindo para escapar da vigilância imune e permitindo a persistência viral (BERTI *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016; GANTI *et al.*, 2016; LIMA, SILVA e RABENHORST, 2013; GRIFFIN, *et al.*, 2015).

A proteína L2 é o componente menor para a formação do capsídeo do HPV e tem funções na liberação do genoma viral dentro da célula e também um papel (juntamente com E2) na orquestração da embalagem adequada do genoma (DOORBAR *et al.*, 2016).

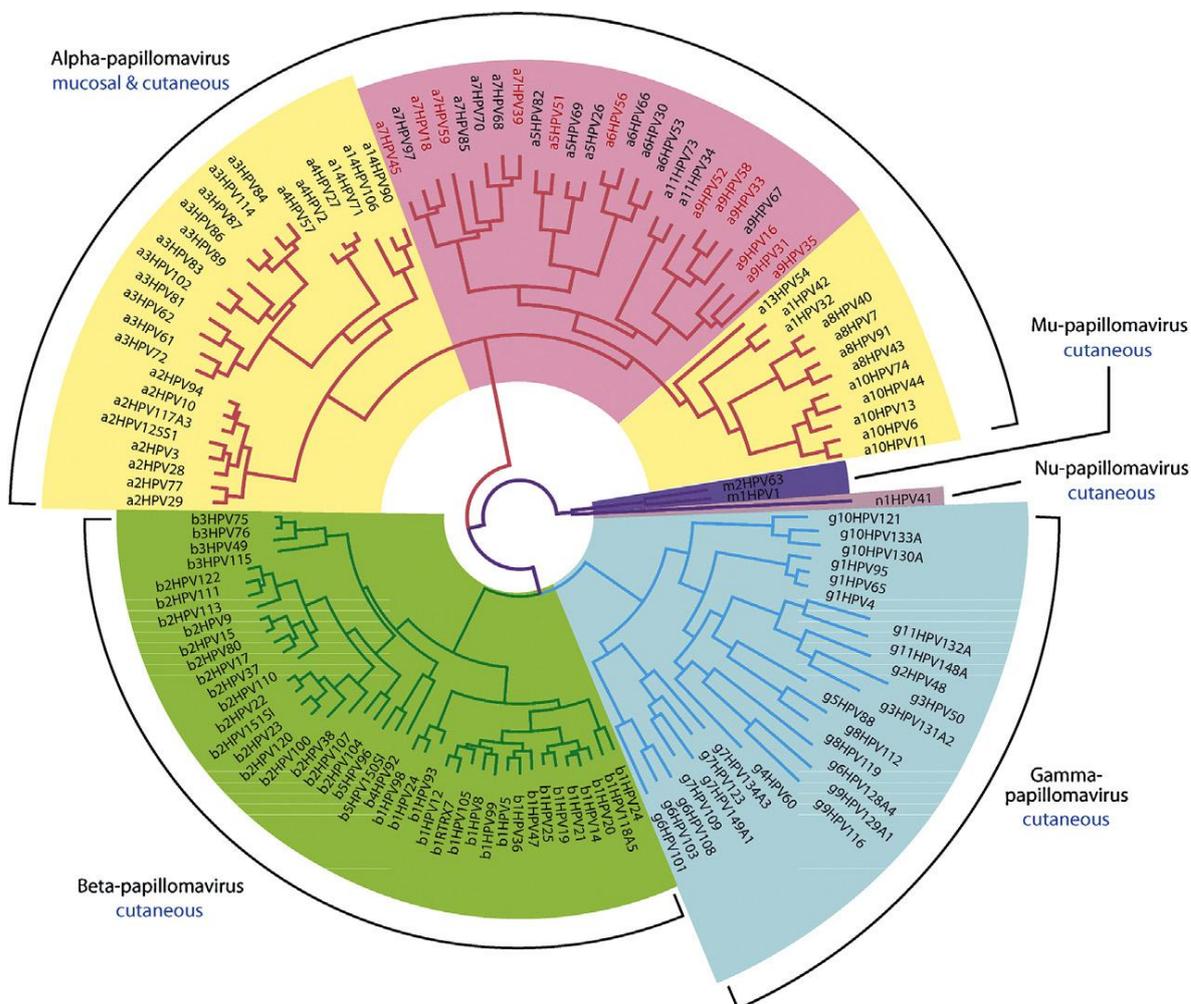
A proteína L1 é a principal proteína do capsídeo e é altamente conservada entre os papilomavírus. Tanto L1 quanto L2 são expressas apenas em células infectadas de forma produtiva, sendo normalmente expressa em células terminalmente diferenciadas na parte superior do epitélio, apresentando um papel importante na infectividade do vírus (BERTI *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, possuindo mais de 200 tipos de HPV identificados, divididos em cinco gêneros (figura 5), *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Mu-papillomavirus* e *Nu-papillomavirus*. O gênero *Alpha-papillomavirus* representa os HPV com tropismo por epitélios cutâneos e mucosos e é o gênero mais estudado por ser classificado em baixo ou alto risco para o desenvolvimento do câncer (DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA e DOORBAR, 2017; PAVE, 2017; VILLIERS *et al.*, 2004).

O gene L1 do HPV é usado para sua classificação e construção da árvore filogenética, pois é a sequência gênica mais conservada dentro do genoma do HPV. É reconhecido como um novo tipo de HPV quando mais de 10% da sequência gênica de L1 difere dos tipos já conhecidos; quando L1 difere menos de 2% é reconhecido como uma variante. A identificação da espécie é realizada quando um HPV dentro de uma espécie compartilha entre 71 a 89% da sequência de nucleótidos em L1. É identificado o gênero do HPV quando membros do mesmo gênero compartilham mais de 60% de identidade da sequência de nucleótidos em L1. Assim os HPV são identificados na árvore filogenética com uma letra grega, seguido de um número que indica a espécie e após o número que identifica o tipo do

HPV (EGAWA *et al.*, 2015; PAVE, 2017; VILLIERS *et al.*, 2004; ZUR HAUSEN, 1996).

Figura 5 - Relação evolutiva entre os Papilomavírus Humano



Fonte: EGAWA e DOOBAR, 2017. HPV de baixo risco do gênero *Alpha-papillomavirus* (cor amarelo); HPV de alto risco do gênero Alpha (cor rosa); HPV de alto risco confirmados como carcinógenos humanos com base em dados epidemiológicos (texto destacado em vermelho); HPV do gênero Mu (cor roxo); HPV do gênero Nu (cor lilás); HPV do gênero Gamma (cor azul); HPV do gênero *Beta-papillomavirus* (cor verde).

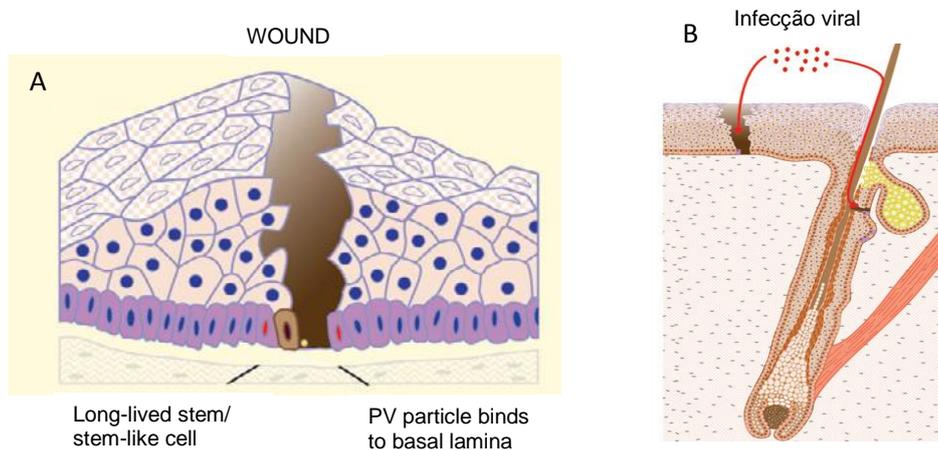
2.2.3 Patogênese do Papilomavírus Humano

A infecção pelo HPV requer a entrada do vírus em uma “célula-tronco” epitelial da camada basal, facilitada por um micro trauma que expõe a lâmina basal, que é normalmente protegida por um epitélio estratificado (figura 6). No entanto, em locais epiteliais particulares (as zonas de transformação cervical e anal, as criptas

tonsilares, as glândulas sudoríparas écrinas), a infecção pode ser menos dependente do dano epitelial (DOORBAR *et al.*, 2016; KRANJEC e DOORBAR, 2016; QUINT *et al.*, 2015).

O mecanismo de entrada do HPV na célula epitelial ainda não está muito bem compreendido, mas acredita-se que inicialmente ocorra interação da proteína L1 do HPV aos proteoglicanos de sulfato de heparano da célula epitelial, seguido por interações com uma série de proteínas e outros receptores que permitem a entrada do HPV por micropinocitose. O genoma do HPV atinge o núcleo em aproximadamente 24 horas após sua entrada na célula e possivelmente entra no núcleo após a quebra da membrana durante a mitose (GRAHAM e FAIZO, 2017).

Figura 6 - Sítios de infecção pelo Papilomavírus Humano



Fonte: DOORBAR, 2013; KRANJEC e DOORBAR, 2016. A) Acesso do HPV as células epiteliais da camada basal por microtrauma no epitélio; B) Folículo piloso como sítio de infecção pelo HPV.

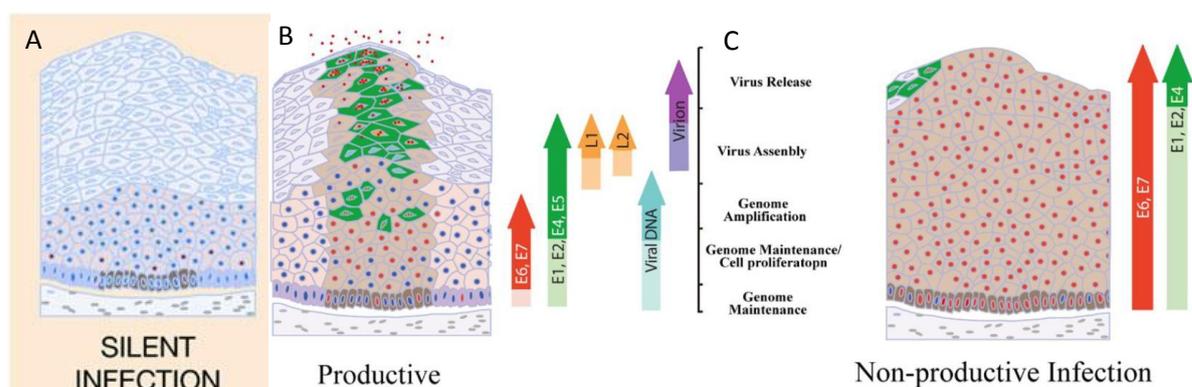
Após a entrada do vírus na célula basal, a infecção é seguida por uma fase inicial de amplificação do genoma. As proteínas de replicação viral E1 e E2 são importantes para esta fase de amplificação inicial, pois E2 liga-se a sequências palindrômicas de 12 pb em torno da origem de replicação viral e recruta a helicase E1 através de um complexo E1-E2. No ciclo de vida do vírus, a E6 e E7 desempenham um papel fundamental na condução da reentrada da fase S nas camadas epiteliais superiores para permitir a amplificação do genoma viral. A finalização do ciclo de vida do HPV envolve, em última instância, a expressão da proteína de revestimento menor (L2), a saída do ciclo celular e a expressão da

proteína de revestimento principal L1 para permitir a montagem dos vírus infecciosos no núcleo. A proteína E4 abundante nesta fase atua no processo de maturação e liberação do vírus, permitindo a infecciosidade do vírus nas camadas epiteliais superiores (ANACKER e MOODY, 2017; DAS *et al.*, 2017; DOORBAR *et al.*, 2016; QUINT *et al.*, 2015).

O papilomavírus se estabelece nas camadas epiteliais mais baixas onde as células mitoticamente ativas são encontradas e persistem nessas células como elementos extracromossômicos circulares de múltiplas cópias (epissomas). O número de cópias epissomais nessas células basais é frequentemente citado em torno de 200 por célula (DOOBAR *et al.*, 2016; EGAWA e DOOBAR, 2017).

De modo geral, a infecção pelo HPV pode ser silenciosa, produtiva ou não produtiva (figura 7). A infecção silenciosa ou assintomática é aquela na qual os genomas virais persistem na camada basal sem desenvolver a doença e sem liberação do vírus na superfície epitelial. Na infecção produtiva a expressão das proteínas E1 a E7 são rigorosamente controladas, de forma que E4, L2 e L1 permitem a liberação do vírus na superfície epitelial. Em contraste, na infecção não produtiva as proteínas E6 e E7 são anormalmente expressas e estão associadas com o desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas, pois a expressão genética viral desregulada leva a alterações genéticas secundárias na célula hospedeira e possível integração do genoma viral no cromossoma celular (DOORBAR, 2016; DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015; MEURIS *et al.*, 2016).

Figura 7 - Tipos de infecções ocasionadas pelos Papilomavírus Humano



Fonte: DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015. A) Tipo de infecção silenciosa pelo HPV; B) Tipo de infecção produtiva pelo HPV; C) Tipo de infecção não produtiva pelo HPV.

A integração do genoma viral é um evento fortuito, onde normalmente ocorre a ruptura do gene viral E2 que regula a transcrição de E6 e E7. A maioria dos cânceres cervicais contém uma ou mais cópias de HPV integrado no cromossomo do hospedeiro. A integração e a perda da regulação de E6 e E7 geralmente desencadeiam lesões de alto grau, como a Neoplasia intraepitelial cervical grau II (NIC II) e Neoplasia intraepitelial cervical grau III (NIC III). Aproximadamente 70% dos cânceres cervicais associados ao HPV 16 contêm sequências integradas, enquanto que para o HPV 18, o genoma viral é quase sempre integrado. Embora E6 e E7 sejam as principais responsáveis pela iniciação e progressão do câncer, apenas uma pequena porcentagem de pessoas infectadas com HPV de alto risco desenvolvem cânceres, isso indica uma contribuição para os fatores do hospedeiro na malignidade do HPV (DOORBAR, 2016; DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015; MEURIS *et al.*, 2016).

