



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ISMAEL GOMES DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM
MULHERES COM LESÕES INTRA-EPITELIAIS ESCAMOSAS OU INVASIVAS,
EM TERESINA- PIAUÍ.**

Recife

2018

ISMAEL GOMES DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM
MULHERES COM LESÕES INTRA-EPITELIAIS ESCAMOSAS OU INVASIVAS, EM
TERESINA- PIAUÍ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientador: **Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto**

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rocha, Ismael Gomes da

Caracterização molecular do papilomavirus humano em mulheres com lesões intra-epiteliais escamosas ou invasivas em Teresina – Piauí / Ismael Gomes da Rocha. – 2018.

59 f. : il.

Orientador: Jacinto da Costa Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doenças por papilomavirus 2. Colo uterino – Câncer I. Costa Neto, Jacinto da (orientador) II. Título.

618.14

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 167

ISMAEL GOMES DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM
MULHERES COM LESÕES INTRA-EPITELIAIS ESCAMOSAS OU INVASIVAS,
EM TERESINA- PIAUÍ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 15/03/2018

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dr^a. Ivone Antônio de Souza

(Dep. de Antibióticos - UFPE)

Profa. Dr^a. Rosa Valéria da Silva Amorim

(Dep. de Histologia e Embriologia - UFPE)

Profa. Dr^a. Bárbara Simas Chagas

(Dep. de Genética - UFPE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof.^a Dr.^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Larrazábal

VICE-DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães



pósMorfotec
Programa de Pós-Graduação
em Morfotecnologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

VICE-COORDENADOR

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

CORPO DOCENTE

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Prof.^a Dr.^a Cláudia Sampaio de Andrade
Lima
Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues
Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcante da Silva
Prof. Dr. Gilberto Gonçalves
Rodrigues Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de
Souza Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva
Neto Prof. Dr. Jeymesson Raphael
Cardoso Vieira

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de
Medeiros Prof.^a Dr.^a Kenia Valença
Correia Prof.^a Dr.^a Luciana Maria
Silva de Seixas Maia
Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da
Silva Prof.^a Dr.^a Paloma Lys de
Medeiros Prof. Dr. Ricardo Yara
Prof.^a Dr.^a Rosa Valeria da
Silva Amorim
Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais sempre dedicados Francisco e Lourdes, minhas irmãs: Irlândia, Ivone, Iracema, meus irmãos: Ivonildo e Rodrigo e minhas sobrinhas: Yasmin, Isadora e Mariane, pelo amor e apoio incondicional.

Aos colegas do Mestrado em Morfotecnologia, pela motivação e companheirismo nessa trajetória.

À Ana Kássia pela sua receptividade em Recife e amizade.

À Rilla, Janaina, Jack e Erlane pela amizade de sempre.

À Kelly pelo apoio, suporte e amizade essencial nessa jornada.

Ao Prof. e orientador Jacinto Costa, um exemplo de dedicação e competência, que abriu as portas do seu laboratório, onde realizei as atividades científicas com total liberdade e atributos confiados a mim. Logo só tenho a agradecer a este Professor e Pesquisador que em todos os momentos sempre se posicionou de maneira científica as questões que remetem ao desenvolvimento científico que tanto nos fascina.

Às médicas do Hospital São Marcos: Dra. Sérgia, Dra. Lina e Dra. Fabiana, pela generosidade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, além de transmitirem muito conhecimento.

Aos professores da Morfotecnologia, pela contribuição fundamental para a nossa formação.

À Stella e Itacira, sempre dispostas a ajudar em tudo o que foi preciso, com carinho e tranquilidade.

À Silvana e Romildo, pela importante contribuição na parte técnica histológica.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM) e Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) pela contribuição e companheirismo.

Ao Prof. Antônio Carlos de Freitas, pela colaboração neste trabalho.

À Lucely e Aline, do Laboratório de Patologia do HSM, pela contribuição na etapa de resgate e revisão dos casos e diagnósticos.

Aos membros da banca de defesa, pela disponibilidade em contribuir para qualificação deste trabalho.

*Agradeço a Deus por permitir a
Presença em minha vida
Desde o ingresso nesta jornada
Minha querida e estimada mãe
Maria de Lourdes da Rocha e
Minha irmã Irlândia Rocha
Pessoas essenciais e em que sempre tive
O Total Apoio e incentivo para a realização de
Todas as minhas conquistas, crescimento intelectual
E superação dos obstáculos que surgiram no caminho
Aos meus verdadeiros Amigos,
Pela amizade, apoio e compreensão.*

“Porque nada no mundo é de graça
Você pode até ter medo
Mas ande, caminhe, e só não pare,
Não pare nunca...”

Rosa de Saron

RESUMO

Os tumores na cérvix uterina configuram-se como um importante problema de saúde pública, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, e o segundo em número de mortes, conforme as estimativas mundiais. O desenvolvimento do câncer de colo uterino está diretamente relacionado à infecção persistente pelo HPV (Papilomavirus Humano). Lesões intraepiteliais (pré-malignas), quando não tratadas, podem progredir a lesões invasivas (malignas). As alterações dessas lesões podem ser detectadas pelo exame citológico (Papanicolau) e confirmadas pelo exame histológico. O presente estudo realizou um levantamento genético dos tipos de HPVs (alto risco oncogênico) em mulheres com lesões intraepiteliais escamosas ou invasivas que realizaram exame citológico e colposcópico na clínica ginecológica do Hospital São Marcos (HSM), em Teresina, Piauí, utilizando PCR e nested PCR. Foram avaliadas 113 amostras cervicais parafinadas coletadas no período de 2015 a 2016. A idade média foi de 49 anos, variando entre 21 e 85 anos. 62,83% são oriundas do interior do Estado e 37,17% são da capital. O grau de instrução predominante entre elas foi o ensino fundamental (59,29%). 57,52% apresentaram apenas citologia inflamatória, seguido de lesão intraepitelial de alto-grau com 17,70% e carcinoma escamoso somado ao adenocarcinoma com 13,27%. Os exames histopatológicos demonstraram NIC I (neoplasia intraepitelial cervical) em 15,93%, e NIC II/III em 40,71%, enquanto que o carcinoma escamoso atingiu 35,40%. Na análise genotípica do HPV foram encontrados os seguintes tipos: HPV-33 (76,99%); HPV-16 (41,59%); HPV-18 (5,28%); o HPV-31 (3,54%), HPV-45 (1,77%) e o HPV-58 (0,88%). Concluímos que o HPV-33 é o tipo mais prevalente no Piauí e o HPV-16 o segundo, diferentemente de várias regiões do país. Esse estudo demonstra a necessidade de mais estudos de frequência de genótipos de HPV por região do Brasil, devido ao estabelecimento de políticas públicas preventivas, como a vacinação adotada nacionalmente desde 2014 através da vacina quadrivalente (4HPV) para os tipos HPV-6, 11, 16 e 18, não contemplando o HPV-33.

Palavras-chave: histopatológico. câncer cervical. HPV.

ABSTRACT

Tumors in the uterine cervix are an important public health problem, being the fourth most frequent type of cancer among women, and the second in number of deaths, according to the world estimates. The development of cervical cancer is directly related to the persistent infection by HPV (Human Papillomavirus). Intraepithelial (pre-malignant) lesions, when left untreated, may progress to invasive (malignant) lesions. Changes in these lesions can be detected by cytological examination (Papanicolau) and confirmed by histological examination. The present study performed a genetic survey of HPV types (high oncogenic risk) in women with squamous or invasive intraepithelial lesions who underwent cytological and colposcopic examination at the gynecological clinic of the Hospital São Marcos (HSM), in Teresina, Piauí, using PCR and nested PCR. A total of 113 paraffin-shaped cervical samples were collected between 2015 and 2016. The mean age was 49 years, ranging from 21 to 85 years. 62.83% are from the interior of the State and 37.17% are from the capital. The predominant level of education among them was elementary education (59.29%). 57.52% presented only inflammatory cytology, followed by high-grade intraepithelial lesion with 17.70% and squamous carcinoma added to adenocarcinoma with 13.27%. Histopathological exams revealed CIN I (cervical intraepithelial neoplasia) in 15.93%, and CIN II / III in 40.71%, while squamous cell carcinoma reached 35.40%. In genotypic analysis of HPV the following types were found: HPV-33 (76.99%); HPV-16 (41.59%); HPV-18 (5.28%); HPV-31 (3.54%), HPV-45 (1.77%) and HPV-58 (0.88%). We conclude that HPV-33 is the most prevalent type in Piauí and HPV-16 the second, differently from several regions of the country. This study demonstrates the need for more frequency studies of HPV genotypes by region of Brazil, due to the establishment of preventive public policies, such as the vaccination nationally adopted since 2014 through the quadrivalent vaccine (4HPV) for HPV-6, 11, 16 and 18, not contemplating HPV-33.

Keywords: histopathological. cervical cancer. HPV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número estimado (milhares) de novos casos (incidência) de câncer e óbitos (mortalidade) em mulheres em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas do mundo em 2012.....	21
Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo.....	21
Figura 3 – taxas brutas de incidência estimadas para 2018 por sexo, segundo estado e capital.....	22
Figura 4 - Esquema da estrutura genômica do HPV.....	23
Figura 5 – O ciclo viral e a transformação neoplásica induzida pelo HPV.....	24
Figura 6 - Frequência de idade.....	36
Figura 7 - Frequência do HPV x Idade.....	39
Figura 8 - Gel representativo demonstrando a tipificação viral com o uso dos <i>primers</i> específicos.....	39
Figura 9 - Frequência de HPV.....	40
Figura 10 - Frequência do HPV x diagnóstico citológico.....	41
Figura 11 - Frequência das coinfeções por HPV.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados na detecção do HPV.....	34
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados na tipificação do HPV.....	35
Tabela 3 - Frequência de diagnóstico citológico.....	37
Tabela 4 - Frequência dos diagnósticos histopatológicos.....	37
Tabela 5 - Relação citologia x histopatológico.....	38
Tabela 6 - Distribuição das amostras analisadas quanto à detecção viral.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC-H Célula escamosa atípica não excluindo HSIL

ASC-US Atipia escamosa de significado indeterminado

CC Câncer cervical

CH Captura híbrida

DNA Ácido desoxirribonucleico

E2 Proteína viral precoce 2

E4 Proteína viral precoce 4

E5 Proteína viral precoce 5

E6 Proteína viral precoce 6

E7 Proteína viral precoce 7

EtOH Etanol

HSIL Lesão intraepitelial de alto grau

HPV Papilomavírus humano

HIV Vírus da imunodeficiência humana

INCA Instituto nacional de câncer

LCR *Long control region*

LSIL Lesão intra-epitelial de baixo grau

L1 Proteína viral tardia 1

L2 Proteína viral tardia 2

NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
VLP	Partículas semelhantes a vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 EPIDEMIOLOGIA	20
2.2 HPV E SEU CICLO DE INFECÇÃO	22
2.3 HPV E A TRANSFORMAÇÃO NEOPLÁSICA	24
2.4 PROGRESSÃO DAS LESÕES CERVICAIS	26
2.5 DIAGNÓSTICO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS E DO CÂNCER CERVICAL	26
2.5.1 Citologia Oncótica	27
2.5.2 Colposcopia	28
2.5.3 Histopatológico	28
2.5.4 Técnicas moleculares	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 TIPO DE ESTUDO	32
4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	32
4.3 LOCAL DO ESTUDO	32
4.4 POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO	32
4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	33
4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	33
4.7 DETECÇÃO DO HPV	33
4.7.1 Obtenção da Amostra e Extração dos Ácidos Nucléicos	33
4.7.2 Detecção do DNA do HPV	33
4.7.3 Genotipagem do HPV por <i>Primers</i> Específicos	34
4.7.4 Análise Estatística	35
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	42
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO COLETA	53

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	54
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO PE.....	56
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO PI.....	60

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical representa 9% dos casos de câncer feminino e é a terceira causa de câncer em mulheres em todo o mundo, com mais de 529 mil casos novos e 275,000 mortes por ano (JEMAL et al., 2011). E 85% do câncer cervical ocorrem em países em desenvolvimento (BRUNI et al., 2010).

É amplamente aceito que o principal fator etiológico para câncer de colo do útero e lesões precancerosas são infecções persistentes causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) (ZUR HAUSEN, 1996). Estimativas mundiais indicam que aproximadamente 20% de indivíduos normais estão infectados pelo Papilomavírus humano (HPV), e a cada ano surgem em torno de 500.000 casos novos de câncer de colo uterino, dos quais cerca de 70% ocorrem em países subdesenvolvidos. Além disso, acredita-se que nessas regiões ocorram de 10 a 20 vezes mais lesões precursoras deste tipo tumoral, o que significa um número elevado de indivíduos acometidos por essa doença (TERMINI et al., 2008).

A infecção pelo HPV é condição necessária para o desenvolvimento do câncer cervical e já está bem estabelecido que os genótipos de alto risco, ou seja, HPVs de alto risco oncogênico, estão intimamente associados a cerca de 95% dos casos de carcinoma escamoso do colo do útero (CHATURVEDI, 2010). Entretanto, a presença isolada do HPV não assegura a carcinogênese cervical (MATSUMOTO & YOSHIKAWA, 2013). É necessária a infecção e persistência associada aos cofatores, os quais atuam em consonância com os mecanismos virais, a fim de estabelecer a iniciação e progressão da neoplasia do colo uterino (GREEN et al., 2007; APPLEBY et al., 2009).