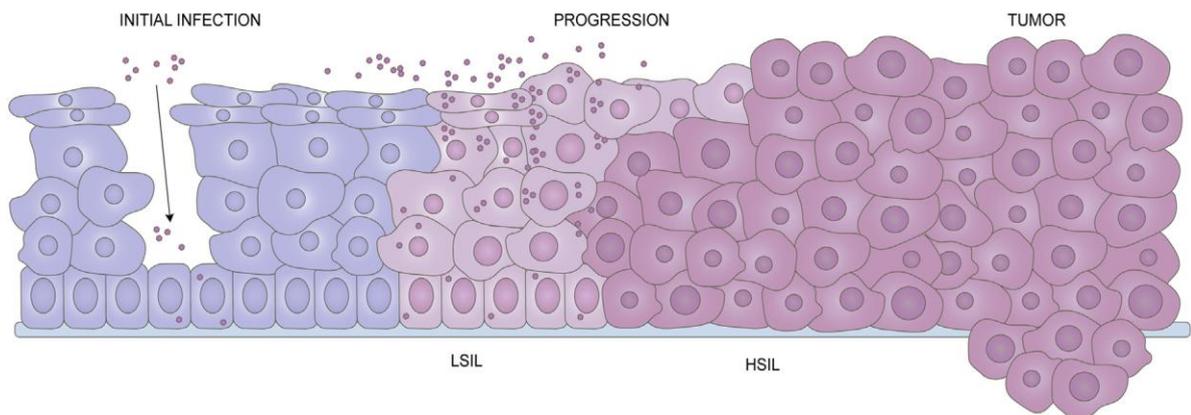
2.2.4 Manifestações clínicas do Papilomavírus Humano

Uma característica marcante da infecção pelo HPV é a sua preferência por locais anatômicos distintos, onde podem causar lesões benignas hiper-proliferativas tais como verrugas, bem como lesões inaparentes ou assintomáticas, que em alguns casos, evoluem para lesões de alto grau e o câncer. Uma das principais razões que permitiu grandes pesquisas sobre o HPV, especialmente os HPV do gênero *Alpha* como os tipos HPV-16 e HPV-18, foi a associação do HPV como causa necessária para o câncer do colo do útero de mulheres em todo mundo. E mais recentemente a associação dos HPV com outros tipos de cânceres, como o de vagina, vulva, pênis, ânus e da orofaringe (DOORBAR *et al.*, 2016; EGAWA *et al.*, 2015; EGAWA e DOORBAR, 2017; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

As manifestações de grande importância clínica que podem ocorrer no colo do útero da mulher são classificadas em lesão intraepitelial de baixo grau (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion* - LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesion* - HSIL) e o câncer invasor (figura 8). A classificação LSIL é equivalente a Neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I) e HSIL é equivalente a NIC II e III. A LSIL apresenta menor risco de progressão para o carcinoma invasivo por normalmente apresentar uma infecção produtiva

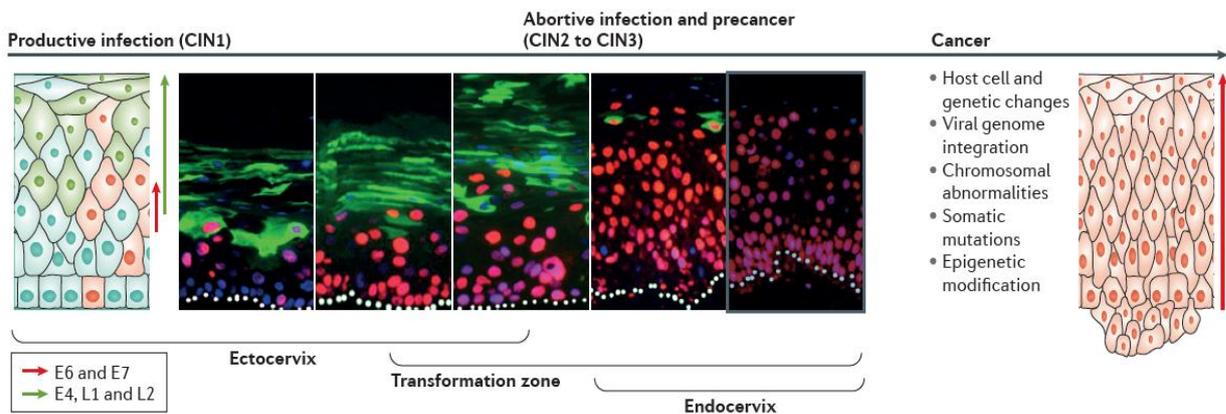
(expressão regulada das proteínas E1 a E7 e L1 e L2), no entanto, as HSIL apresentam maior risco de progressão para o carcinoma invasor por apresentar uma infecção não produtiva (expressão desregulada das proteínas E6 e E7) (figura 9) (DOORBAR *et al.*, 2016; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Figura 8 - Manifestações clínicas na progressão do câncer do colo do útero



Fonte: BERTI *et al.*, 2017. Diferentes estádios da carcinogênese cervical, passando por infecção inicial por HPV (assintomática), que pode progredir para LSIL e posterior para HSIL, culminando em carcinoma invasor do colo do útero.

Figura 9 - Eventos moleculares durante o NIC I, II, III e o câncer no colo do útero

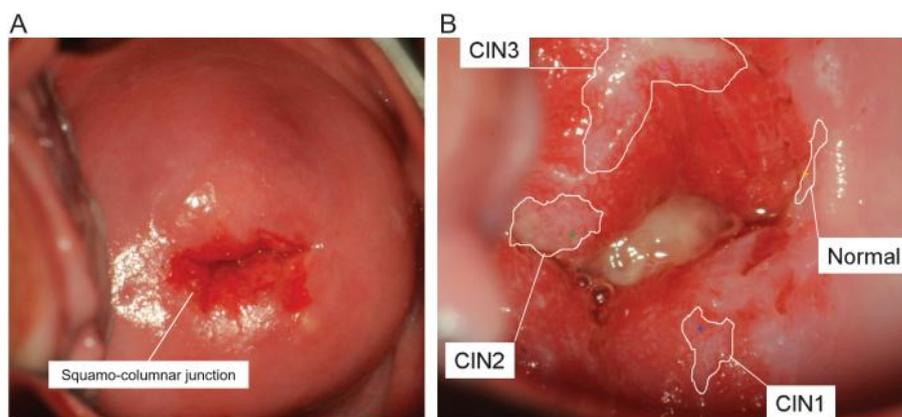


Fonte: SCHIFFMAN *et al.*, 2016. Na região da ectocervix do colo do útero geralmente se observa a infecção produtiva, no qual ocorre a expressão regulada da proteínas E1 a E7 e L1 e L2. Na zona de transformação e na endocervix observa-se frequentemente a infecção não produtiva pelo HPV, no qual a expressão desregulada de E6 e E7 desencadeiam mecanismos de alteração celular.

A maioria dos cânceres do colo do útero surge na zona de transformação (figura 10) e endocervix adjacente, uma região do colo do útero que compreende inicialmente o epitélio colunar, mas depois sofre metaplasia (particularmente na

puberdade) para formar uma camada epitelial escamosa completamente diferenciada (SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Figura 10 - Zona de transformação cervical e diferentes graus de lesões intraepiteliais



Fonte: SCHIFFMAN *et al.*, 2011. A) A zona de transformação cervical sem alterações intraepiteliais aparentes. B) A zona de transformação cervical apresenta diferentes graus de neoplasia intraepitelial.

Apesar da infecção pelo HPV desencadear eventos iniciadores da transformação neoplásica, estes não são suficientes para progressão para o câncer invasivo, sendo necessários cofatores que influenciam a infecção pelo HPV. Estes cofatores incluem variáveis do vírus, do hospedeiro e cofatores comportamentais. Os cofatores virais incluem diferenças genéticas (e possivelmente epigenéticas), como a persistência e a carga viral da infecção pelos HPVs de alto risco. Os cofatores do hospedeiro incluem principalmente a resposta do sistema imune e a idade. Os cofatores comportamentais incluem principalmente o tabagismo, uso prolongado de contraceptivos hormonais, multiparidade, precocidade sexual e multiplicidade de parceiros (MARTINS, 2014; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

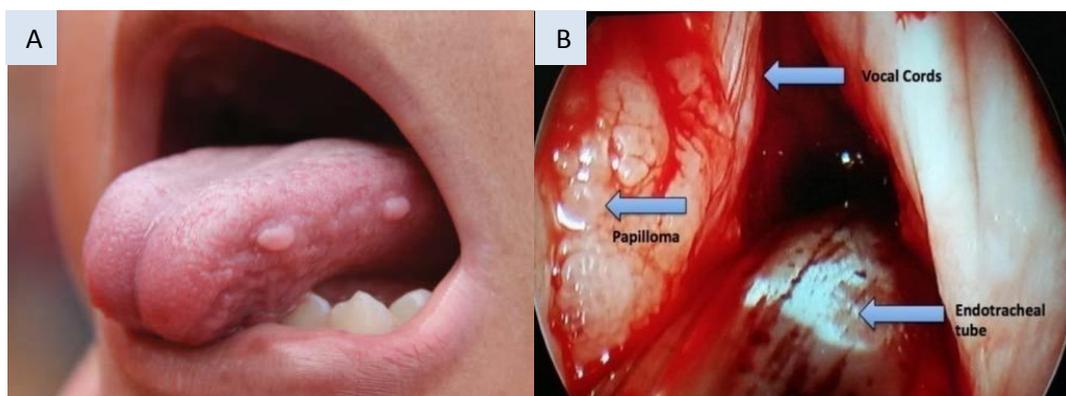
As verrugas são outras manifestações clínicas comuns e característica do HPV, especialmente dos tipos de baixo risco oncogênico, que podem ocorrer em diversos locais do corpo, como na face, pescoço, região genital, joelhos, mãos e pés. Estas verrugas podem se apresentar na forma de condiloma acuminado, que é uma manifestação clínica comum na área genital de homens e mulheres, sendo que nos homens os condilomas genitais encontram-se mais comumente no sulco coronal, na glândula do pênis e no eixo peniano. Nas mulheres, as lesões geralmente

afetam a genitália externa e o colo do útero. Os tipos de HPV6 e 11 são os mais detectados nessas lesões (DOORBAR *et al.*, 2016; LETO *et al.*, 2011).

A hiperplasia epitelial focal é uma doença da mucosa oral que é mais comum em crianças e mulheres, com predominância racial por índios americanos, esquimós e algumas comunidades africanas. As lesões estão localizadas principalmente no lábio inferior, mas com menor frequência podem afetar o lábio superior, a língua, a mucosa oral, a orofaringe, o palato e o assoalho da boca (figura 11-A). São caracterizadas por apresentar múltiplas pequenas pápulas, de cor rósea, individualizadas ou formando placas, sendo o HPV 13 e 32 os tipos mais detectados nessas lesões (DOORBAR *et al.*, 2016; LETO *et al.*, 2011).

A Papilomatose Respiratória Recorrente (PRR) é outra manifestação clínica causada pelo HPV e resulta no crescimento de papilomas no trato respiratório, que podem causar comprometimento das vias aéreas, levando a disfonia, dificuldade respiratória e oclusão das vias aéreas (figura 11-B). Esta lesão é geralmente causada pelo HPV6 e HPV 11, sendo mais comumente observada na população pediátrica do que em adultos. A PRR provoca uma morbidade significativa e pode requerer múltiplas intervenções cirúrgicas (com recorrência regular após o tratamento) (DOORBAR *et al.*, 2016; SULLIVAN, CURTIS e MOUZAKES, 2017; WHO, 2017).

Figura 11 - Hiperplasia epitelial focal e Papilomatose Respiratória Recorrente causada pelo Papilomavírus Humano



Fonte: LETO *et al.*, 2011; SEGNA *et al.*, 2017. A) Hiperplasia epitelial focal localizada na lateral esquerda da língua de uma criança indígena do Parque Indígena do Xingu; B) Papilomas acima e abaixo de cordas vocais intubadas.

2.2.5 Diagnóstico molecular do Papilomavírus Humano

Atualmente diversas técnicas de diagnóstico molecular do HPV são empregadas no mundo, sendo consideradas mais sensíveis e específicas, em comparação com métodos convencionais para o teste de HPV. No entanto, a detecção do DNA viral por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido sempre o padrão ouro para o diagnóstico do HPV, devido a sua grande capacidade de gerar um bilhão de cópias a partir de uma única molécula de DNA de cadeia dupla após 30 ciclos de amplificação. A captura híbrida e a hibridação *in situ* também são técnicas amplamente utilizadas na detecção molecular do HPV (ABREU *et al.*, 2012; RAMZAN *et al.*, 2015; VENCESLAU *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, os estudos epidemiológicos das infecções pelo HPV, realizados por meio de técnicas de diagnósticos moleculares, revelaram que alguns tipos de HPV causam praticamente todos os cânceres cervicais no mundo. Além do mais, estes estudos epidemiológicos foram o ponto de partida para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HPV, o que torna indiscutível a importância do diagnóstico molecular do HPV para os avanços científicos contra o câncer do colo do útero (SCHIFFMAN, 2017).

Estudos recentes têm defendido que a realização de teste de detecção do HPV é mais sensível e oferece muitas vantagens em relação à citologia convencional e de base líquida na triagem primária para o câncer cervical. Dentre as vantagens estão: 1) O teste do HPV é mais sensível do que a citologia na detecção de lesões precancerosas de alto grau; 2) Um teste negativo de HPV proporciona maior e mais tempo de segurança contra o pré-câncer cervical e câncer porque a infecção por HPV é um evento que ocorre no processo cancerígeno; 3) O teste do HPV será mais econômico devido a intervalos de triagem prolongados e possíveis custos menores devido à expansão contínua do mercado e ao teste de alto volume; 4) O teste do HPV não é subjetivo e é mais reprodutível, pode ser automatizado, centralizado e de melhor qualidade controlada com alto rendimento; 5) Oferece a oportunidade de auto-amostragem, o que poderia ajudar a reduzir as disparidades, aumentando a captação de seleção entre os não-aderentes atuais; 6) É mais eficaz na detecção de lesões precursoras de adenocarcinoma cervical; 7) Espera-se que seu desempenho (sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo seja menos

afetado negativamente como consequência da redução da prevalência de lesão por programas efetivos de vacinação contra HPV. Mas neste cenário ainda se avalia a necessidade de distinguir as mulheres com maior risco de câncer entre o grupo das HPV-positivas e assim adotar uma melhor abordagem que evite o número de referências desnecessárias à colposcopia e biópsia (ISIDEAN *et al.*, 2016; TOTA *et al.*, 2017a; TOTA *et al.*, 2017b).

2.2.6 Prevenção contra o Papilomavírus Humano

Atualmente três vacinas profiláticas contra o HPV estão disponíveis e comercializadas em muitos países do mundo. A vacina Cervarix® bivalente é fabricada pelo laboratório *GlaxoSmithKline* (GSK) e fornece proteção contra os HPV 16 e 18. A vacina Gardasil® quadrivalente é fabricada pelo laboratório *Merck Sharp & Dhome* (MSD) e protege contra os HPV 6, 11, 16 e 18. A vacina Gardasil-9® nonavalente também fabricada pelo laboratório MSD, fornece proteção contra os HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Todas as três vacinas usam tecnologia de DNA recombinante e são preparadas a partir da proteína L1 purificada que se auto-monta para formar capsídeos vazios (sem DNA viral) específicos do tipo HPV, denominadas partículas semelhantes a vírus (VLPs - *virus-like particles*) (SCHIFFMAN *et al.*, 2016; WHO, 2017).

A vacina quadrivalente foi licenciada pela primeira vez em 2006, a vacina bivalente em 2007 e a vacina nonavalente em 2014. Segundo a Organização Mundial de Saúde, até março de 2017, 71 países (37%) introduziram a vacina contra o HPV no seu programa nacional de imunização para meninas e 11 países (6%) introduziram a vacina contra o HPV para meninos (WHO, 2017).

Em 2013 no Brasil, a rede pública de saúde disponibilizou pela primeira vez a vacina Cervarix® bivalente no Estado do Amazonas, que tem o câncer do colo do útero como o tipo de câncer mais frequente na população feminina do estado, esta vacinação foi disponibilizada para meninas entre 11 a 13 anos. Em 2014, o Ministério da Saúde introduziu a vacina Gardasil® quadrivalente no Calendário Nacional de Vacinação para meninas entre 11 e 13 anos, com esquema vacinal de 3 doses (0, 6 e 60 meses). Em 2015, considerando a maior frequência de neoplasias anogenitais e lesões intraepiteliais decorrentes do HPV em pacientes com HIV/Aids,

o Ministério da Saúde ampliou a faixa etária da vacina contra o HPV para mulheres soropositivas de 9 a 26 anos de idade, com o esquema vacinal de três doses (0, 6 e 60 meses). E em 2016, o Ministério da Saúde adotou o esquema de vacinação contra o HPV para 2 doses (0 e 6 meses) em meninas na faixa etária de 9 a 13 anos (INCA, 2017; BRASIL, 2017b; BRASIL, 2015).

Em 2017, o Ministério da saúde novamente ampliou o calendário nacional de vacinação para meninas de 9 a 14 anos e para meninos entre 11 e 14 anos, com esquema de 2 doses com intervalo de 0 e 6 meses e estendeu a vacinação para homens e mulheres de 9 a 26 anos, portadores de HIV/Aids e os transplantados de órgãos sólidos, de medula óssea e pacientes oncológicos, com esquema de 3 doses com intervalo de 0, 2 e 6 meses (BRASIL, 2017c).