Estudos epidemiológicos têm relatado consistentemente marcadores de atividade sexual, incluindo número de parceiros sexuais recentes / de vida e idade em estréia sexual para estar entre os fatores de risco mais importantes para a infecção por HPV. Independente dos marcadores de atividade sexual, outros fatores relacionados à infecção pelo HPV ou a persistência incluem idade jovem, status socioeconômico, multiparidade, circuncisão, uso de preservativo, uso de anticoncepcionais orais, tabagismo, nutrição, supressão imune, carga viral, bem como certos polimorfismos genéticos no sistema de antígeno leucocitário humano (TOTA et al., 2011). Além disso, estudos têm demonstrado associação entre o uso de contraceptivos orais e infecção persistente pelo HPV a progressão do câncer cervical (EFIRD et al., 2011). Os resultados de um estudo com polimorfismos associados ao desenvolvimento de lesões cervicais forneceram indícios de que os anticoncepcionais podem atuar

sinergicamente aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões cervicais de alto grau (AMARAL et al., 2014).

Está consolidado que os HPVs de alto risco são os responsáveis pelo desenvolvimento carcinogênico no colo do útero, visto que, a infecção persistente por mais de 2 anos desses vírus, resulta na expressão dos oncogenes virais E5, E6 e E7, cujos produtos proteicos interferem na regulação do ciclo celular e ocasionam instabilidade genômica nas células infectadas (ZUR HAUSEN, 2002; PITTAYAKHAJONWUT; ANGELETTI, 2010).

Não havendo intervenção, os genes E6 e E7 do DNA viral, se integrará ao genoma do hospedeiro levando ao superexpressão e, conseqüentemente, o desenvolvimento de lesões intraepiteliais do tipo NIC I, passando por lesões intermediárias e avançadas do tipo NIC II e NIC III em aproximadamente 2 a 3 anos da infecção e iniciando-se a transformação carcinogênica entre 10 e 12 anos ou mais, dependerá das condições do hospedeiro até atingir lesões invasivas (WALLIN et al, 1999; ZIELINSKI et al, 2001; WINER et al, 2005).

Apesar do progresso no rastreamento do câncer de colo uterino, inclusive com campanhas preventivas em alguns países utilizando o método da citologia (Papanicolaou), um elevado número de resultados falso-negativos e falso-positivos é observado (DEHN et al., 2007; HWANG, SHROYER, 2012), além de haver controvérsias em relação ao manejo das pacientes com lesões pré-invasivas ou exames moleculares indicativos de infecção pelo HPV de alto risco (PETRY, 2011; MASSAD et al., 2013). Isso evidencia a necessidade de se identificar métodos complementares como os biomarcadores que contribuam com a precisão do diagnóstico e fornecer informações quanto ao risco de progressão da doença.

O número de infecções pelo HPV de alto risco é da ordem de milhões (DE SANJOSÉ et al., 2007; DUNNE et al., 2007), contudo, apenas uma pequena percentagem progride a lesões que podem chegar à invasão (INSINGA et al., 2004).

Embora perspectivas de redução destas taxas tenham emergido com a implementação das campanhas de vacinação contra os principais HPVs oncogênicos em alguns países (MARKOWITZ et al., 2012), permanecem incertezas em relação ao nível de proteção através das vacinas a longo prazo. Além disso, haverá um período de transição com grupos remanescentes não vacináveis, sendo necessárias diferentes estratégias para o controle do câncer cervical (LYNGE et al., 2009; TOTA et al., 2014).

Portanto, esse estudo realizou um levantamento genético dos tipos de HPVs (alto potencial oncogênico) em mulheres com lesões intra-epiteliais ou invasivas que realizaram

exame citológico e colposcópico na clínica ginecológica do Hospital São Marcos (HSM), em Teresina, Piauí.

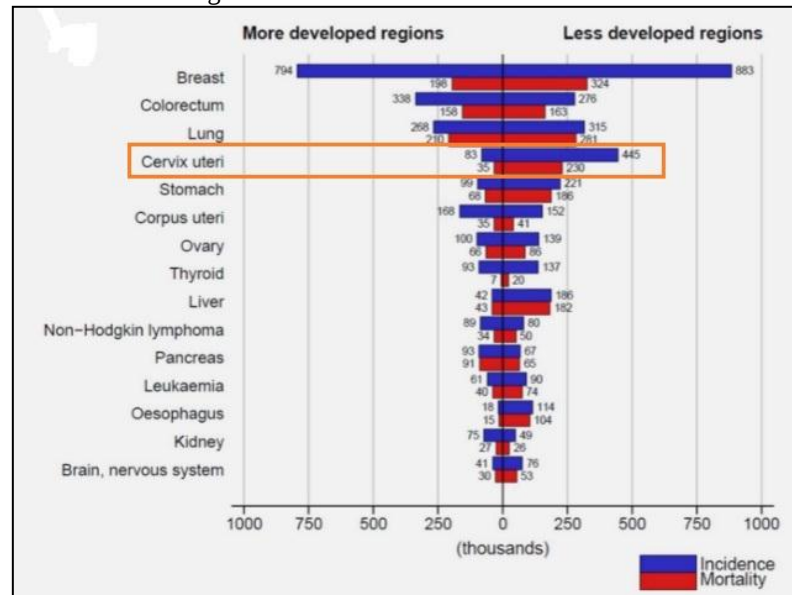
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer do colo do útero ocupa o sétimo lugar no ranking mundial, sendo o terceiro tipo mais comum na população feminina. Em 2012, para o mundo, estimaram-se 528 mil casos novos com uma taxa de incidência de 14/100 mil mulheres e 266 mil mortes por essa neoplasia, correspondendo a 7,5% de todas as mortes por câncer em mulheres. Em termos globais, a maioria dos casos (70%) ocorre em áreas com menores níveis de desenvolvimento humano. Quase nove de cada dez óbitos por câncer do colo do útero ocorrem em Regiões menos desenvolvidas, onde o risco de morrer de câncer cervical antes dos 75 anos é três vezes maior (FERLAY et al., 2013).

As taxas de incidência variam de Região para Região e de país para país, indo de 9,9/100 mil nas Regiões mais desenvolvidas para 15,7/100 mil nas áreas menos desenvolvidas. Em relação às taxas de mortalidade, a variação ocorre de 3,3/100 mil para 8,3/100 mil. Constituem Regiões de maior risco a África Oriental (42,7/100 mil), Melanésia (33,3/100 mil), Sul (31,5/100 mil) e África do Norte (30,6/100 mil). As Regiões que possuem as menores incidências são a Austrália/Nova Zelândia (5,5/100 mil) e a Ásia Ocidental (4,4/100 mil). A mortalidade apresenta uma variação maior, de 2/100 mil na Ásia Ocidental, Europa Ocidental e Austrália/Nova Zelândia, para acima de 20/100 mil na Malásia, África Central e África Oriental (FERLAY et al., 2016). Em 2015, no Brasil, ocorreram 5.727 óbitos por câncer do colo do útero (BRASIL, 2017). Os altos índices de incidência e mortalidade pelo câncer cervical nos países em desenvolvimento são mais evidentes, quando comparados com a realidade apresentada nos países desenvolvidos, onde o câncer de colo ocupa apenas a 11º posição (FERLAY et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1: Número estimado (milhares) de novos casos de câncer (incidência) e óbitos (mortalidade) em mulheres em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas do mundo em 2012.



Fonte: Adaptado de FERLAY et al, 2015.

Segundo as últimas estimativas mundiais para o ano de 2018, é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, e o segundo em número de mortes. Para o biênio 2018-2019, no Brasil, foram esperados 16.370 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. Sendo a terceira neoplasia mais comum dentre a população feminina, apenas suplantada pelo câncer de pele (não melanoma) e o câncer de mama, sendo a quarta causa de morte feminina por câncer (INCA, 2018) (Figura 2).

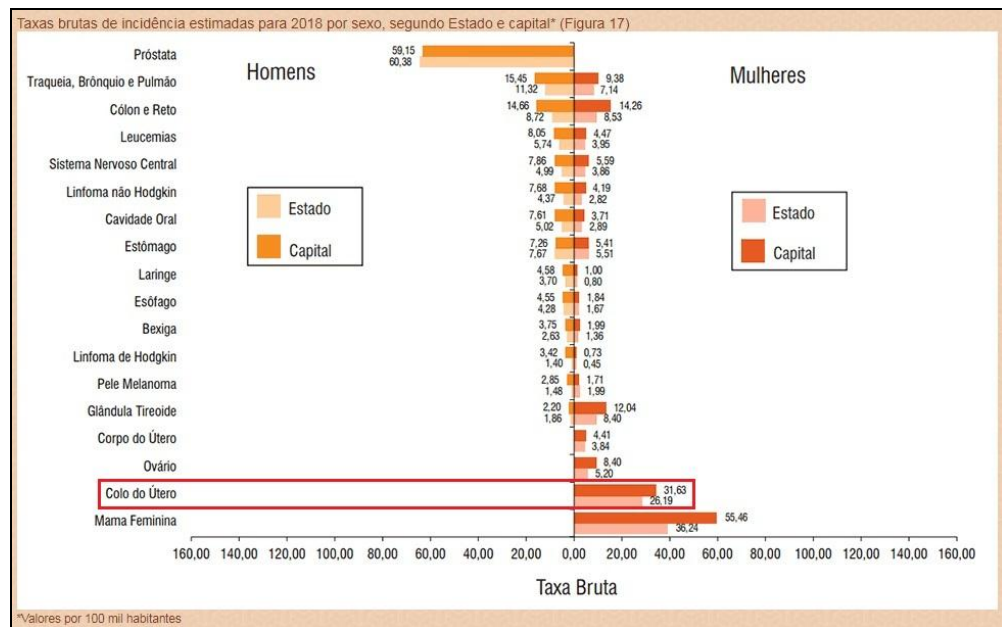
Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

Mulheres	Localização primária	Casos	%
	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: Adaptado do INCA, 2018.

No Piauí, houve uma taxa bruta de incidência estimada de 26,19 casos de câncer do colo do útero para cada 100 mil mulheres, com uma estimativa de 430 novos casos no Estado e 140 na capital Teresina para o ano de 2018 (INCA, 2018) (Figura 3).

Figura 3: taxas brutas de incidência estimadas para 2018 por sexo, segundo estado e capital.



Fonte: Adaptado do INCA, 2018.

Arelados ao estado de pobreza da população, a baixa escolaridade, o comportamento sexual e aos hábitos de higiene, esses critérios sócios demográficos influenciam a atual conjuntura da situação epidemiológica do câncer cervical em escala global (CAPOTE NEGRIN, 2015).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, a incidência do câncer do colo do útero, mostra-se heterogênea, onde é o primeiro mais incidente na Região Norte (25,62/100 mil). Nas Regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil), ocupa a segunda posição mais frequente; enquanto, nas Regiões Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil), ocupa a quarta posição (INCA, 2018).

2.2 HPV E SEU CICLO DE INFECÇÃO

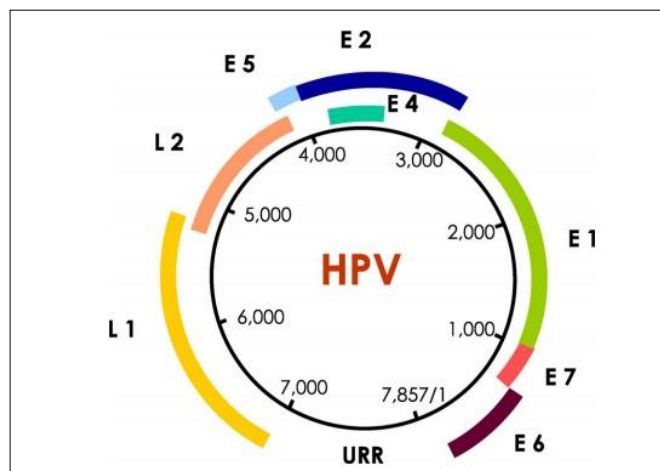
O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, que compreende 29 gêneros e 189 Papilomavírus, em que 120 são HPVs Humanos (BERNARD et al., 2010).

Existem 120 tipos de HPV descritos e divididos em cinco gêneros: Alphapapillomavirus (espécie A), Betapapillomavirus (espécies B), Gammapapillomavirus (espécie G), Mupapilomavirus (M species) e Nupapillomavirus (espécies N) (VILLIERS et al., 2004) (BERNARD et al., 2010).

Aproximadamente 15 desses tipos de HPV foram considerados HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82); seis espécies como HPV de baixo risco (6, 11, 42, 44, 51, 81 e 83) e três espécies como HPV de risco intermediário (26, 53, 66) (ZUR HAUSEN, 2002).