Estudos apontam que a vacina Gardasil® quadrivalente confere proteção superior a 95% dos casos de risco de lesões cervicais, vulvares e vaginais de alto grau relacionadas com HPV16 e HPV18 e de verrugas genitais relacionadas ao HPV6 / 11. Evidenciando assim, que a vacinação contra o HPV confere redução a curto e médio prazo, na ocorrência de verrugas genitais e alterações citológicas cervicais (HAGHSHENAS *et al.*, 2017; MUÑOZ *et al.*, 2010).

2.3 Infecção pelo Papilomavírus Humano na gestação

2.3.1 Epidemiologia do Papilomavírus Humano na gestação

Os índices de prevalência da infecção pelo HPV variam de acordo com a população avaliada e a técnica de diagnóstico utilizada. Em gestantes, estudos internacionais utilizando principalmente PCR como método diagnóstico têm encontrado prevalências variando entre 13,4% e 45% (quadro 3), enquanto estudos brasileiros mostram números mais elevados – 17,8% a 61,9% em gestantes saudáveis, e até 62,7% a 84,3% em gestantes HIV-positivas (quadro 4).

Quadro 3 – Estudos realizados no mundo sobre a prevalência da infecção pelo HPV em gestantes

Prevalência	n	População	Amostra	Local	Técnica	Autores
27,9%	93/333	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Cervical	USA	PCR MY09 – CapturaHíbrida - hemi-nested MY09/ GP5+	SMITH <i>et al.</i> , 2010
3%	10/333		Oral			
17,8%	38/213	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Cérvico-vaginal	Lituânia	PCR HPV Master Mix solution	DOMŽA <i>et al.</i> , 2011
35,8%	54/151	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Cervical	Japão	PCRPGMY09/PGMY11	YAMASAKI <i>et al.</i> , 2011
16,4%	54/329	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Cervical	Finlândia	Nested-PCR MY09/11 GP5+/GP6+	KOSKIMAA <i>et al.</i> , 2012
15,4%	72/469	Gestantes com > 36 semanas de gestação	Cervical	Coreia	PCRreal-timeSYBR Green I	HAHN <i>et al.</i> , 2013
13,4%	422/3139	Gestantes saudáveis	Cervical	China	Gene Chip technology	HONG <i>et al.</i> , 2013
24,3%	233*/960	Gestantes saudáveis	Cervical	Coreia	GG HPV Chip Kit	KIM <i>et al.</i> , 2014
12,5%	19/152	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Oral	Polônia	PCRMY09/MY11	SKOCZYŃSKI, GOŹDZICKA-JÓZEFIAK e KWAŚNIEWSKA, 2015
15,79%	24/152		Cervical			
45%	75/167	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Cérvico-vaginal	Canadá	Linear Array	TROTIER <i>et al.</i> , 2016
14%	18/130		Escova Placenta			
5%	6/130		Biópsia Placenta			

* 233 = 189 gestantes + 44 mulheres no pós-parto

Quadro 4 – Estudos realizados no Brasil sobre a prevalência da infecção pelo HPV em gestantes

Prevalência	n	População	Amostra	Local	Técnica	Autores
45,3%	595*	Gestantes na 1ª consulta pré-natal	Cérvico-vaginal	Manaus-AM	Captura Híbrida	BRASIL, 2008
17,8%	8/45	Gestantes HIV negativa	Cervical	Recife-PE	Captura Híbrida II®	BRANDÃO, LACERDA e XIMENES, 2010
62,7%	32/51	Gestantes HIV positiva				
84,3%	118/140	Gestantes HIV positiva	Cérvico-vaginal	Rio Janeiro /RJ	Nested-PCR MY09/11 MY09/GP5	MEYRELLES <i>et al.</i> , 2013
54,0%	34/63	Gestantes em consulta pré-natal de rotina	Urina	Frederico Westphalen/ Rio Grande do Sul	PCR GP5+/GP6+	FRANCISCATTO <i>et al.</i> , 2014
61,9%	39/63		vaginal			
25,3%	23/91	Gestantes sem histórico de infecção pelo HPV	Cervical	Sul do Brasil	PCR GP5+/GP6+	SALCEDO <i>et al.</i> , 2015
4%	6/150	Gestantes selecionadas por conveniência em um Ambulatório de Ginecologia e Obstetria	Biópsia Placenta	Rio Grande	Nested-PCR (MY09/11 GP5/GP6)	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2015
2,2%	3/138		Sangue arterial do cordão umbilical			
0,84%	1/118		Colostro			

* Número não informado de gestantes que efetivamente realizaram o teste para HPV

2.3.2 Manifestações clínicas do HPV em gestantes e seus conceptos

As manifestações clínicas do HPV na gestação podem estar ausentes, podem apresentar sintomas discretos (como irritação, prurido vulvar e vaginal) ou apresentar lesões verrucosas dispersas pela vagina, colo e vulva. Alterações hormonais favorecem a replicação viral, sendo comum a formação de condilomas gigantes (figura 12) (MARTINS, 2014; PANISSET e FONSECA, 2009).

Figura 12 - Condiloma acuminado em gestante



Fonte: MARTINS, 2014. A) Gestante no segundo trimestre de gravidez com condiloma exuberante; B) Mesma paciente em outro ângulo no exame.

Os condilomas acuminados podem ser exuberantes e chegar a obstruir o canal de parto, interferindo a passagem do bebê. Como os condilomas durante a gestação podem proliferar e tornarem-se friáveis, muitos especialistas indicam a sua remoção, se possível, na 1ª metade da gestação, com risco secundário de infecção, hemorragia, ulceração, distocia, rotura prematura das membranas ovulares, corioamnionite. A cesariana deve ser indicada somente se houver obstrução mecânica do canal de parto e/ou risco de hemorragia grave. As lesões pequenas, microscópicas ou latentes não contraindicam o parto vaginal. Todas as gestantes com verrugas genitais devem ser orientadas sobre o risco de contaminação de seus filhos e da papilomatose laríngea (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012; BRASIL, 2014).

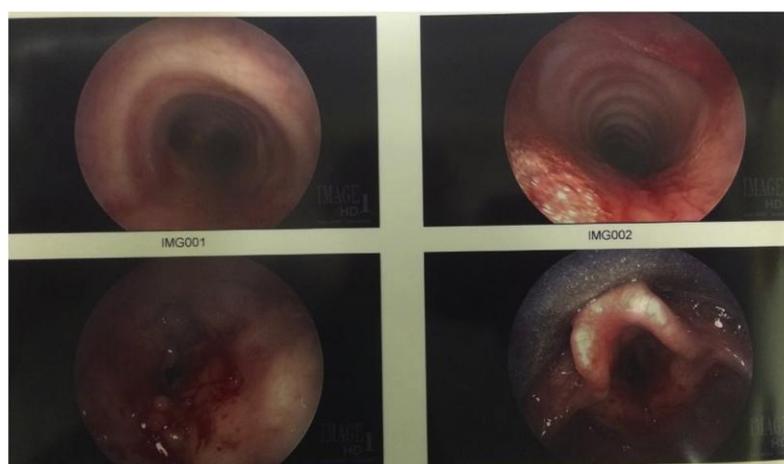
A Papilomatose respiratória recorrente (PRR) é uma doença caracterizada pelo crescimento de múltiplas lesões exofíticas na laringe, podendo ocorrer ao longo

de todo o aparelho respiratório. Embora o modo de transmissão não seja totalmente compreendido, é teorizado que a transmissão vertical de HPV da mãe para o filho ocorra por infecção ascendente devido à exposição aos papilomas no trato genital, pela infecção transplacentária neonatal ou intrauterina. A relação sexual, a auto-inoculação e a transmissão horizontal através da saliva também foram descritas e, mais comumente, afetam crianças e adultos mais velhos (SULLIVAN, CURTIS e MOUZAKES, 2017; SKOCZYŃSKI, GOŹDZICKA-JÓZEPIAK e KWAŚNIEWSKA, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

A PRR é normalmente associada ao HPV tipo 11, e embora raras, as crianças com PRR são incapazes de resolver a infecção e precisam ser tratadas por cirurgia de repetição para reduzir o tamanho do papiloma e para manter uma via aérea pérvia (DOORBAR *et al.*, 2016).

Sullivan, Curtis e Mouzakes (2017), relata no estudo de caso de uma criança que nasceu com idade gestacional de 34 semanas, de mãe HPV positivo. Aos 12 meses de idade essa criança foi diagnosticada com papiloma da laringe obstrutivo, onde exames subsequentes revelaram papiloma anterior com envolvimento de cordas vocais. Foram identificados os HPV 6 e 11 por hibridização *in situ*. Esta criança teve um curso grave da doença e com menos de três anos de idade já havia passado por 13 cirurgias (figura 13).

Figura 13 - Papilomatose Respiratória Recorrente causada pelo HPV6 e 11



Fonte: SULLIVAN, CURTIS e MOUZAKES, 2017. Imagem do papiloma em laringoscopia direta e broncoscopia de criança em tratamento para PRR.

Diante deste panorama de escassez de estudos epidemiológicos sobre a infecção pelo HPV em gestantes no Brasil, especialmente no Amazonas, é de fundamental importância a realização de pesquisas sobre a prevalência do HPV durante a gestação, assim como estudos de investigação sobre o tipo de amostra que tenha a característica de ser menos invasiva e de fácil obtenção, mas que apresente resultados semelhantes quando comparado com as amostras cervicais, para que desta forma, gestantes em situações de risco gestacional possam realizar o procedimento com segurança, além de proporcionar maior adesão do público alvo.

Portanto, para realização destes estudos se faz necessário o uso de ferramentas da biologia molecular, o qual proporciona inúmeras vantagens, especialmente a alta sensibilidade e especificidade na detecção do HPV. Além do mais, o uso de técnicas moleculares é imprescindível para a associação do HPV com o câncer, tornando-se o ponto de partida para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas. Neste contexto, diversos pesquisadores têm apresentado evidências científicas sobre os benefícios da introdução de testes moleculares do HPV (ISIDEAN *et al.*, 2016; SCHIFFMAN, 2017; TOTA *et al.*, 2017a; TOTA *et al.*, 2017b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a prevalência da infecção pelo Papilomavírus Humano em gestantes atendidas no município de Coari, Amazonas, Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a prevalência de infecção por HPV em gestantes no segundo trimestre de gestação, atendidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) no município de Coari, Amazonas, Brasil;

- Avaliar a concordância da detecção do HPV entre amostras de urina e cérvico-vaginal dessas gestantes atendidas nas UBS do município de Coari-AM;

- Descrever a caracterização sócio-demográfica e clínico-epidemiológica dessas gestantes;

- Relacionar a infecção por HPV com as variáveis sócio-demográficas e clínico-epidemiológicas das gestantes, determinando possíveis associações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal com gestantes em acompanhamento de pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Coari-AM.

Este estudo é parte do projeto “Epidemiologia das infecções sexualmente transmissíveis em gestantes”, aprovado em 2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob o CAAE nº 50907415.3.0000.5020 (Anexo 1).

4.1 População e amostra

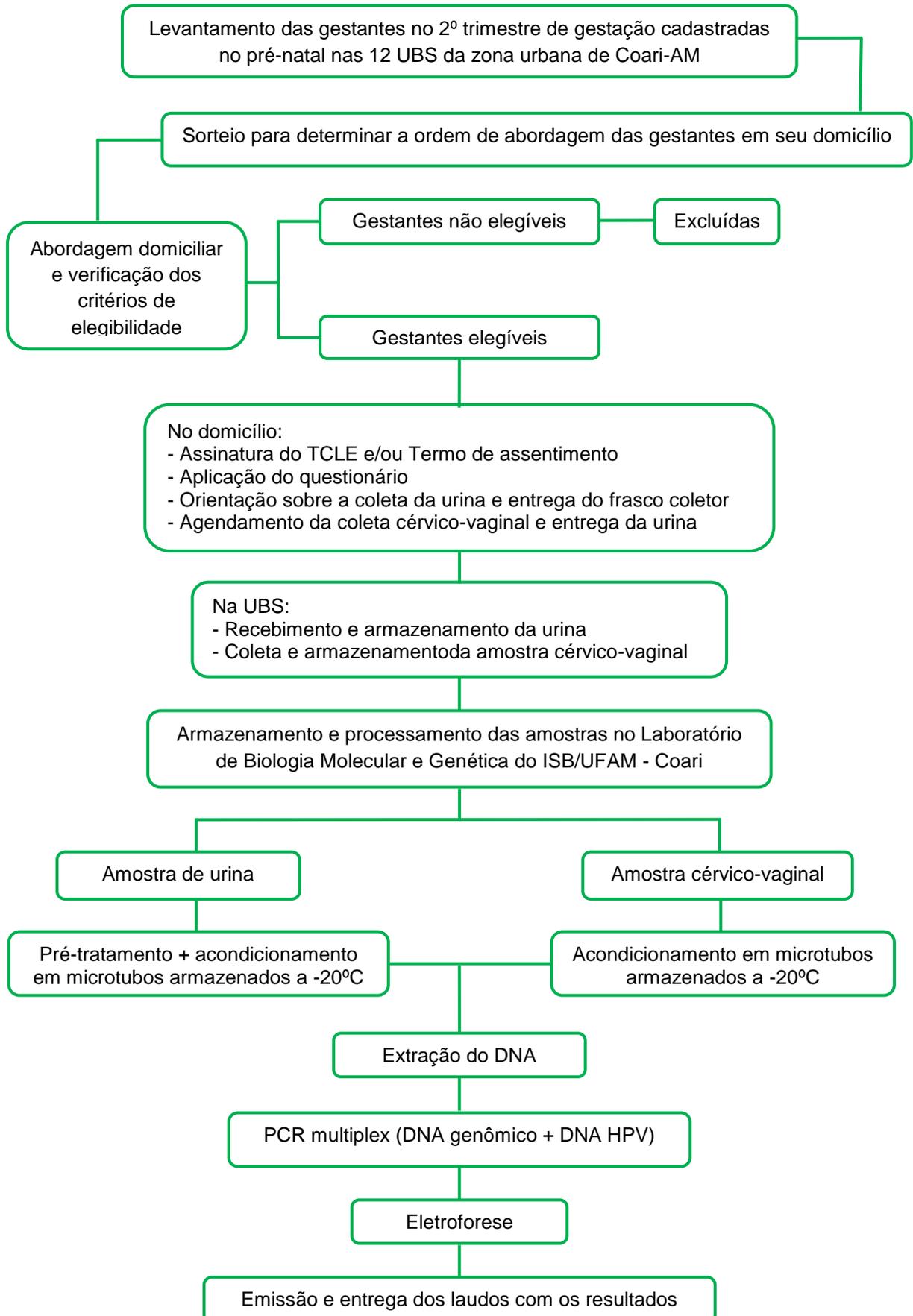
A população consistiu de gestantes cadastradas na Atenção ao Pré-natal da rede de Atenção Básica de Saúde do município de Coari, Amazonas.

O município de Coari-AM possui uma população de 75.965 habitantes, conforme dados do último censo realizado em 2010, com 363 km de distância em linha reta até a capital Manaus (IBGE, 2017).

Para o cálculo amostral, tomou-se como base uma população de 1.729 gestantes (SINASC, 2013), com uma prevalência esperada de IST de 1,4%, (segundo dados do DATASUS de infecção por IST em gestantes de Coari no ano de 2013), e a margem de erro de 3%. A partir destes dados, estimou-se um número mínimo de 58 gestantes para participar do estudo, tendo sido alcançado um número final de 110 participantes, cujas amostras foram coletadas no período de Julho de 2016 a Março de 2017.

Para seleção das participantes, foi realizada uma relação de todas as gestantes no segundo trimestre de gestação que estavam cadastradas no acompanhamento de pré-natal das 12 UBS da zona urbana do município de Coari (figura 14). Em seguida foi realizado o sorteio para determinar a ordem de abordagem das referidas gestantes em seu domicílio, ocasião em que a mulher seria convidada a participar e que seriam verificados os critérios de inclusão e exclusão.