Os HPVs são pequenos vírus de 52 a 55nm de diâmetro, cuja cápsula organiza 72 capsômeros em simetria icosaédrica. Suas partículas consistem em 8 mil moléculas de DNA circulares longas (pb) de pares de bases envolvidas em uma casca de proteína que é composta por duas moléculas (L1 e L2). O genoma tem a capacidade de codificação para estas duas proteínas e pelo menos seis proteínas precoces (E1, E2, E4-E7) que são necessárias para a replicação do DNA viral e para a montagem de partículas de vírus recentemente produzidas dentro das células infectadas. Ambos os conjuntos de genes são separados por uma região reguladora a montante (URR) de cerca de 1000 pb que não codifica proteínas, mas contém elementos cis necessários para a regulação da expressão gênica, replicação do genoma e sua embalagem em partículas de vírus (Figura 4) (MUNÕZ et al., 2006).

Figura 4: Esquema da estrutura genômica do HPV.



Fonte: Adaptado de Munõz et al., 2006

Após a transmissão, o HPV infecta as células basais (células tronco) na junção escamocolumnar ou através de micro traumas presentes na ectocérvice. O DNA viral é transportado para o núcleo, seguindo a rede proteica do citoesqueleto (microtúbulos), após o desnudamento do capsídeo o DNA viral é transportado para o núcleo, seguindo a rede proteica do citoesqueleto (microtúbulos) (ZUR HAUSEN, 1996).

O ciclo biológico do HPV está totalmente ligado ao das células epiteliais hospedeiras, os queratinócitos, onde a replicação viral acompanha a diferenciação e a

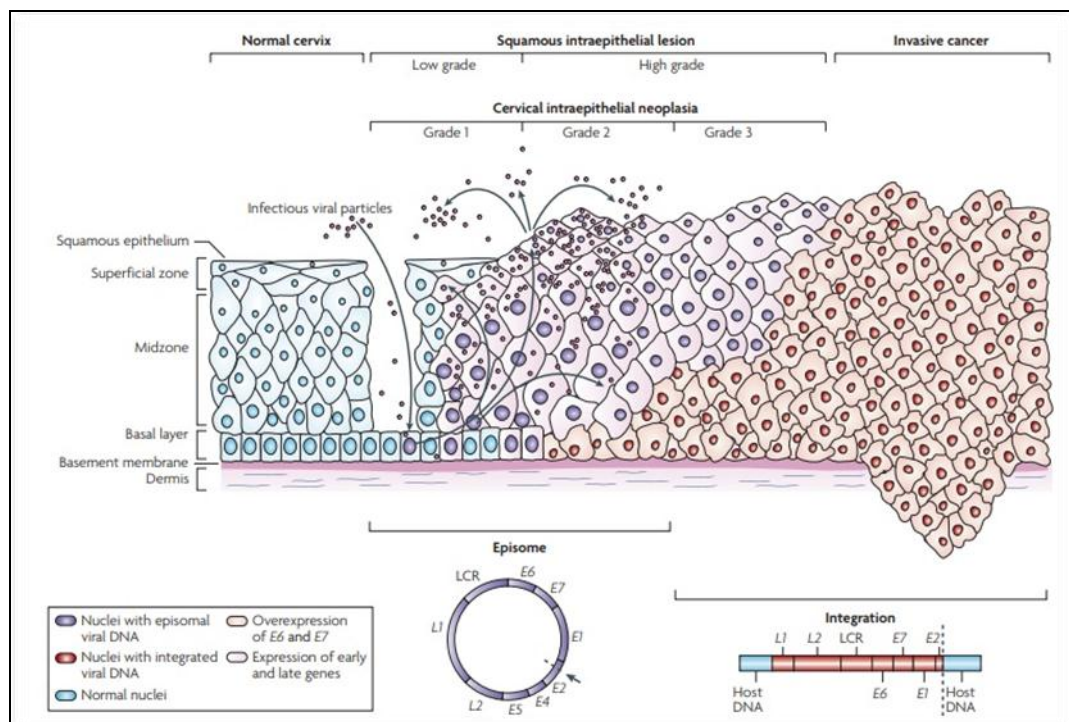
maturação, sendo nas camadas superiores do epitélio em que se encontra maior atividade replicativa e maior quantidade de partículas virais (MOODY et al., 2010).

Os genomas do HPV novamente sintetizados se distribuem em cada célula filha, e à medida que as células epiteliais se diferenciam, há uma amplificação do DNA viral. Quando fatores implicados na diferenciação celular ativam a transcrição dos genes tardios, ocorre a expressão das proteínas L1 e L2 nas camadas mais superficiais do epitélio, permitindo a formação da cápsula do genoma viral. Os novos vírions infectantes finalmente são liberados no meio exterior com as células descamativas, completando o ciclo de infecção do vírus (ZUR HAUSEN, 1996; DOORBAR, 2005).

2.3 HPV E A TRANSFORMAÇÃO NEOPLÁSICA

A perda da capacidade de completar o ciclo é o que diferencia a infecção viral produtiva, presente nas lesões de baixo grau, de uma infecção viral transformante e tumoral, característica dos HPVs de alto risco. O desenvolvimento de neoplasia intraepitelial de grau maior e de câncer cervical (CC) está associado com a perda da regulação deste ciclo reprodutivo do HPV (DOOBAR, 2005) (Figura 5).

Figura 5: O ciclo viral e a transformação neoplásica induzida pelo HPV.



Fonte: Adaptado de Woodman, Collins e Young (2007).

O ciclo viral é extremamente dependente da diferenciação dos queratinócitos. Para manutenção das células em ciclo, as proteínas virais E6 e E7 são expressas em taxas muito baixas, inibidas pela proteína viral E2. Quando, em situação adversa à sua história natural, há uma quebra do genoma viral nas regiões codificantes E1 e E2, ocorre desregulação e consequente superexpressão dos genes E6 e E7. Estes codificam proteínas que irão atuar degradando proteínas celulares responsáveis por levar a célula a apoptose e em genes supressores de tumor, induzindo as células infectadas a um estímulo excessivo de proliferação, o que resulta em instabilidade cromossômica, aneuploidia e modificações no DNA da célula infectada. Na sequência, o DNA viral integra-se ao DNA celular, iniciando a transformação neoplásica (ZUR HAUSEN, 2002).

As moléculas críticas no processo de replicação do vírus são as proteínas virais E6 e E7, que interagem com várias proteínas celulares. Em sistemas experimentais estas interações demonstraram induzir proliferação e eventualmente imortalização e transformação maligna de células (MUNGER et al., 2004).

A excelente capacidade do HPV-16 para persistir e induzir a progressão para malignidade pode ser explicada por uma particularidade nesta fase do seu ciclo de infecção. Como uma aberração da infecção por vírus, a atividade constante das proteínas virais E6 e E7 levando ao aumento da instabilidade genômica, acumulação de mutações oncogênicas, perda adicional de controle de crescimento celular e, finalmente, câncer (DUENSINS, MUNGER, 2005).