Figura 14 - Fluxograma das etapas desenvolvidas nesta pesquisa



Os critérios de inclusão foram:

- Gestantes em acompanhamento pré-natal nas UBS da zona urbana do município de Coari, sem delimitação de idade.

- Idade gestacional entre 14 a 27 semanas (2º trimestre de gestação).

Os critérios de exclusão foram:

- Idade gestacional entre 1 e 13 semanas e a partir de 28 semanas (1º e 3º trimestre de gestação).

- Gestantes com alguma situação de risco, tais como: sangramento vaginal na gravidez atual, histórico de queda, placenta prévia, perda de líquido amniótico, hematêmese, hematoma retrocoriônico, colo do útero dilatado, fator Rh negativo da mãe, diagnóstico de doença infecciosa atual (ex: dengue), dentre outras.

As gestantes menores de 18 anos participaram da pesquisa com o consentimento do responsável (através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE) e do assentimento das mesmas (através da assinatura do Termo de Assentimento por parte da participante) (Anexos 2 e 3).

O critério de inclusão de gestantes entre 14 a 27 semanas foi estabelecido para evitar que a coleta da amostra cérvico-vaginal fosse associada com intercorrência ou evolução clínica comuns da gravidez, como por exemplo, o aborto espontâneo no primeiro trimestre de gestação e o início do trabalho de parto prematuro ou a termo no terceiro trimestre de gestação.

4.2 Entrevista e coleta das amostras

As gestantes que atenderam aos critérios de inclusão foram esclarecidas e convidadas a participar da pesquisa. Todas as que concordaram em participar assinaram o TCLE ou o Termo de assentimento e logo após responderam um questionário padrão contendo perguntas estruturadas e não-estruturadas sobre as principais informações sócio-demográficas, comportamentais, obstétricas e clínicas (Anexo 4).

Em seguida, as gestantes foram orientadas sobre os procedimentos da coleta da urina e da coleta cérvico-vaginal. A amostra de urina deveria ser coletada do primeiro jato do dia (20 mL) em frasco coletor estéril, no mesmo dia marcado para a coleta cérvico-vaginal na UBS em que a mulher estava cadastrada. As mulheres

receberam o frasco coletor da equipe de pesquisa e foram instruídas a vedar o frasco imediatamente após a coleta.

No dia agendado, ao chegarem à UBS, entregavam as amostras de urina, que eram imediatamente colocadas em sacos plásticos identificados e acondicionadas na caixa térmica (2 a 8°C). Logo após, as gestantes eram encaminhadas ao consultório da UBS para a coleta cérvico-vaginal (parede vaginal, ectocérvice e/ou endocérvice) pela enfermeira. A coleta cérvico-vaginal foi realizada com *swab* estéril, que após a coleta, era imediatamente imerso em um tubo contendo 1 mL de tampão TRIS-EDTA (TRIS-HCl 10 mM e EDTA 1mM pH 8,0) e acondicionados em uma segunda caixa térmica (2 a 8°C). Finalizada as coletas na UBS, as amostras eram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Genética do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – ISB/UFAM em Coari, onde foram armazenadas e processadas.

4.3 Processamento laboratorial

No laboratório, as amostras cérvico-vaginais foram transferidas para microtubos identificados e armazenadas a -20°C. Os tubos com as amostras cérvico-vaginais foram vortexadas por 15 segundos e passadas para microtubos de 1,5 mL, divididas em 3 alíquotas e armazenadas no freezer a -20°C até o procedimento de extração de DNA.

As amostras de urina, devido a presença de contaminantes e inibidores de PCR, passaram por um pré-tratamento (adaptado de ZUIVERLOON *et al.*, 2011; ZUIVERLOON *et al.*, 2012), que consistiu em: 1) homogeneizar a amostra de urina; 2) transferir 14 mL para um tubo falcon de 15 mL com auxílio de uma seringa; 3) Centrifugar a amostra durante 20 min a 2000 g; 4) lavar o *pellet* com 10 mL de PBS e repetir a centrifugação anterior; 5) ressuspender o *pellet* em 1 mL de PBS; 6) centrifugar a amostra durante 10 min a 3000 g; 7) descartar o sobrenadante; 8) ressuspender o *pellet* com 600 µL de PBS; 9) fazer 3 alíquotas de 200 µL em microtubos estéreis de 1,5 mL e armazenar no freezer a -20°C até o procedimento de extração de DNA.

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA em um período inferior a 60 dias.

4.3.1 Extração do DNA

O DNA das amostras de urina foi extraído com o Kit comercial QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, ALEMANHA). O DNA das amostras cérvico-vaginais foi extraído com o kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, ALEMANHA). Os protocolos foram seguidos de acordo com as recomendações do fabricante (Anexos 5 e 6).

4.3.2 Detecção do HPV e verificação da eficiência da extração do DNA

Para o diagnóstico molecular da infecção pelo HPV em gestantes no município de Coari-AM, foi realizada a PCR convencional nas amostras de urina e de *swab* cérvico-vaginal, utilizando-se os iniciadores genéricos PGMY09/11 (GRAVITT *et al.*, 2000), que amplificam um fragmento de 450 pb da região L1 de vários tipos de HPVs (quadro 5).

Quadro 5 - Sequências dos *primers* PGMY09/11

<i>Primer</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')							
PGMY11-A	GCA	CAG	GGA	CAT	AAC	AAT	GG
PGMY11-B	GCG	CAG	GGC	CAC	AAT	AAT	GG
PGMY11-C	GCA	CAG	GGA	CAT	AAT	AAT	GG
PGMY11-D	GCC	CAG	GGC	CAC	AAC	AAT	GG
PGMY11-E	GCT	CAG	GGT	TTA	AAC	AAT	GG
PGMY09-F	CGT	CCC	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09-G	CGA	CCT	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09-H	CGT	CCA	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09-I	G	CCA	AGG	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09-J	CGT	CCC	AAA	GGA	TAC	TGA	TC
PGMY09-K	CGT	CCA	AGG	GGA	TAC	TGA	TC
PGMY09-L	CGA	CCT	AAA	GGG	AAT	TGA	TC
PGMY09-M	CGA	CCT	AGT	GGA	AAT	TGA	TC
PGMY09-N	CGA	CCA	AGG	GGA	TAT	TGA	TC
PGMY09-P	G	CCC	AAC	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09-Q	CGA	CCC	AAG	GGA	AAC	TGG	TC
PGMY09-R	CGT	CCT	AAA	GGA	AAA	TGG	TC
HMB01	GCG	ACC	CAAA	TGC	AAA	TTG	GT

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

Para a verificação da eficiência da extração do DNA das amostras, foi utilizado como controle interno da reação os iniciadores PCO4/GH20 (BERNARD *et al.*, 1994), que amplificam um fragmento de 268 pb do gene da β -globina humana (quadro 6). Os componentes e volumes desta PCR *multiplex* estão descritos no quadro 7.

Quadro 6 - Sequências do *primer* PCO4/GH20

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')
PCO4	CAACTTCATCCACGTTCCACC
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

Fonte: JENAB *et al.*, 2010.

Quadro 7 - Componentes e volumes da PCR multiplex para amplificação de 268 pb do gene da β -globina humana e amplificação de 450 pb da região L1 do HPV utilizando os iniciadores PCO4/GH20 e PGMY09/11

Componentes	Volumes
Água ultra pura	14,5 μ L
Tampão 10X	2,5 μ L
Magnésio 50mM	0,8 μ L
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM (Invitrogen, BRASIL)	0,5 μ L
PGMY09/11	0,5 μ L
PCO4	0,5 μ L
GH20	0,5 μ L
<i>Platinum Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen, BRASIL)	0,2 μ L
DNA	5,0 μ L
Volume Final	25,0 μ L

Em todas as PCRs foi utilizada água como controle negativo e uma amostra infectada por HPV previamente conhecida como controle positivo. Após a preparação dos componentes, a PCR foi processada no termociclador *Veriti* (*Applied Biosystem*) nas condições descritas no quadro 8.

Quadro 8 - Processamento da PCR multiplex no termocilador *Veriti* para amplificação do fragmento do gene da β -globina humana e do gene L1 do HPV

Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Reação
1	95	5 minutos	Desnaturação inicial
40	95	1 minuto	Desnaturação
	55	1 minuto	Anelamento
	72	1 minuto	Extensão
1	72	10 minutos	Extensão final

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (LGC Biotecnologia), usando tampão TBE (Tris borato e EDTA – DNA Express Biotecnologia). Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de 100 pb (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Os fragmentos de DNA foram visualizados com o auxílio de um transiluminador Kodak Gel Logic 212 (Kodak, EUA) e fotografados em câmera digital *Olympus SP – 500uz*.

4.4 Análise estatística

Os dados foram apresentados por meio de tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Na análise dos dados quantitativos, quando aceita a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a média e o desvio-padrão (Dp). Na comparação do PCR no *Swab* em relação à urina ainda foi calculada a concordância observada, o índice *Kappa* e os respectivos Intervalos de Confiança ao nível de 95% (IC95%). Já na análise dos dados categóricos em relação ao resultado do PCR para o HPV foi calculado o *Odds Ratio* (OR) e aplicado o teste do qui-quadrado com correção de *Yates*, sendo que na impossibilidade de aplicar o teste de *Yates* optou-se pelo teste exato de *Fisher* (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise dos dados foi o programa Epi Info versão 7.2 para *windows* que é produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças Norte-americano – CDC (www.cdc.gov/epiinfo). O nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5%.

5 RESULTADOS

No período de julho de 2016 a março de 2017, 249 gestantes foram abordadas em seus domicílios. Destas, 164 estavam dentro dos critérios de inclusão e aceitaram participar da pesquisa. Elas responderam ao questionário e assinaram o TCLE. No entanto, das 164 gestantes, 52 não compareceram à UBS para entregar a amostra de urina e realizar a coleta cérvico-vaginal. Das 112 gestantes que participaram de todas as etapas da pesquisa, 2 foram excluídas por apresentarem amostras cérvico-vaginal insatisfatória (não amplificação do gene da β -globina humana usada como controle interno da amostra). Portanto, 110 gestantes foram efetivamente incluídas na pesquisa.

Das 12 UBS da zona urbana, em uma (01) não houve gestantes que efetivamente participaram da pesquisa, devido a vários fatores, como: baixo número de gestantes acompanhadas no pré-natal, critérios de inclusão/exclusão e/ou aceitabilidade em participar da pesquisa.

5.1 Caracterização geral da amostra

As gestantes que participaram desta pesquisa tinham entre 13 e 41 anos, com média de idade de 23,20 (DP=6,33). A baixa escolaridade foi predominante entre as participantes, pois 21,82% das gestantes tinham o ensino fundamental incompleto e 30% tinham o ensino fundamental completo. A maioria das gestantes informou ser casada ou estar vivendo em união estável com um companheiro (77,27%), ser dona de casa (49,1%) e 58,18% informaram ter renda familiar entre 1 a 2 salários (R\$ 880,00). Estas informações estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características sócio-demográficas das gestantes recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017.

Variáveis (n = 110)	n	(%)
Idade		
13 --- 21	50	45,45
22 --- 31	50	45,45
32--- 41	10	9,10
Média ± DP	23,20 ± 6,33	
Amplitude	13 - 41	
Nível de escolaridade		
Ensino fundamental incompleto	24	21,82
Ensino fundamental completo	33	30,00
Ensino médio completo	47	42,73
Ensino superior completo	06	5,45
Estado conjugal		
Solteira / Separada	25	22,73
Casada / União estável	85	77,27
Ocupação		
Dona de casa	54	49,1
Estudante	27	24,54
Professora	03	2,73
Doméstica	03	2,73
Outros	23	20,9
Renda familiar*		
< 1 salário mínimo	35	31,82
1 a 2salários mínimos	64	58,18
≥ 3 salários mínimos	11	10,0

*Salário mínimo: R\$ 880,00

Quanto ao comportamento sexual, a maioria das gestantes teve a primeira relação sexual entre 15 e 20 anos (55,45%), com média de idade de 15,05 (DP=2,17). A maioria teve apenas um parceiro nos últimos 12 meses (73,64%) e entre 1 a 5 parceiros ao longo da vida (80%). Apenas 12 gestantes (10,91%) informaram que já tiveram infecções sexualmente transmissíveis ao longo da vida, sendo que destas, 16,67% tiveram sífilis, 16,67% hepatite B, 16,67% herpes e 33,33% HPV. Estas informações estão detalhadas na tabela 2.

Tabela 2 - Características do comportamento sexual das gestantes recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017.

Variáveis (n = 110)	n	(%)
Idade da primeira relação sexual		
< 15	46	41,82
15 a 20	61	55,45
> 20	3	2,73
Média ± DP	15,05 ± 2,17	
Amplitude	9 - 23	
Nº de parceiro nos últimos 12 meses		
1	81	73,64
2 a 3	22	20,00
> 3	07	6,36
Nº de parceiros ao longo da vida		
1 a 5	88	80,00
6 a 10	17	15,45
> 10	05	4,54
IST prévia		
Sim	12	10,91
Não	98	89,09
IST (n=12)		
Sífilis	02	16,67
Herpes	02	16,67
Hepatite B	02	16,67
HPV	04	33,33
Outras	02	16,67

Em relação aos antecedentes obstétricos das gestantes, a maioria (46,36%) não havia tido gestações anteriores, enquanto que 41,82% tiveram entre 1 a 3 filhos e 12,73% tiveram aborto, sendo que todos os abortos foram espontâneos. Apenas 7,27% das gestantes relataram parto prematuro nas gestações anteriores. Estas informações estão detalhadas na tabela 3.

Tabela 3 - Características obstétricas das gestantes recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017.

Variáveis (n = 110)	n	(%)
Número de gestações anteriores		
Nenhuma	51	46,36
1 a 3	43	39,09
> 3	16	14,55
Número de filhos		
Nenhum	57	51,82
1 a 3	46	41,82
> 3	07	6,36
Aborto		
Sim	14	12,73
Não	96	87,27
Parto prematuro		
Sim	08	7,27
Não	102	92,73

No momento da entrevista, 58,18% das gestantes estavam com idade gestacional entre 14 a 20 semanas e 68,18% relataram apresentar alguma queixa ginecológica, sendo que entre estas, o corrimento vaginal e a dor pélvica foram as mais frequentes, com respectivamente 66,66% e 50,66%. As informações sobre os testes rápidos de IST na gestação revelaram que 2,73% das gestantes foram positivas para sífilis e 2,73% foram positivas para hepatite B. Estas informações estão detalhadas na tabela 4.

Tabela 4 - Características obstétricas e ginecológicas da gestação atual das mulheres recrutadas nas UBS do município de Coari- AM, no período de julho 2016 a março de 2017.

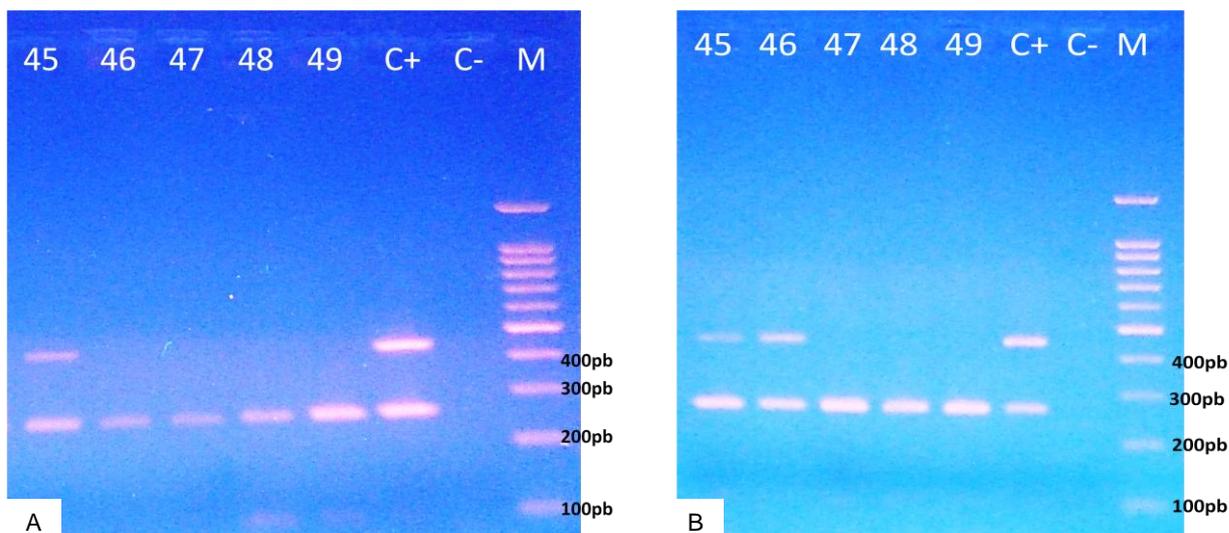
Variáveis (n = 110)	n	(%)
Idade gestacional (semanas)		
14 a 20	64	58,18
21 a 27	46	41,82
Queixa ginecológica		
Sim	75	68,18
Não	35	31,82
Tipo de queixa ginecológica (n=75)*		
Corrimento vaginal	50	66,66
Dor pélvica	38	50,66
Prurido	15	20,00
Outras	10	13,33
Teste rápido para HIV		
Positivo	0	0
Negativo	83	75,45
Não fez	27	24,55
Teste rápido para Sífilis		
Positivo	3	2,73
Negativo	65	59,09
Não fez	42	38,18
Teste rápido para Hepatite B		
Positivo	3	2,73
Negativo	70	63,64
Não fez	37	33,63
Teste rápido para Hepatite C		
Positivo	0	0
Negativo	77	70,0
Não fez	33	30,0

*Não se soma, pois pode ocorrer mais de uma queixa clínica por gestante.

5.2 Infecção pelo HPV e análise de concordância na detecção do HPV entre amostras de urina e cérvico-vaginal

Foram coletadas 110 amostras de urina e 110 amostras de *swab* cérvico-vaginal. Todas as amostras foram positivas para o DNA genômico humano, usado como controle interno das amostras (figura 15).

Figura 15 - Análise da eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da PCR obtidos com os iniciadores PGMY09/11 e PCO4/GH20



Fonte: Própria. C+ = controle positivo; C- = controle negativo; M = marcador de peso molecular de 100 pb; A) A imagem evidencia um fragmento de 268 pb resultante da amplificação do DNA genômico humano nas amostras de urina 45 a 49. A amostra 45 evidencia um fragmento de 450 pb resultante da amplificação da região L1 do HPV; B) A imagem evidencia um fragmento de 268 pb resultante da amplificação do DNA genômico humano nas amostras cérvico-vaginal 45 a 49. As amostras 45 e 46 evidenciam um fragmento de 450 pb resultante da amplificação da região L1 do HPV.

Foi detectada infecção por HPV em 24,6% (27/110) das gestantes. Em relação a cada tipo de amostra, foi encontrado DNA de HPV em 13 (11,8%) amostras de urina e em 26 (23,6%) amostras cérvico-vaginal, conforme tabela 5.

Das 27 (24,54%) gestantes positivas para o HPV, 12 (10,91%) gestantes foram positivas nas duas amostras (urina e cérvico-vaginal), uma (0,91%) gestante foi positiva somente na amostra de urina, 14 (12,73%) gestantes foram positivas somente nas amostras cérvico-vaginal e 83 (75,45%) gestantes foram negativas nas duas amostras. Houve uma concordância observada de 86,4% (IC de 95%, 78,7% - 91,6%) e índice de concordância moderado entre as amostras biológicas (kappa = 0,543 (IC de 95%, 0,372 - 0,715)).

Tabela 5 - Distribuição segundo os resultados da PCR para HPV em amostras da urina e cêrvico-vaginal de gestantes amostradas no município de Coari – AM.

PCR (Urina)	PCR (Swab)				Total	%
	Positivo		Negativo			
	<i>f_i</i>	%	<i>f_i</i>	%		
Positivo	12	10,9	1	0,9	13	11,8
Negativo	14	12,7	83	75,5	97	88,2
Total	26	23,6	84	76,4	110	100

f_i = frequência absoluta simples; Obs.: percentuais em relação ao total da amostra.

5.3 Associação entre as variáveis e a infecção por HPV

Na tabela 6, podemos observar que houve associação estatisticamente significativa da infecção pelo HPV com gestantes menores de 25 anos ($p= 0,014$), não sendo encontrada associação estatisticamente significativa nas demais variáveis sócio-demográficas analisadas.

Tabela 6 - Resultado do HPV em relação aos dados sociodemográficos e econômicos das gestantes amostradas no município de Coari – AM.

Variáveis	HPV				Total	OR	<i>p</i>*
	Positivo (n = 27)		Negativo (n = 83)				
	<i>f_i</i>	%	<i>f_i</i>	%			
Idade (anos)						4,40	<i>0,014</i>
< 25	23	32,9	47	67,1	70		
≥ 25	4	10,0	36	90,0	40		
Escolaridade						1,76	0,388
Ensino fundamental incompleto	8	33,3	16	66,7	24		
Ensino fundamental completo	19	22,1	67	77,9	86		
Estado conjugal						2,67	0,075
Solteira/Separada	10	40,0	15	60,0	25		
Casada/União estável	17	20,0	68	80,0	85		
Renda familiar						1,10	0,999
< 1 salário mínimo	9	25,7	26	74,3	35		
≥ 1 salário mínimo	18	24,0	57	76,0	75		

f_i = frequência absoluta simples; OR = *Odds Ratio*; * Teste do qui-quadrado com correção de Yates. Valor de *p* em negrito itálico indica associação estatisticamente significante ao nível de 5%.

Na tabela 7, não foi encontrada associação estatisticamente significativa nas variáveis do comportamento sexual das gestantes e a infecção pelo HPV.

Tabela 7 - Resultado do HPV em relação aos dados de comportamento sexual das gestantes amostradas no município de Coari - AM.

Variáveis	HPV				Total	OR	p*
	Positivo (n = 27)		Negativo (n = 83)				
	<i>f_i</i>	%	<i>f_i</i>	%			
Idade da 1^o relação sexual						0,94	0,999
< 15 anos	11	23,9	35	76,1	46		
≥ 15 anos	16	25,0	48	75,0	64		
Número de parceiros nos últimos 12 meses						0,63	0,487
1	18	22,2	63	77,8	81		
> 1	9	31,0	20	69,0	29		
Número de parceiros na vida						2,00	0,230
< 5	22	27,8	57	72,2	79		
≥ 5	5	16,1	26	83,9	31		
IST prévia						1,03	0,999**
Sim	3	25,0	9	75,0	12		
Não	24	24,5	74	75,5	98		

f_i = frequência absoluta simples; OR = *Odds Ratio*; * Teste do qui-quadrado com correção de Yates; ** Teste exato de Fisher.

Na tabela 8, houve associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e gestantes primigesta (p= 0,027), assim como a associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e gestantes que ainda não tinham tido filhos (p= 0,046), não sendo encontrada associação estatisticamente significativa nas demais variáveis obstétricas analisadas.

Tabela 8 - Resultado do HPV em relação as gestantes amostradas no município de Coari - AM.

<i>Variáveis</i>	HPV				<i>Total</i>	<i>OR</i>	<i>p*</i>
	Positivo (n = 27)		Negativo (n = 83)				
	<i>f_i</i>	%	<i>f_i</i>	%			
Número de gestações						3,03	0,027
Primigesta	18	35,3	33	64,7	51		
Secundigesta e mais	9	15,3	50	84,7	59		
Número de filhos						2,81	0,046
Nenhum	19	33,3	38	66,7	57		
Mais de um	8	15,1	45	84,9	53		
Aborto						0,47	0,511**
Sim	2	14,3	12	85,7	14		
Não	25	26,0	71	74,0	96		
Parto prematuro						1,95	0,403**
Sim	3	37,5	5	62,5	8		
Não	24	23,5	78	76,5	102		

f_i = frequência absoluta simples; OR = *Odds Ratio*; * Teste do qui-quadrado com correção de *Yates*; ** Teste exato de *Fisher*. Valor de p em negrito itálico indica associação estatisticamente significativa ao nível de 5%.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização geral da amostra

Participaram desta pesquisa, 110 gestantes que estavam no segundo trimestre de gestação e que faziam acompanhamento de pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde do município de Coari-AM.

A média de idade das gestantes participantes da pesquisa foi de 23 anos, que variou de 13 a 41 anos. A pesquisa de Brandão, Lacerda e Ximenes (2010), realizada no Brasil com população semelhante a nossa (gestante em qualquer faixa etária), também apresentou dados semelhantes, com variação de idade de 14 a 41 anos e média de idade de 26 anos.

Nesta pesquisa, a maioria das gestantes apresentou um baixo nível de escolaridade, em que 51,82% das gestantes tinha apenas o ensino fundamental incompleto ou completo. Esta condição está diretamente relacionada com o baixo índice de desenvolvimento Humano dos municípios do interior do Estado, onde as mulheres acabam se preocupando mais com os meios de subsistência da família quando comparado com sua educação. Outra situação relacionada é a falta de perspectiva das mulheres do interior do Estado em relação à obtenção de uma carreira profissional por meio da educação, tendo em vista que o ensino superior em apenas alguns municípios passou a ser realidade de acesso a partir de 2001, com a expansão da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) e em 2006 com a expansão da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Nesse contexto, Burlamaqui *et al.* (2017), afirma que o baixo nível de escolaridade está correlacionado com um conhecimento limitado sobre o vírus HPV, suas possíveis consequências e com baixas taxas de adesão aos programas de prevenção de infecções. Neste sentido, Osis, Duarte e Sousa (2014), reforçam a necessidade de intervenções educativas e preventivas considerando a capacidade das diferentes camadas sociais em obter e processar adequadamente as informações.

Quanto ao estado conjugal das gestantes, 77,27% informaram ser casada ou estar em união estável com um parceiro. Estudos realizados no Brasil por Brandão, Lacerda e Ximenes (2010) e Franciscatto *et al.* (2014), também corroboram com os achados deste estudo, em que respectivamente, 73,7% e 79,16% das gestantes

participantes do estudo eram casadas ou em união estável. Por muito tempo a situação conjugal foi fortemente associada ao risco de contrair IST, no entanto, várias pesquisas sobre essa variável e a infecção pelo HPV não encontram diferenças estatísticas significativas (BRASIL, 2008; PINTO, FUZII E QUARESMA, 2011; ROCHA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

Quando observamos a principal ocupação relatada pelas gestantes, podemos constatar que 79% delas não possuíam emprego. Neste contexto, vários fatores podem estar envolvidos, especialmente a desigualdade nos papéis sociais relacionado ao gênero, que coloca a mulher em situações desfavoráveis na tomada de decisões associada: ao corpo, a saúde, a educação, ao emprego, entre outros. Além disso, o estado gestacional das mulheres também contribuiu fortemente para esse elevado número de mulheres sem ocupação remunerada e consequente renda familiar menor que um salário mínimo em 31,82% das gestantes. No entanto, 58,18% das demais gestantes tinham renda familiar entre um a dois salários mínimos. No estudo realizado por Brandão, Lacerda e Ximenes (2010), os dados apresentados também foram semelhantes ao nosso, em que 64,58% das gestantes tinham rendimento familiar entre um a três salários mínimos e 31,25% tinham renda familiar menor que 1 salário mínimo.

A média de idade da primeira relação sexual das gestantes foi de 15 anos, com amplitude de 9 e 23 anos, sendo que 55,45% tiveram a primeira relação sexual entre 15 a 20 anos e 41,82% com menos de 15 anos. Dados semelhantes foram encontrados na pesquisa de Brandão, Lacerda e Ximenes (2010) e Franciscatto *et al.* (2014), em que respectivamente, 86,45% e 91,7% das gestantes teve a primeira relação sexual com menos de 20 anos. Já a pesquisa de Meyrelles *et al.* (2013), também apresentou uma média de idade da primeira relação sexual de 15 anos. De acordo com Schiffman *et al.* (2016), a incidência do HPV genital aumenta acentuadamente após a média de idade da primeira relação sexual, atingindo seu pico em jovens menores de 25 anos. Após esta fase a incidência do HPV cervical diminui com o aumento da idade, isso ocorre devido ao menor número de novos contatos sexuais e à imunidade que se desenvolve em algumas mulheres após a infecção.

Em relação ao número de parceiros nos últimos 12 meses, 73,64% das gestantes informaram que tiveram somente um parceiro. Esses dados foram

semelhante ao encontrado na pesquisa em Montreal/Canadá por Trottier *et al.* (2016), em que as gestantes apresentaram uma média de um parceiro nos últimos 12 meses. Na pesquisa multicêntrica realizada com gestantes no Brasil (2008), estimou-se um risco quase três vezes maior de infecção pelo HPV nas gestantes que tiveram mais de um parceiro nos últimos 12 meses, quando comparado com as gestantes que tiveram somente um parceiro.

Sobre o número de parceiros ao longo da vida, 80% das gestantes teve entre um a cinco parceiros. Na pesquisa de Brandão, Lacerda e Ximenes (2010), os dados foram próximos ao nosso, pois 73,95% das gestantes teve entre um a quatro parceiros ao longo da vida. Apesar da multiplicidade de parceiros sexuais ser historicamente conhecido como um fator de risco para infecção pelo HPV, resultados de diversos estudos divergem em encontrar tal associação (MARIÑO, 2015; ROCHA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.* 2016).

Em relação ao histórico de infecções sexualmente transmissíveis, 10,91% das gestantes informaram que já haviam tido IST no passado, sendo que 16,67% informaram que tiveram sífilis, 16,67% hepatite B, 16,67% herpes e 33,33% HPV. No estudo de Teixeira *et al.* (2015), apenas 6,4% das gestantes informaram história prévia de IST. Já o estudo de Meyrelles *et al.* (2013), 32,1% das gestantes informaram IST prévia.

Sobre o histórico obstétrico das gestantes, 46,36% estavam vivenciando sua primeira gravidez, 39,09% já haviam tido entre 1 a 3 gestações e 14,55% haviam tido mais de 3 gestações. Hahn *et al.* (2013), realizou uma pesquisa com 469 gestantes, onde a prevalência do HPV foi de 15,4% e houve associação estatisticamente significativa entre a primiparidade e a infecção pelo HPV.

Quanto ao número de filhos, 41,82% das gestantes tiveram entre 1 a 3 filhos e 6,36% tiveram mais de 3 filhos. Em diversos estudos os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre a multiparidade e a infecção pelo HPV (HONG *et al.*, 2013; MARIÑO, 2015; MEYRELLES *et al.*, 2013).

Ainda sobre o histórico obstétrico das gestantes, 12,73% informaram ter histórico de aborto espontâneo, não sendo relatado nenhum caso de aborto provocado. E apenas 7,27% das gestantes relataram histórico de parto prematuro nas gestações anteriores. Diversas IST estão fortemente associadas ao aborto espontâneo e ao parto prematuro, especialmente a clamídia e a gonorréia. São

poucos os estudos sobre a infecção pelo HPV e estes eventos. Apesar de que recentemente um estudo com 2.153 mulheres, onde a prevalência do HPV foi de 38,5%, associou a infecção pelo HPV à ruptura prematura das membranas (RPM) no parto pré-termo (COTTON-CABALLERO *et al.*, 2017).