O produto do gene E6 aumenta a degradação da proteína p53, enquanto o produto de E7 promove a degradação da proteína pRb (SCHFFNER et al., 1993; GIARRE et al., 2001). A inativação da pRb resulta na superexpressão da proteína p16^{INK4a}, inibidora de quinase 4, uma reguladora da divisão celular, em função de um *feedback* negativo. Estudos mostram que a superexpressão da proteína p16^{INK4A} pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão da lesão e auxiliar na diminuição das variações interobservadores (RAJCÁNI et al., 2009; BERGERON et al., 2010; MISSAOUI et al., 2010).

A eliminação viral é feita entre 3 e 16 meses, variando de acordo com os genótipos considerados. O clearance dos HPVs de baixo risco é da ordem de 3 a 6 meses, enquanto que os de alto risco é de 12 a 16 meses. Em certos casos, a infecção pode ficar latente e ser reativada em um período de imunossupressão. A infecção por HPV de alto risco resulta em progressão para CC apenas em uma pequena percentagem de mulheres, após um longo período de latência (ZUR HAUSEN, 1996; HO et al., 1998).

2.4 PROGRESSÃO DAS LESÕES CERVICAIS

Durante a progressão do tumor, os genomas virais geralmente se integram ao cromossomo do hospedeiro, o que resulta em um nível constante de proteínas E6 e E7 via estabilização do RNAm, pela influência de estruturas de cromatina modificadas ou pela perda de regulação negativa da transcrição mediada pela proteína viral E2 (BERNARD HU, 2009).

A integração viral, situação necessária para a transformação maligna das células por torná-las imortalizadas, não acontece em todos os casos, e o genoma viral é mantido em sua forma episomal. No entanto, grande número de mulheres portadoras do HPV, mesmo dos tipos oncogênicos, não desenvolvem doença ou desenvolvem lesões que regredem ou se estabilizam em estágios pré-invasivos (HO et al., 1998; ZUR HAUSEN, 1999; STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007). Estima-se que, se não tratados, cerca de 5% dos casos de NIC II e 12% a 31% de NIC III irão progredir para carcinoma invasivo (OSTÖR, 1993; MCCREDIE et al., 2008).

2.5 DIAGNÓSTICO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS E DO CÂNCER CERVICAL

Mesmo com a alta mortalidade e morbidade do câncer cervical, as lesões pré-cancerosas podem ser facilmente diagnosticadas através do tripé do diagnóstico: citologia preventiva (Papanicolaou), colposcopia e histopatológico (BOICEA et. Al., 2012).

Os métodos de diagnóstico das lesões induzidas pelos HPV têm como base a identificação de alterações citomorfológicas associadas à replicação viral, como a presença dos coilócitos em células escamosas, portanto um grande halo perinuclear claro com bordas espessas e núcleo atípico, considerado efeito citopático do HPV, através do exame de triagem denominado exame de Papanicolaou ou citológico (citologia oncológica). Este exame reconhece de forma indireta a presença do vírus, mas não é suficiente para diagnosticar ou mesmo genotipar, se faz necessário exames moleculares (GONZALES MF, AKHTAR I e MANUCHA V, 2017).

Ainda considerando os exames com base morfológica, além da citologia oncológica, a colposcopia vem como um exame de localização de área supostamente infectada pelo HPV e suas alterações, onde deverá ser biopsiada para os exames histopatológicos, “padrão ouro” para o diagnóstico da lesão (NAM., 2017).

E preciso utilizar os métodos acima mencionados conjuntamente para se chegar ao diagnóstico final, porém, mesmo sendo a histopatologia o “padrão ouro” no diagnóstico da lesão, o mesmo não é suficiente para genotipar o vírus HPV, recorre-se por sua vez aos

métodos moleculares, tais como: Hibridização *in situ*, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) entre outros (DE VILLIERS., 2004).

2.5.1 Citologia Oncótica

A Citologia oncótica (Papanicolau) é o exame ginecológico de citologia cervical mais utilizado para o rastreio do câncer de colo uterino entre as mulheres. Este exame foi desenvolvido no início do século XX pelo médico Greco-americano George Nicholas Papanicolaou e o patologista romeno Aureli Babès. Foram eles os primeiros a relatar a presença de células cancerosas em esfregaços vaginais e cervicais. Esses dois pesquisadores não se conheciam e desenvolveram seus estudos separadamente e ambos apresentaram seus trabalhos em 1928 (KOSS, GOMPEL, 2006).

A classificação dos resultados dos exames citológicos utiliza a nomenclatura do Sistema Bethesda (2001), um conjunto de nomenclaturas envolvendo a avaliação da citologia baseada nas características celulares com o objetivo de facilitar a conclusão do laudo citológico e assim diminuir as variações interobservador (SILVA NETO, 2012).

Nesse sistema, as lesões intra-epiteliais escamosas encontram-se divididas em lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL). As LSIL são alterações que histologicamente se restringem ao terço inferior do epitélio e abrangem o efeito citopático do HPV (coilocitose), correspondente as antigas denominações de displasia leve e neoplasia intraepitelial cervical (NIC I). As HSIL são alterações que na histologia comprometem ao (terço médio e superior) do epitélio, correspondendo às displasias (moderada e avançada), as neoplasias intra-epiteliais cervicais II e III (NIC II e III) e o carcinoma *in situ* (VIANNA, 2008), além da nomenclatura relativa às lesões glandulares que inclui adenocarcinoma *in situ* e invasor.

Utilizando-se a classificação do Sistema Bethesda, também é possível detectar e descrever alterações muito sutis denominadas de ASC que podem ser subdivididas em dois tipos:

- Células escamosa atípicas de significado indeterminado (ASC-US)
- Células escamosa atípicas não podendo excluir HSIL (ASC-H).

Considerando ASC-US, são aquelas que apresentam aumento da relação núcleo/citoplasma, com um volume nuclear 2 a 3 vezes maior do que o núcleo de uma célula escamosa intermediária normal, núcleos discretamente hipercromáticos, com a cromatina distribuída de forma um pouco irregular e o citoplasma densamente orangeofílico (SOLOMON e NAYAR, 2004).

Na classificação ASC-H, observam-se células com tamanho de células em metaplasia escamosa, aparecendo de forma isolada ou em pequenos fragmentos com menos de dez células. Essas células apresentam núcleos hipercromáticos, irregulares, formas alteradas e com tamanho de uma a duas vezes maiores do que o núcleo de uma célula normal (SOLOMON e NAYAR, 2004; VIANNA, 2008).