Durante a entrevista, 68,18% das gestantes relataram alguma queixa ginecológica, sendo que o corrimento vaginal e a dor pélvica foram as queixas mais frequentes, com respectivamente 66,66% e 50,66%, no entanto, estudos realizados com gestantes sobre a associação entre IST prévia e a infecção pelo HPV ainda são discordantes (DOMŽA, *et al.*, 2011; MEYRELLES *et al.*, 2013). De acordo com Brasil (2012), apesar de ser comum a presença de fluxo vaginal aumentado durante a gestação, deve-se sempre investigar se há associação com IST, assim como em casos de dor pélvica, sendo esta última também associada a outras intercorrências durante a gestação.

Em relação a realização dos testes rápido para detecção de IST durante esta gestação, 2,73% das gestantes foram positivas para sífilis e 2,73% foram positivas para hepatite B. Nenhuma gestante foi positiva para HIV ou hepatite C. No entanto, 38,18% das gestantes não havia realizado o teste para sífilis, 33,63% para hepatite B, 30,0% para hepatite C e 24,55% para HIV. Podemos observar que um número significativo de gestantes não realizaram o teste rápido para IST no segundo trimestre de gestação, apesar do Ministério da Saúde definir como obrigatório a realização destes testes ainda no primeiro trimestre. No entanto, este resultado pode ser justificado pelo fato de 64% das participantes terem tido entre 1 a 2 consultas de pré-natal até momento da entrevista. Cabe destacar, que os testes rápidos para detecção de IST é um procedimento descentralizado e disponível em todas as UBS de Coari-AM.

6.2 Infecção pelo HPV e análise de concordância na detecção do HPV entre amostras de urina e cérvico-vaginal

A prevalência geral da infecção pelo HPV nas gestantes participantes desta pesquisa foi de 24,6% (27/110). Esta prevalência assemelha-se aos resultados encontrados nos estudos realizados em diversos países do mundo, onde a prevalência do HPV em gestantes variou entre 13,4% a 45% (HONG *et al.*, 2013;

TROTTIER *et al.*, 2016). Nos estudos realizados no Brasil, a prevalência da infecção pelo HPV em gestantes saudáveis variou entre 17,8% a 61,9% (BRANDÃO, LACERDA e XIMENES, 2010; FRANCISCATTO *et al.*, 2014). No interior do estado do Amazonas ainda não são conhecidos estudos sobre a prevalência do HPV em gestantes, no entanto, em um estudo multicêntrico realizado em seis capitais do Brasil, a prevalência do HPV em gestantes na capital Manaus-AM foi de 45,3% (BRASIL, 2008).

No município de Coari-AM são conhecidos dois estudos que avaliaram a prevalência do HPV em mulheres não gestantes, sendo que o estudo de Rocha *et al.* (2013), identificou a prevalência do HPV em 29,1% das 361 mulheres que estavam em consulta de rotina nas unidades básicas de saúde da zona urbana, enquanto que Mariño (2015), identificou a prevalência do HPV em 18,7% das 412 mulheres ribeirinhas participantes do estudo. Podemos observar que nos estudos realizados no município de Coari-AM houve uma diferença de mais 10% na prevalência do HPV entre as mulheres da zona urbana e da zona rural do município. Contudo, é importante destacar que a prevalência do HPV detectado no estudo de Rocha *et al.* (2013), pode ter sofrido uma forte influência da presença de homens trabalhadores do gasoduto Urucu-Coari-Manaus que eram provenientes de várias regiões do país e que transitavam na zona urbana do município na época da coleta das amostras, enquanto que o estudo de Mariño (2015), foi realizado em um período em que as grandes obras do gasoduto já haviam encerrado. Além disso, Rocha *et al.* (2013), utilizou *Nested-PCR*, que é uma técnica mais sensível quando comparada com a PCR convencional utilizada por Mariño (2015).

Deve-se destacar que a infecção pelo HPV na região cérvico-vaginal das gestantes participantes do estudo representa uma grande preocupação sobre o risco de transmissão vertical. A transmissão vertical do HPV tem sido relatada em vários estudos com prevalência amplamente variáveis (4% a 79%) de infecção em recém-nascidos. A infecção pelo HPV nos conceptos podem ser assintomáticas ou evidenciadas por meio da Papilomatose respiratória recorrente e verrugas em diversas regiões do corpo (conjuntivas, genital e outras) que podem se manifestar no nascimento ou no decorrer da infância. Embora os fatores de risco para a transmissão vertical ainda não estejam bem estabelecidos, podem estar associado com a transmissão: a carga viral, lesões no trato genital materno e infecção materna

por múltiplos genótipos de HPV. Portanto, o impacto do HPV no ciclo reprodutivo da mulher precisa ser melhor investigado, a fim de se obter mais informações acerca da transmissão vertical do HPV (HAHN *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2013; SEGNA *et al.*, 2017; SKOCZYŃSKI, GOŹDZICKA-JÓZEFIAK e KWAŚNIEWSKA, 2015; TROTTIER *et al.*, 2016).

Quando analisado isoladamente o tipo de amostra, a prevalência do HPV nas amostras de urina foi de 11,8% (13/110) e nas amostras cérvico-vaginal foi de 23,6% (26/110), sendo que 12 gestantes (10,91%) foram positivas nas duas amostras, 1 gestante (0,91%) foi positiva somente na amostra de urina, 14 gestantes (12,73%) foram positivas somente nas amostras cérvico-vaginal e 83 gestantes (75,45%) foram negativas nas duas amostras. Houve uma concordância observada de 86,4% e índice de concordância moderado entre as amostras biológicas ($\kappa = 0,543$).

Os resultados encontrados no nosso estudo são semelhantes ao encontrado por Sahasrabudde *et al.* (2014), utilizando o kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche Molecular Systems) comparou amostras de urina com amostras cervical e vulvar de 72 mulheres não gestantes submetidas à colposcopia nos Estados Unidos, onde a concordância da amostra de urina com a vulvar foi substancial ($\kappa = 0,62$) e a concordância da amostra de urina com a cervical foi moderada ($\kappa = 0,55$). Este estudo também analisou a prevalência dos HPV carcinogênicos, onde 58,3% foram detectados nas amostras de urina, 72,1% nas amostras vulvar e 73,6% nas amostras cervical, sendo o HPV 16 o genótipo mais comum e detectável em 25% das amostras de urina, 33,8% nas amostras vulvar e 31,9% nas amostras cervical.

No entanto, outros estudos encontraram maior concordância entre a amostra de urina e amostra cervical, como o estudo de Franciscatto *et al.* (2014), utilizando a técnica de PCR GP5+/GP6+ comparou amostras vaginal e de urina de 63 gestantes do Brasil, encontrando uma substancial concordância nos resultados dos testes de DNA do HPV entre as amostras analisadas ($\kappa = 0,773$). Bernal *et al.* (2014), utilizando o kit Cobas 4800 HPV test (Roche Diagnostic, Spain) comparou amostras de urina e amostras cervical de 125 mulheres não gestantes da Espanha que apresentavam resultado anormal do Papanicolau, onde encontrou uma substancial concordância de detecção do HPV entre a amostra de urina e amostra cervical ($\kappa = 0,76$). Khunamornpong *et al.* (2016), por meio do kit Cobas 4800 HPV Test (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) comparou amostras de urina com

amostras cervical de 123 mulheres da Tailândia, encontrando uma substancial concordância de detecção do HPV entre as amostras biológicas ($\kappa=0,65$).

Um resultado mais expressivo foi encontrado no estudo realizado por Lim *et al.* (2017), que realizou dois tipos de PCR em tempo real (Roche cobas 4800 e *Abbott Real Time High Risk HPV test*) para a detecção do HPV em amostras de urina que foram comparados com as amostras cervical. Participaram desse estudo 100 mulheres da Coreia que estavam em tratamento ou em acompanhamento para o câncer. O resultado deste estudo apresentou que para os dois testes houve concordância substancial para qualquer tipo de HPV de alto risco utilizando amostras de urina ($\kappa=0,7173$) e que a concordância na detecção do HPV 16/18 foi quase perfeita ($\kappa=0,9668$). E quando o valor do limite de ciclo de corte para Abbott HPV foi ajustado de 32 para 40 nas amostras de urina, a sensibilidade relativa de Abbott HPV aumentou para 91,7% de 81,8% para detecção de HPV16/18 e para 87,0% de 68,5% para a detecção de outros HPV de alto risco.

Estes estudos realizados em diversos países do mundo para a detecção do HPV em amostras de urina apresentaram uma baixa sensibilidade do HPV quando comparado com as amostras cervical, no entanto, os pesquisadores reconhecem que a amostra de urina poderá se tornar um excelente método de coleta de amostras em mulheres que hesitam em participar de programas de triagem do câncer cervical por meio da coleta ginecológica. O rastreio do câncer de colo do útero com amostragem cervical é invasivo, demorado e as vezes sofre de atendimento precário. Neste contexto, a amostra de urina é facilmente aceita pela mulher (especialmente as gestantes) por se tratar de um método não invasivo, acessível e simples de realizar. Estudos tem relatado que a detecção do HPV por meio da amostra de urina é uma alternativa efetiva para: o rastreio de câncer de colo do útero; abordagem complementar à citologia líquida para triagem de câncer cervical; estudos epidemiológicos, especialmente em locais remotos e com baixos recursos físicos e humanos; vigilância de doença pós-vacinação contra HPV quando os exames pélvicos não são práticos (FRANCISCATTO *et al.*, 2014; GUERRERO-PRESTON *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2017; SAHASRABUDDHE *et al.*, 2014).

É importante destacar que a sensibilidade fraca do teste da PCR para detecção do HPV nas amostras de urina pode ser em decorrência de vários fatores, como: 1) falta de padronização para coleta, manejo e armazenamento da urina; 2)

falta de padronização das técnicas de extração e amplificação do DNA; 3) aplicação de um teste mais sensível. Na urina possíveis inibidores (ureia, nitritos, cristais de sal e hemoglobina) se não foram completamente removidos durante o processo de extração de DNA, pode ter impacto em baixos níveis de DNA viral, mesmo que as amostras amplifiquem para a β -globina humana. Portanto, esses dados reforçam a necessidade da realização de mais estudos para avaliar e otimizar a detecção do HPV em amostra de urina (GUERRERO-PRESTON *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2017; KHUNAMORN PONG *et al.*, 2016).

6.3 Associação entre as variáveis e a infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV é causada por mais de 200 tipos de Papilomavírus Humano, sendo que 40 tipos têm tropismo pela região genital e podem desencadear várias manifestações clínicas, entre as mais comuns estão as verrugas genitais, verrugas comuns e o câncer cervical que é o maior fardo para as mulheres em todo mundo. Na gravidez, estas manifestações clínicas podem ter repercussões tanto para mãe quanto para o feto ou recém-nascido. No entanto, a patogenicidade do HPV é determinada não apenas pelo genótipo, mas também por outros fatores relacionados ao hospedeiro como a imunidade, genética e comportamento sexual (EGAWA e DOORBAR, 2016; INCA, 2017).

Neste estudo, buscou-se analisar as variáveis sócio-demográficas e clínico-epidemiológicas das gestantes a fim de verificar possíveis associações com a infecção pelo HPV. E de acordo com nossos resultados, houve associação estatisticamente significativa entre a idade das gestantes e a infecção pelo HPV ($p=0,014$). Este resultado apresenta-se em conformidade com a WHO (2017), que afirma que a infecção pelo HPV alcança seu pico em jovens <25 anos.

Nossos resultados também encontraram associação estatisticamente significativa da infecção pelo HPV com gestantes primigesta ($p=0,027$) e nulípara ($p=0,046$). Este resultado foi semelhante ao encontrado por Hahn *et al.* (2013), em que a infecção pelo HPV foi associada às gestantes nulíparas ($p=0,015$). Não foi encontrada associação estatisticamente significativa nas demais variáveis analisadas.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo por meio de amostras de urina e cérvico-vaginal de gestantes em acompanhamento de pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde do município de Coari-AM, conclui-se que:

1. A prevalência da infecção pelo HPV na amostra de gestantes estudada foi de 24,6%.

2. Houve uma concordância moderada na detecção do HPV entre as amostras de urina e cérvico-vaginal ($kappa = 0,543$), apesar da amostra de urina apresentar uma baixa sensibilidade de detecção do HPV em relação a amostra cérvico-vaginal.

3. As gestantes estudadas apresentaram uma média de idade de 23 anos ($DP=6,33$), baixa escolaridade, renda familiar entre 1 a 2 salários mínimo. A média de idade da primeira relação sexual foi de 15,05 ($DP=2,17$). A maioria era casada ou vivia em união estável e tiveram entre 1 a 5 parceiros sexuais ao longo da vida. A maioria não tinha filho e estavam vivenciando a primeira gravidez

4. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e a idade das gestantes ($p= 0,014$), gestantes primigesta ($p= 0,027$) e nulípara ($p= 0,046$).

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. P. *et al.* A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology Journal**. 9:262, 2012.
- ALMEIDA, A. P. M. *et al.* Infecção por múltiplos tipos de Papilomavírus humano em mulheres jovens sexualmente ativas. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 48(6):573-9, 2015.
- ANACKER, D. C.; MOODY, C. A. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. **Virus Research**. 231, 41–49, 2017.
- BAKER, T. S. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses: Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophysical Journal**. Volume 60, December, 1445-1456, 1991.
- BERNAL, S. *et al.* Comparison of urine and cervical samples for detecting human papillomavirus (HPV) with the Cobas 4800 HPV test Samuel. **Journal of Clinical Virology**. 61, 548–552, 2014.
- BERNARD, H. U. *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**. v.170, n.5, Nov, p.1077-1085, 1994.
- BERTI, F. C. B. *et al.* The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 34, 1–13, 2017.
- BRANDÃO, V. C. R. A. B.; LACERDA, H. R.; XIMENES, R. A. A. Frequência de Papilomavírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em gestantes. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Brasília, 19(1):43-50, jan-mar, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Bolso das Doenças Sexualmente Transmissíveis. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Brasília, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Atenção ao Pré-natal de Baixo Risco. Cadernos de Atenção Primária, n. 32. Brasília, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia Prático sobre o HPV – Guia de Perguntas e Respostas para Profissionais de Saúde. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa Conjunta nº 01/2015 – CGNPNI/DEVIT/DST/AIDS/SVS/MS. Dispõe sobre alteração de faixa etária e do intervalo de doses da vacina HPV para mulheres de nove a 26 anos de idade HIV positivas. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis e hepatites virais. Brasília - DF, 2017a.

BRASIL. Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas. Disponível em: <<http://www.fvs.am.gov.br/index.php/9-noticiais/214-amazonas-recebe-75-mil-doses-para-segunda-etapa-da-vacinacao-contr-o-hpv>>. Acesso em: 12.10.2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota informativa Nº 62-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SVS/MS. Orienta os serviços de vacinação para a otimização do uso da Vacina HPV Quadrivalente, com ampliação temporária da faixa etária. 2017c.

BURLAMAQUI, J. C. F. *et al.* HPV e estudantes no Brasil: avaliação do conhecimento de uma infecção comum-relato preliminar. **Braz. J. Otorhinolaryngol.** v. 83, n. 2, p. 120-125, 2017.

CAMPOS, R. S. P. *et al.* Gestaçã e papilomavírus humano (HPV): vias de transmissã e complicações. **Diagn Tratamento.** 21(3): 109-14, 2016.

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

CECCATO JUNIOR, B. P. V. *et al.* Prevalência de infecçã cervical por papilomavírus humano e neoplasia intraepitelial cervical em mulheres HIV-positivas e negativas. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 37(4):178-85, 2015.

COGGIN, J. H.; ZUR HAUSEN, H. Workshop on Papillomaviruses and Cancer. **Cancer Research.** 39, 545-546, February, 1979.

CORRÊA, G. J. Prevalência do Papilomavírus humano (HPV) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino. Dissertaçã. Manaus - AM: UEA; FMT-AM, 2005.

COSTA-LIRA, E. *et al.* Prevalence of human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, and Trichomonas vaginalis infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology. **Genetics and Molecular Research.** 16 (2): gmr16029626, 2017.