2.5.2 Colposcopia

Exame que permite visualizar a vagina e o colo do útero através de um aparelho chamado colposcópio. Este aparelho permite o aumento de 10 a 40 vezes do tamanho normal. Também é com o colposcópio que é examinada a vulva (vulvosopia) (WRIGHT, 2003). Durante o exame são usados produtos químicos e corantes visando realçar as áreas de investigação. Sendo geralmente recomendado para mulheres que tem um resultado anormal do exame de Papanicolau ou para aquelas que durante o exame ginecológico foi notada alguma alteração. Há indicação também quando se faz necessária a coleta de biópsia dirigida do colo do útero ou quando há uma suspeita de HPV. Esse procedimento é necessário porque tem como objetivo detectar carcinoma do colo ainda em fase *in situ* ou microinvasiva, podendo ser efetuado tratamento adequado com chances elevadas de cura (SANKARANARAYANAN, 2003).

A colposcopia é mais do que um elo entre o rastreio citológico e a confirmação da histologia. Ela avalia características que auxiliam na conclusão final do diagnóstico do câncer cervical. Particularidades das lesões são analisadas, como: tonalidade e intensidade aceto-branca, contorno da margem e superfície das áreas aceto-brancas, padrão vascular e permanência do iodo. Tendo melhor eficiência em diferenciar as lesões de baixo grau das de alto grau (BOONLIKIT, 2011).

2.5.3 Histopatológico

Os fragmentos teciduais obtidos pelo colposcopista são analisados no exame histopatológico, ou biópsia, o qual é considerado o padrão ouro para o diagnóstico do câncer cervical (WU et. al., 2005).

As NICs constituem um leque de lesões cervicais escamosas identificadas pela histologia, apesar de ser também utilizada na classificação citológica, ela pode ser classificada em graus I, II e III. A graduação da NIC consiste na definição do aspecto morfológico de severidade da lesão precursora do câncer. Esse sistema atual de classificação agrupa os aspectos sugestivos de NIC I e sinais de infecção pelo HPV nas chamadas lesões de baixo

grau (LSIL), e os de NIC II e III em lesões de alto grau (HSIL) (SOLOMON e NAYAR, 2004).

Essas lesões podem permanecer em um estágio não invasivo por até vinte anos e desprender células anormais que podem ser detectadas pelo exame citológico, o que aumenta sua eficácia na detecção das lesões intra-epiteliais evitando sua progressão, caso venha ser tratado.

As NICs podem não evoluir a câncer, inclusive têm considerável percentual de regreção espontâneo. O risco de persistir ou evoluir para um câncer aumenta de acordo com a gravidade da displasia. Além disso, vários estudos indicam que a persistência da infecção pelo HPV, principalmente de alto risco, é necessária para o desenvolvimento e progressão da NIC para carcinoma invasivo (VIANNA, 2008). Ao estudar a história natural das lesões intraepiteliais cervicais escamosas por metanálise, observou que pacientes com citologia compatível com LSIL e ASC-US apresentam baixo risco relativo de progressão para carcinoma, que é de 1,44% e 0,25% respectivamente (MELNIKOW, 1998). Em outro estudo, que acompanhou 63 pacientes, verificou que a taxa de regressão de lesão entre elas foi de 87,72%, sendo que 7,9% persistiram com LSIL e 20% com HSIL (GIACCIO et al., 2010). Demonstrou-se que a carga de HPV tem uma influência significativa no desenvolvimento de NIC II e III. O risco aumenta com altas quantidades iniciais de DNA de HPV. Assim, a carga viral elevada pode ser usada como marcador de progressão de curto prazo para lesões pré-cancerosas, embora uma carga menor não exclua inevitavelmente a doença progressiva (DALSTEIN et al., 2003). No estudo de KITCHENER et al. (2004) demonstra que as mulheres submetidas à colposcopia imediata apresentaram maior taxa de detecção de NIC de qualquer grau.

2.5.4 Técnicas moleculares

Atualmente a citologia ainda é o principal método de rastreio do câncer cervical. Mas com a evolução da biologia molecular novas técnicas têm contribuído bastante com a acuracidade diagnóstica para o câncer cervical.

A identificação de DNA-HPV, bem como seu subtipo e carga viral são realizados por esses métodos. Atualmente dois tipos gerais de métodos de detecção de DNA-HPV têm sido descritos. A captura híbrida 2 (CH2) é o método molecular mais utilizado em nosso meio para a detecção de HPV. Esta técnica baseia-se na hibridização de DNA, fazendo uso de sondas específicas contra os tipos de HPV considerados de alto risco. A PCR baseia-se na amplificação específica de segmentos do DNA alvo e tem potencial para a detecção de níveis

muito baixos de carga viral em células e tecidos, mesmo em infecções ditas não produtivas. A PCR em tempo real (PCR-TR), por sua vez, é uma variação do método de PCR convencional (PCRC). Esta metodologia permite distinguir as sequências de bases amplificadas de DNA por análise da temperatura de separação das duplas fitas, e, como as reações ocorrem em ambiente fechado, diminui a ocorrência de contaminações. Além disso, o uso de *primers* universais permite, teoricamente, a detecção de todos os tipos de HPV existentes (RODRIGUES et al., 2009). O diagnóstico molecular da infecção pelo HPV é importante para a triagem do vírus e baseia-se, principalmente, em métodos como: captura híbrida (CH), southern blot, hibridização in situ, hibridização em fase sólida (microarrays) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (RAMA, C. H. et al., 2006). Essas técnicas apresentam mais sensibilidade que o exame de Papanicolaou, por exemplo na busca da presença do HPV, podendo assim monitorar as pacientes que podem vir a desenvolver e progredir com lesões intraepiteliais (TERMINI, VILLA; 2008).

No entanto, apesar dos seus benefícios, essas metodologias apresentam algumas limitações diagnósticas, a principal consiste de que essas técnicas apresentam menos especificidade, devido ao fato de que elas não podem separar uma infecção transiente de uma infecção persistente e só mais tarde são associadas com um aumento do risco de uma lesão de alto grau e o câncer (CUZICK et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o levantamento genético dos tipos de HPVs de alto risco em mulheres com lesões cervicais diagnosticadas em Teresina, Piauí.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rastrear por método da PCR a presença do DNA-HPV em amostras cervicais obtidas através de blocos histológicos.
- Classificar o potencial oncogênico dos HPVs encontrados neste estudo.
- Confrontar os dados moleculares (PCR) com os dados citológicos no diagnóstico do HPV, conforme a nomenclatura do Sistema de Bethesda (2001).
- Constatar a taxa de multinfecções, relacionando com o grau histológico da lesão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo será realizado através do método observacional, analítico transversal.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº: 17068913.6.3002.5584 ao Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) e também ao Comitê de Ética em Pesquisa da Associação Piauiense de Combate ao Câncer, obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os pacientes e familiares que, após informação, concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

As informações foram utilizadas única e exclusivamente para a execução do presente projeto e a identidade das participantes foi mantida em sigilo absoluto.