COTTON-CABALLERO, A. *et al.* Maternal Human Papillomavirus Infection Increases the Risk of Premature Rupture of Membranes [19M]. **Obstetrics & Gynecology.** 129: S137, May, 2017.

DAS, D. *et al.* Calcein represses human papillomavirus 16 E1-E2 mediated DNA replication via blocking their binding to the viral origin of replication. **Virology.** 508, 180–187, 2017.

DOERFLER, D. *et al.* Human papilloma virus infection prior to coitarche. **American Journal of Obstetrics & Gynecology.** MAY, 200 (5): 487, 1-5, 2009.

DOMŽA, G. *et al.* Human papillomavirus infection in pregnant women. **Archives of Gynecology and Obstetrics.** November, Vol. 284, Issue 5, p 1105–1112, 2011.

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

DOORBAR, J. Latent papillomavirus infections and their regulation. **Current Opinion in Virology.** 3:416–421, 2013.

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

DREER, M.; POEL, S. V. DE; STUBENRAUCH, F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. **Virus Research.** 231 96–102, 2017.

EGAWA, N. *et al.* Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses.** 7, 3863-3890, 2015.

EGAWA, N.; DOORBAR, J. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research,** 231, 119–127, 2017.

FRANCISCATTO, L. G. *et al.* Comparison of urine and self-collected vaginal samples for detecting human papillomavirus DNA in pregnant women. **International Journal of Gynecology and Obstetrics.** 125, 69–72, 2014.

FREITAS, A. C. DE *et al.* hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.** 36:71, 2017.

GANTI, K. *et al.* Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways. **PLOS Pathogens.**12(9), 2016.

GININDZA, T. G. *et al.* Prevalence and risk factors associated with sexually transmitted infections (STIs) among women of reproductive age in Swaziland. **Infectious Agents and Cancer.** 12:29, 2017.

GRAHAM, S. V.; FAIZO, A. A. A. Control of human papillomavirus gene expression by alternativesplicing. **Virus Research.** 231, 83–95, 2017.

GRAVITT, P. E. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology.** V.38, n.1, Jan, p.357-361, 2000.

GRIFFIN, H. *et al.* Stratification of HPV-Induced Cervical Pathology using the Virally-Encoded Molecular Marker E4 in Combination with p16 or MCM. **Mod Pathol.** July; 28(7): 977–993, 2015.

GUPTA, N. K.; BOWMAN, C. A. Managing sexually transmitted infections in pregnant women. **Women's Health.** 8(3), 313–321, 2012.

GURGEL, A. P. A. D. *et al.* Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. **BioMed Research International.** Volume 2015 (2015), Article ID 130828, 12 pages, 2015.

HAGHSHENAS, M. R. *et al.* Efficacy of Human Papillomavirus L1 Protein Vaccines (Cervarix and Gardasil) in Reducing the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Meta-analysis. **International Journal of Preventive Medicine**. 8: 44, 2017.

HAHN, H. S. *et al.* Distribution of maternal and infant human papillomavirus: risk factors associated with vertical transmission. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 169, 202–206, 2013.

HONG, Y. *et al.* Survey of human papillomavirus types and their vertical transmission in pregnant women. **BMC Infectious Diseases**. 13:109, 2013.

HUGHES, G.; FIELD, N. The epidemiology of sexually transmitted infections in the UK: impact of behavior, services and interventions. **Future Microbiol**. 10(1), 35–51, 2015.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/coari/panorama>>. Acesso em: 20.10.17.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. HPV e câncer - Perguntas mais frequentes. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes>. Acesso em: 12.10.2017.

ISIDEAN, S. D. *et al.* Human papillomavirus testing versus cytology in primary cervical cancer screening: End-of-study and extended follow-up results from the Canadian cervical cancer screening Trial. **Int. J. Cancer**. 139, 2456–2466, 2016.

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

KATZENELLENBOGEN, R. A. Activation of telomerase by HPVs. **Virus Research**. 231, 50–55, 2017.

KHUNAMORNPOONG, S. *et al.* Comparison of Human Papillomavirus Detection in Urine and Cervical Samples Using High-Risk HPV DNA Testing in Northern Thailand. **Obstetrics and Gynecology International**. Vol. 2016, 8 pages, 2016.

KIM, Y. H. *et al.* Genotypic prevalence of human papillomavirus infection during normal pregnancy: A cross-sectional study. **J. Obstet. Gynaecol. Res**. Vol. 40, No. 1: 200–207, January, 2014.

KOSKIMAA, H.-M. *et al.* Human Papillomavirus Genotypes Present in the Oral Mucosa of Newborns and their Concordance with Maternal Cervical Human Papillomavirus Genotypes. **The Journal of Pediatrics**. May, 160(5):837-43, 2012.

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

LETO, M. G. P. *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An Bras Dermatol**. 86(2):306-17, 2011.

LIM, M. C. *et al.* Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV test and the Roche cobas 4800 HPV test using urine samples. **Journal of Virological Methods**. 243, 74–79, 2017.

LIMA, M. A. P. DE; SILVA, C. G. L. DA; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 59(4): 565-573, 2013.

LIRA, E. C. Co-infecção do papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com citologia normal e alterada. Dissertação. Manaus - AM: UFAM, 2010.

LIU, P. *et al.* The prevalence and risk of human papillomavirus infection in pregnant women. **Epidemiol. Infect.** 142, 1567–1578, 2014.

MARIÑO, J. M. Análise da estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM. Dissertação. Manaus - AM: UFAM, 2015.

MARTINS, N. V. **Patologia do trato genital inferior- diagnóstico e tratamento**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014.

MARTINS, T. R. *et al.* HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Virology Journal**. 13:138, 2016.

MEURIS, F. *et al.* The CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human Papillomavirus Pathogenesis. **PLoS Pathogens**. 12(12), 2016.

MEYRELLES, A. R. I. *et al.* HIV/HPV co-infection during pregnancy in southeastern Brazil: Prevalence, HPV types, cytological abnormalities and risk factors. **Gynecologic Oncology**. 128, 107–112, 2013.

MUÑOZ, N. *et al.* Impact of Human Papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on All HPV-Associated Genital Diseases in Young Women. **J Natl Cancer Inst**. Mar, 3;102(5):325-39, 2010.

NEVES, C.; MEDINA, J. L.; DELGADO, J. L. Alterações Endócrinas e Imunomodulação na Gravidez. **Arquivos de medicina**. 21(5/6):175-82, 2007.

NEWMAN, L. *et al.* Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **PLoS ONE**. 10 (12), 2015.

OLIVEIRA, G. O. *et al.* Human papillomavirus type distribution and HPV16 intratype diversity in southern Brazil in women with and without cervical lesions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 112(7): 492-498, July, 2017.

OLIVEIRA, L. H. S. *et al.* Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43(1):4-8, jan-fev, 2010.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Traduzido pela Organização Pan-Americana da Saúde. OPAS. **Prevenção e controle de amplo alcance do câncer**

do colo do útero - um futuro mais saudável para meninas e mulheres. Washington, DC: OPAS, 2013.

ÖRGÜL, G. *et al.* Total Blood Lymphocyte Count Alteration During and After Pregnancy. **Gynecology Obstetrics & Reproductive Medicine.** 23(1) 11-13, 2017.

OSIS, M. J. D.; DUARTE, G. A.; SOUSA, M. H. Conhecimento e atitude de usuários do SUS sobre o HPV e as vacinas disponíveis no Brasil. **Rev Saúde Pública.** 48(1):123-133, 2014.

PANISSET, K. S. P.; FONSECA, V. L. M. Patologia cervical na gestante adolescente. **Adolescência & Saúde.** Vol. 6, nº 4, outubro, 2009.

PAVE. Papillomavirus Episteme. Disponível em: <http://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database>. Acesso em: 31.07.17.

PEARSON, W. S. *et al.* Increase in Urgent Care Center Visits for Sexually Transmitted Infections, United States, 2010–2014. **Emerging Infectious Diseases.** Vol. 23, nº. 2, February, 2017.

PEREIRA, N. *et al.* Human Papillomavirus Infection, Infertility, and Assisted Reproductive Outcomes. **Journal of Pathogens.** Vol. 2015, 8 pages, 2015.

PINTO, D. S.; FUZII, H. T.; QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. **Cad. Saúde Pública.** Rio de Janeiro, 27(4):769-778, abr, 2011.

POGETTO, M. R. B.; SILVA, M. G.; PARADA, C. M. G. L. Prevalence of Sexually Transmitted Diseases in Female Sex Workers in a City in the Interior of São Paulo, Brazil. **Rev. Latino-Am. Enfermagem.** May-Jun;19(3):493-9, 2011.

QUEIROZ, F. A. *et al.* Detection and genotyping of HPV in women with indeterminate cytology and low-grade squamous intraepithelial lesions. **J Bras Patol Med Lab.** v. 51, n. 3, p. 166-172, June, 2015.

QUINT, K. D. *et al.* Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. **Journal of Pathology.** 235:342–354, 2015.

RAMZAN, M. *et al.* A cornucopia of screening and diagnostic techniques for human papillomavirus associated cervical carcinomas. **Journal of Virological Methods.** 222, 192–201, 2015.

ROCHA, D. A. P. *et al.* High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.** Volume 2013, 5 pages, 2013.

SABEENA, S. *et al.* Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma vírus. **J. Obstet. Gynaecol. Res.** Vol. 43, No. 3: 429–435, March, 2017.

SAHASRABUDDHE, V. V. *et al.* Comparison of Human Papillomavirus Detections in Urine, Vulvar, and Cervical Samples from Women Attending a Colposcopy Clinic. **Journal of Clinical Microbiology.** Vol. 52, N. 1 p. 187–192, 2014.

SALCEDO, M. M. B. P. *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection in pregnant versus non-pregnant women in Brazil. **Arch Gynecol Obstet.** 292:1273–1278, 2015.

SANTOS, J. C. *et al.* Ocorrência de papilomavírus humano na cérvix uterina de mulheres da região ocidental da Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica.** Vol. 43(2), 185 – 190, 2013.

SCHIFFMAN, M. Cervical cancer screening: Epidemiology as the necessary but not sufficient basis of public health practice. **Preventive Medicine.** 98, 3–4, 2017.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers.** V.2, December, 2016.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. **J Natl Cancer Inst.** Mar 2;103(5):368-83, 2011.

SEGNA, K. G. *et al.* Recurrent respiratory papillomatosis in a parturient presenting for cesarean delivery. **International Journal of Obstetric Anesthesia.** May; 31:111-113, 2017.

SILVA, L. *et al.* High-risk human papillomavirus and cervical lesions among women living with HIV/AIDS in Brazilian Amazon, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 1 9(6):557–562, 2015.

SINASC. Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos. Nascidos vivos – Amazonas. Nascimento por ocorrência segundo Município. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvam.def>>. Ano de nascimento: 2013.

SKOCZYŃSKI, M.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A.; KWAŚNIEWSKA, A. The Prevalence of Human Papillomavirus between the Neonates and Their Mothers. **BioMed Research International.** Volume 2015, Article ID 126417, 6 pages, 2015.

SMITH, E. M. *et al.* Evidence for Vertical Transmission of HPV from Mothers to Infants. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.** Volume 2010, Article ID 326369, 7 pages, 2010.

SULLIVAN, C; CURTIS, S.; MOUZAKES, J. Therapeutic use of the HPV vaccine in Recurrent Respiratory Papillomatosis: A case report. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.** 93, 103-106, 2017.

TALBOT, L.; MACLENNAN, K. Physiology of pregnancy. **Anaesthesia and intensive care medicine.** 17:7, 2016.

TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.** 27, 791–802792, 2013.

TEIXEIRA, L. O. *et al.* Frequência do Papilomavírus Humano na placenta, no colostro e no sangue do cordão umbilical. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 37(5):203-7, 2015.

TEIXEIRA, L. O. *et al.* Prevalência dos tipos de Papilomavírus Humano em mulheres atendidas em um Hospital Universitário no Sul do Brasil. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 49(2): 116-123, 2016.

TEIXEIRA, M. F. HPV: Qual o melhor método diagnóstico laboratorial para mulheres com HIV/AIDS?. Dissertação. Manaus - AM: UEA, FMT - AM, 2015.

TOMMASINO, M. The biology of beta human papillomaviruses. **Virus Research**. 231, 128–138, 2017.

TOTA, J. E. *et al.* Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: Acting on evidence to change the current paradigm. **Preventive Medicine**. 98, 5–14, 2017a.

TOTA, J. E. *et al.* Approaches for triaging women who test positive for human papillomavirus in cervical cancer screening. **Preventive Medicine**. 98, 15–20, 2017b.

TROTTIER, H. *et al.* Human papillomavirus (HPV) perinatal transmission and risk of HPV persistence among children: Design, methods and preliminary results of the HERITAGE study. **Papillomavirus Research**. 2, 145–152, 2016.

UNEMO, M. *et al.* Sexually transmitted infections: challenges ahead. **Lancet Infect Dis**. V. 17: e235–79, 2017.

VENCESLAU, E. M. *et al.* HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. **J Bras Patol Med Lab**. v. 50, n. 4, p. 280-285, agosto, 2014.

VIEIRA, F. S. Gasto do Ministério da Saúde com medicamentos: tendência dos programas de 2002 a 2007. **Revista de Saúde Pública**. 43 (4), 674-681, 2009.

VIEIRA, S. **Bioestatística, Tópicos Avançados**. Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

VILLIERS, E-M DE *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**. 324, 17– 27, 2004.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**. October; 445(0): 175–186, 2013.

WESTRICH, J. A.; WARREN, C. J.; PYEON, D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. **Virus Research**. 231, 21–33, 2017.

WHO. World Health Organization. Sexually Transmitted Infections (STIs) - The importance of a renewed commitment to STI prevention and control in achieving global sexual and reproductive health. 2013.

WHO. World Health Organization. **Weekly epidemiological record - Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017**. No 19, 92, 241–268, 2017.

YAMASAKI, K. *et al.* Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. **Journal of Human Genetics**. 56, 313–315, 2011.

ZHAO, Q. *et al.* Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. **Trends in Biotechnology**. November, Vol. 31, No. 11, 2013.

ZUIVERLOON, T. C. M. *et al.* A methylation assay for the detection of non-muscleinvasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine. **BJU International**. v.109, n.6, p:941–948, 2012.

ZUIVERLOON, T. C. M. *et al.* Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay. **Journal of Urology**. v.186, n.2, p: 707–712, 2011.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1288, F55-F78, 1996.

ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM

Pesquisador: Danielle Albuquerque Pires Rocha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50907415.3.0000.5020

Instituição Proponente: Instituto de Saúde e Biotecnologia - ISB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.329.807

Apresentação do Projeto:

Resumo:

Introdução: As infecções sexualmente transmissíveis são afecções ubíquas e bastante prevalentes em todo mundo. Esses patógenos podem ser infecciosos, porém, sem a presença de sintomas, e assim a transmissão ocorre, com frequência, em pessoas que não percebem que têm uma infecção, funcionando como reservatórios silenciosos do patógeno. As implicações das DST em gestantes são bastante graves, pois podem colocar em risco a saúde e a sobrevivência do feto. Quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente podem culminar com aborto, gravidez ectópica, parto prematuro ou ainda serem transmitidas de mãe para filho intra-útero ou no momento do parto (transmissão vertical), levando sérios transtornos para o neonato, podendo causar conjuntivite, infecções em orofaringe, otite média, infecções do aparelho respiratório (pneumonia), dentre outras afecções. **Objetivo:** O objetivo desta pesquisa é estudar a epidemiologia das infecções sexualmente transmissíveis em mulheres gestantes atendidas na Rede Municipal de Saúde do município de Coari, Amazonas, e correlacionar estas infecções com algumas características e desfechos clínicos. **Metodologia:** Gestantes atendidas nas Unidades Básicas de Saúde e no Hospital Regional de Coari serão convidadas a participar, respondendo a um questionário e fornecendo uma amostra de urina e de raspado vaginal. Será extraído o DNA das amostras e será pesquisado através de técnicas moleculares de diagnóstico o



Continuação do Parecer: 1.329.807

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do Exposto somos pela Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_608363.pdf	04/11/2015 19:53:38		Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoAssinada.pdf	04/11/2015 19:53:09	Danielle Albuquerque Pires Rocha	Aceito
Outros	AnuenciaSEMSA.pdf	17/10/2015 18:15:45	Danielle Albuquerque Pires Rocha	Aceito
Outros	TermoDeAssentimento.docx	17/10/2015 18:13:29	Danielle Albuquerque Pires Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	17/10/2015 18:12:36	Danielle Albuquerque Pires Rocha	Aceito
Outros	Questionario.docx	17/10/2015 18:11:50	Danielle Albuquerque Pires Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.docx	17/10/2015 18:10:25	Danielle Albuquerque Pires Rocha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 19 de Novembro de 2015

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a Senhora para participar da Pesquisa "EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM GESTANTES NO MUNICÍPIO DE COARI, AMAZONAS", sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha, a qual pretende identificar as infecções por patógenos sexualmente transmissíveis em gestantes do município de Coari. Sua participação é voluntária e se dará respondendo a um questionário que será aplicado por um técnico de saúde, além de coleta de material do colo do útero e/ou vaginal e urina.

O material coletado será utilizado unicamente para os objetivos da pesquisa e serão encaminhados para realização de exames especializados para pesquisa de patógenos sexualmente transmissíveis. Necessito de sua autorização para coletar, guardar e usar este material coletado para pesquisas futuras de modo a tornar possível o delineamento de estudos de prevalência e associações de infecções por patógenos sexualmente transmissíveis (DST) com algumas condições clínicas, tais como parto prematuro, aborto, baixo peso do bebê, dentre outras coisas, que responderão a novas perguntas científicas (segundo consta na resolução 441/11 do Conselho Nacional de Saúde). Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. Caso o material coletado não se encontre em condições de armazenagem, necessito de sua autorização para o descarte dos mesmos. A senhora será informada quanto a perdas ou destruição de suas amostras biológicas. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos, sendo apenas pequeno incômodo no momento da coleta do material biológico. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o aumento no conhecimento sobre a infecção por patógenos sexualmente transmissíveis e sua relação com algumas condições clínicas nas gestantes.

Se depois de consentir sua participação a senhora desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, bem como retirar o consentimento de guarda e utilização de sua amostra biológica independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa, nem do seu tratamento ou atendimento no serviço de saúde. A Sra. não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados em artigos científicos, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

Para qualquer acesso aos resultados da pesquisa ou outra informação, a Sra poderá entrar em contato com os pesquisadores no endereço Rua Estrada Coari/Maniá, N.305, Bairro Espírito Santo, Universidade Federal Do Amazonas-UFAM, Coari/AM pelo telefone (97) 3561-2363.

Consentimento Pós-Informação

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

Haverá necessidade de novo consentimento para uma nova pesquisa com o material armazenado ()

Dispensar o novo consentimento a cada pesquisa ()

Coari, ___/___/___

Assinatura da participante - Paciente

Assinatura da pesquisador



Anexo 3 – Termo de Assentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA

Termo de assentimento

Você está sendo convidada a participar da pesquisa “Epidemiologia de infecções sexualmente transmissíveis em gestantes no município de Coari, Amazonas”. Seus pais já permitiram que você participe, mas você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, e não terá nenhum problema se desistir. Nesta pesquisa, estamos estudando as infecções por patógenos sexualmente transmissíveis e algumas situações clínicas nas gestantes, tais como parto prematuro, aborto, peso do bebê, dentre outras coisas.

Todas as adolescentes grávidas que estiverem fazendo pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde de Coari ou que derem entrada no Hospital Regional para ter bebê serão convidadas a participar também. Neste momento, se você concordar em participar, responderá um questionário e cederá um pouco de urina ou será feita uma pequena coleta de raspado de colo de útero ou vagina. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos, sendo talvez um pequeno incômodo no momento da coleta do material para o exame.

O uso do material coletado será utilizado unicamente para os objetivos da pesquisa. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sem identificar os nomes das pessoas que participaram da pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida, ou quiser desistir de participar a qualquer momento, você pode ligar para o telefone (97)35612363 e falar com a Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha, ou ainda se dirigir à Universidade Federal do Amazonas na Es. Coari Mamiá, 305, Espírito Santo, Coari/AM.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “Epidemiologia de infecções sexualmente transmissíveis em gestantes do município de Coari, Amazonas” que tem com objetivo “Estimar a frequência da infecção por patógenos sexualmente transmissíveis em gestantes atendidas no Hospital Regional de Coari, no município de Coari”. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que não vai haver nenhum problema para mim. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Coari, ___/___/___

Assinatura da participante - Paciente

Assinatura da pesquisadora

Anexo 4 – Questionário

QUESTIONÁRIO

Ficha n° _____

Epidemiologia das infecções sexualmente transmissíveis em gestantes no município de Coari, Amazonas, Brasil

IDENTIFICAÇÃO

1. Nome: _____
2. Data da abordagem: ____/____/____ 3. Idade: _____ 4. Data de nascimento: ____/____/____
5. Naturalidade: _____ 6. Telefones: _____
7. Endereço: _____
8. Unidade de Saúde _____

ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS

9. Qual é o seu grau de escolaridade?
- 9.1 Ensino fundamental incompleto () 9.2. Ensino fundamental completo ()
- 9.3. Ensino médio incompleto () 9.4. Ensino médio completo () 9.5. Ensino superior incompleto () 9.6. Ensino superior completo () 9.7. Pós-graduação ()
10. Ocupação: _____
11. Qual a renda total da sua família? _____
12. Qual é a sua renda pessoal? _____

ASPECTOS DE HISTÓRIA CLÍNICA/IST

13. Qual é o seu estado conjugal?
- 13.1. Solteira () 13.2. Casada/união estável () 13.3. Divorciada/Separada/Viúva ()
14. Quantas gestações a senhora já teve? _____
15. A senhora já teve algum aborto? _____
16. Se já, quantos foram espontâneos? _____
17. Se já, quantos foram provocados? _____
18. Qual idade do primeiro parto ou aborto? _____
19. Teve algum parto prematuro(<37 semanas)? 19.1. Sim () 19.2. Não ()
20. Número de filhos? _____
21. Com que idade teve sua primeira relação sexual? _____
22. Nestes últimos 12 meses a senhora teve relação sexual com quantos parceiros? _____
23. Quantos parceiros sexuais a senhora já teve ao longo da sua vida? _____

24. Com que frequência a senhora usa(va) preservativo com este(s) parceiro(s) ?
 24.1. Sempre () 24.2. Às vezes () 24.3. Nunca ()
25. Se não usava, qual o motivo? _____
26. A senhora usa algum método anticoncepcional (exceto camisinha)?
 26.1. Pílula (anticoncepcional oral) () 26.2. Anticoncepcional injetável () 26.3. Dispositivo intra-uterino (DIU) () 26.4. Laqueadura de trompas () 26.5. Coito interrompido () 26.6. Outro ()
- Especificar: _____
27. A senhora já teve alguma doença sexualmente transmissível? 27.1. Sim () 27.2 Não ()
28. Se sim, qual é esta doença? 28.1. HPV (doenças relacionadas) () 28.2. Hepatite B ()
 28.3. Herpes genital () 28.4. Clamídia () 28.5. Gonorréia () 28.6. Tricomoníase ()
 28.7. Sífilis () 28.8. HIV () 28.9. Outra () Especificar: _____
29. A senhora já usou ou usa algum tipo de droga injetável? 29.1. Sim () 29.2. Não ()
30. A senhora se relaciona ou já se relacionou sexualmente com algum parceiro (fixo ou eventual) que você sabia ser usuário de algum tipo de droga injetável? 30.1. Sim () 30.2. Não ()
31. A senhora já fez alguma tatuagem no seu corpo? 31.1. Sim () 32.2. Não ()
32. A senhora trabalha em alguma Unidade de Saúde (UBS, hospital, consultório odontológico, etc)?
 32.1. Sim () 32.2. Não ()
33. Está apresentando alguma queixa clínica no momento? 33.1. Sim () 33.2. Não ()
34. Se sim, quais? 34.1. Úlceras genitais () 34.2. Dificuldade de urinar () 34.3. Corrimento vaginal ()
 34.4. Corrimento uretral () 34.5. Coceira () 34.6. Dor pélvica () 34.7. Sangramento após relação sexual () 34.8. Outras () Especificar: _____
35. A senhora fuma? 35.1. Sim () 35.2. Não ()
36. Se sim, com que frequência? 36.1. Ocasionalmente (às vezes) () 36.2. Diariamente ()
37. Há quanto tempo (anos ou meses)? _____ 38. Quantos cigarros por dia? _____
39. A senhora ingere bebida alcoólica mais de três vezes na semana? 39.1. Sim () 39.2. Não ()
40. A senhora toma algum medicamento prescrito antes do pré-natal (antes da gravidez)?
 40.1 Sim () 40.2 Não ()
41. Se sim, qual é o tipo? 41.1. Anti-hipertensivo () 41.2. Para controle do diabetes ()
 41.3. Antiinflamatório () 41.4. Analgésico () 41.5. Outro () Especificar: _____
42. Atualmente a senhora está tomando algum medicamento prescrito no pré-natal (durante a gravidez)?
 42.1 Sim () 42.2 Não ()
43. Se sim, qual é o tipo? 43.1. Anti-hipertensivo () 43.2. Para controle do diabetes () 43.3. Antibiótico ()
 43.4. Antifúngico () 43.5. Antiinflamatório () 43.6. Analgésico () 43.7. Outro () Especificar: _____

GRUPO 1 e 2

44. Semanas de gestação: _____ 45. Data da última menstruação: _____/_____/_____
46. Parâmetro utilizado para considerar a duração da gestação? 46.1. DUM () 46.2. USG ()
47. Quantas consultas de pré-natal já fez? _____
48. Hipertensão durante a gravidez? 48.1. Sim () 48.2. Não ()

49. Diabetes gestacional? 49.1. Sim () 49.2. Não ()
50. Teste rápido HIV: 50.1. HIV positivo () 50.2. HIV negativo () 50.3. Não fez ()
- 50.4. Discordantes ()
51. Sorologia Anti-HIV: 51.1. Anti-HIV positivo () 51.2. Anti-HIV negativo () 51.3. Não fez ()
52. Teste rápido Sífilis: 52.1. Sífilis positivo () 52.2. Sífilis negativo () 52.3. Não fez ()
- 52.4. Discordantes ()
53. Sorologia VDRL: 53.1. VDRL positivo () 53.2. VDRL negativo () 53.3. Não fez ()
54. Teste rápido Hepatite B: 54.1. HBV positivo () 54.2. HBV negativo () 54.3. Não fez ()
55. Sorologia Hepatite B: 55.1. HBsAg positivo () 55.2. HbsAg negativo () 55.3. Anti HBcT positivo ()
- 55.4. Anti HBcT negativo 55.5. IgM positivo () 55.6. IgM negativo () 55.7. Anti HBs positivo ()
- 55.8. Anti HBs negativo 55.9. Não fez ()
56. Teste rápido Hepatite C: 56.1. Hep C positivo () 56.2. Hep C negativo () 56.3. Não fez ()
57. Sorologia Hepatite C: 57.1. Anti HCV-positivo () 57.2. Anti HCV negativo () 57.3. Não fez ()
58. Sorologia Toxoplasmose: 58.1. Toxo positivo () 58.2. Toxo negativo () 58.3. Não fez ()
59. Sorologia Citomegalovírus Humano: 59.1. HCMV positivo () 59.2. HCMV negativo () 59.3. Não fez ()

INFORMAÇÕES SOBRE O PARTO e RECEM-NASCIDO (Grupo 2)

60. Profissional que realizou o parto? 60.1. Médico obstetra () 60.2. Médico não obstetra () 60.3. Médico não especificado () 60.4. Enfermeira/Obstetiz () 60.5. Outro ()
- Especificar _____
- 61 Tipo de parto: 61.1. Natural () 62.2. Cesariano ()
63. Se parto cesariano, por que? _____
64. Duração da gestação considerada pelo profissional que fez o parto? _____ Semanas
65. Parâmetro utilizado para considerar a duração da gestação? 65.1. DUM () 65.2. USG ()
66. Intercorrências no parto dignas de nota? 66.1. Sim () 66.2. Não ()
67. Se sim, especificar: _____
68. Pré-clâmpsia? 68.1 Sim () 68.2. Não ()
69. Feto nascido vivo? 69.1. Sim () 69.2. Não ()
70. Peso do recém-nascido: _____
71. Tamanho do recém-nascido: _____
72. Relato de infecção urinária atual ou durante a gestação? 72.1. Sim () 72.2. Não ()
73. Se sim, foi tratada no pré-natal? 73.1. Sim () 73.2. Não ()

Anexo 5 - Protocolo de extração de DNA genômico de células uroteliais excretadas na urina com QIAamp® Viral RNA Mini Kit.

Protocolo com modificação no tempo de incubação em temperatura ambiente das amostras após colocado o tampão de lise e na velocidade e no tempo da centrifugação.

Antes de começar o processo de extração adicionar etanol absoluto no AW1 e AW2, Conforme a quantidade que o fabricante recomenda. As amostras estando devidamente separadas, seguir protocolo abaixo:

1. Adicionar 560 µl de tampão AVL contendo RNA transportador em 140 µl de *pellets* de urina
2. Incubar a temperatura ambiente (15-25° C) por 30 min
3. Dá um spin
4. Adicionar 560 µl de etanol (96-100%) - (Gelado)
5. Agitar no vórtex por 15 segundos
6. Dá um spin
7. Pipetar a mistura numa coluna DNase spin
8. Centrifugar a 8000 rpm por 2 min
9. Descartar o filtrado e posicionar a coluna em novo microtúbulo de 2mL
10. Adicionar 500 µl de tampão AW1
11. Centrifugar a 8000 rpm por 2 min
12. Repetir o passo 9
13. Adicionar 500 µl de tampão AW2
14. Centrifugar a 12000 rpm por 4 min
15. Repetir o passo 9
16. Adicionar 120 µl de tampão AVE no centro da membrana da coluna e incubar por 1 min
17. Centrifugar a 8000 rpm por 4 min
18. Descartar a coluna DNase spin, fazer alíquotas e armazenar o filtrado contendo o DNA extraído a -20 °C.

Anexo 6 - Protocolo de extração de DNA genômico de amostras cérvico vaginais com QIAamp® DNA Mini Kit.

Protocolo com modificação na velocidade e no tempo da centrifugação.

Antes de começar o processo de extração adicionar etanol absoluto no AW1 e AW2, Conforme a quantidade que o fabricante recomenda. As amostras estando devidamente separadas, seguir protocolo abaixo:

1. Adicionar em 200 µL da amostra, 20uL de proteinase K e 200 µL de tampão de lise (AL).
2. Agitar no vórtex durante 15 segundos
3. Incubar a 30 min a 56° C no termobloco.
4. Dá um spin
5. Adicionar 200 µL de etanol (Gelado)
6. Agitar no vórtex durante 15 segundos
7. Dá um spin
8. Transferir o lisado para a coluna DNAse spin
9. Centrifugar a 8.000 rpm por 2 minutos.
10. Trocar o coletor
11. Adicionar 500 µL do tampão de lavagem (AW1)
12. Centrifugar a 8.000 rpm por 2 minutos.
13. Trocar o coletor
14. Adicionar 500 µL do tampão de lavagem (AW2),
15. Centrifugar a 12.000 rpm por 4 minutos
16. Trocar o coletor
17. Adicionar 140 µL do tampão de eluição (AE).
18. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente
19. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos.
20. Jogar fora coluna DNAse spin (cuidado para não jogar o coletor, pois é nele que está o DNA)
21. Ao finalizar a extração, fazer as alíquotas e armazenar a -20° C.