4.3 LOCAL DO ESTUDO

As amostras foram coletadas no setor no Setor de Ginecologia, Colposcopia e Patologia do Hospital São Marcos em Teresina, Piauí. Os exames citológicos e histopatológicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Marcos e as análises biomoleculares foram realizadas em parceria com o Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.4 POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO

Foram avaliadas as fichas de diagnósticos histopatológicos de biopsias do colo uterino obtidas por colposcopia ou por conização, no banco de dados do Sistema de Informação do Controle de Câncer de Colo Uterino – Ministério da Saúde (SISCOLO) entre 2015 e 2016. Onde foram selecionados 109 casos positivos com diagnósticos de lesões intraepiteliais escamosas ou invasivas e 4 casos negativos para lesão, de pacientes apresentando apenas cervicite, sendo resgatados do arquivo no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Marcos, em Teresina, Piauí, Brasil. Foram excluídos os casos para os quais não foi possível localizar os blocos.

O total de 113 casos resgatados foram divididos, conforme diagnóstico histopatológico: NIC I/HPV (18 casos), NIC II (12 casos), NIC III (34 casos), Carcinoma invasor (40 casos), Adenocarcinoma (5 casos) e Cervicite (4 casos).

Foram coletados dos prontuários das pacientes, informações como idade, cidade de origem, cor, grau de instrução, estado civil, número de gestações, período da realização do exame e resultado da citologia e do histopatológico.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com resultado de exame citológico apresentando lesões intraepiteliais e invasivas;
- Pacientes que aceitarem participar do projeto e assinarem o TCLE;
- Pacientes que aceitarem realizar o teste de HIV e apresentarem resultado negativo.

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes portadoras do vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV);
- Pacientes imunossuprimidas por outros fatores não relacionados ao HIV (doenças autoimunes e transplantadas);
- Pacientes vacinadas para HPV (6, 11, 16, 18).

4.7 DETECÇÃO DO HPV

4.7.1 Obtenção da Amostra e Extração dos Ácidos Nucléicos

A obtenção de amostras para extração de DNA das lesões foi realizada por microtomia através de blocos parafinados. Foram cortadas cinco fatias de 10 micras cada e acondicionada em tubos eppendorf de 2 ml com 1,5 ml de xilol.

Para iniciar o processamento o material foi submetido a agitação em vortex e incubado a 37°C por 10 min. Depois centrifugado a 9.500 rpm por 5 min à temperatura ambiente (repetindo essas etapas mais uma vez).

Descartado o xilol e adicionado 1,5 ml de EtOH a 100%, agitado rapidamente no vortex e incubado a 37°C por 10 min. Sendo centrifugado a 9.500 rpm por 5 min à temperatura ambiente (repetindo essas etapas mais uma vez). O pellet formado foi secado à temperatura ambiente para a evaporação por completo do EtOH. A extração de DNA foi realizada conforme instruções do fabricante (kit QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue – Qiagen).

4.7.2 Detecção do DNA do HPV

Para a detecção do DNA do HPV, foi utilizada a PCR com o conjunto de *primers* consenso e degenerado MY09/11. Os *primers* MY09/11 foram utilizados no presente estudo, pois amplificam uma sequência parcial de 450pb altamente conservada do gene L1 de 47

Papilomavírus (GRAVITT et al., 2000). As condições de amplificação da sequência do gene L1 com os primers MY09/11 (Tabela 1) foram as seguintes: 25µl de volume final, 2 µl DNA, 1,5 µl cada oligonucleotídeo, 1X (12,5 µl) solução Master Mix (Promega) e 7,5 µl de H₂O. A amplificação ocorreu em 35 ciclos com 95°C durante 1 minuto para a desnaturação, 55°C durante 30 segundos para o anelamento, 72°C durante 1 minuto para a extensão e um ciclo com 72°C durante 5 minutos para a extensão final. Após a amplificação, o produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Após a detecção com o MY09/11, foi realizado uma Nested PCR com o produto de MY09/11, nas mesmas condições de amplificação da sequência do gene L1 com os primers GP05/06 (Tabela 1).

Tabela 1 - *Primers* utilizados na detecção do HPV.

PRIMER	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	TAMANHO (BP)	
		OLIGO	FRAGMENTO
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	20	
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	20	445
GP05	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	20	
GP06	GAAAAATAAACTGTAAATCA	20	170

Fonte: Autor.

4.7.3 Genotipagem do HPV por *Primers* Específicos

Para a confirmação da tipificação utilizando-se o método PCR/sequenciamento, foram realizadas reações de PCR tipo-específico, utilizando *primers* desenhados para flanquear as regiões E5 dos HPVs 16, 18, 31, 33, 58 e 45 (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 1,0 µl DNA, 1,0 µl de cada oligonucleotídeo, 1X (12,5 µl) solução Master Mix (Promega). As amplificações das LCRs dos HPVs 16, 18, 31, 33, 58 e 45 foram realizadas em 30 ciclos com 95°C durante 3 minutos para a desnaturação, 94°C durante 15 segundos para o anelamento, de acordo com o *primer* específico, usa as temperaturas (60°C, 58°C, 61°C, 53,7°C, 61°C, 57,8°C) durante 1 minuto para a extensão e um ciclo de extensão final a 72°C durante 1 minuto. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Todas as amostras positivas para o DNA do HPVs 16, 18, 31, 33, 58 foram submetidas ao sequenciamento, com a finalidade de confirmar os resultados obtidos com as PCRs tipo-específica e PCR/sequenciamento.

A tipificação do DNA do HPV foi realizada pela técnica de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos específicos para os HPVs 16, 18, 31, 33 e 58, os quais anelam no oncogene E5 (Tabela 2).

Tabela 2 - *Primers* utilizados na tipificação do HPV.

PRIMER	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	TAMANHO (BP)	
		OLIGO	FRAGMENTO
E5 HPV16 F	ACTGGCGTGCTTTTGTCTTG	21	78
E5 HPV16 R	GACACAGACAAAAGCAGCGG	20	
E5 HPV18 F	CGC TTT TGC CAT CTG TCT GT	20	54
E5 HPV18 R	ACA CAA ATA CCA ATA CCC ATG C	22	
E5 HPV31 F	GCT GTC TGT GTC GGT ATA T	19	82
E5 HPV31 R	AAA ACA ACG TAA TGG AGA GG	20	
E5 HPV33 F	CTA TGC TTG GTT GCT GGT GT	20	53
E5 HPV33 R	GAG ATC CCA CAA ACA CCC AAA	21	
E5 HPV58 F	GGG TCG GCT CTA CGA ATT TT	20	94
E5 HPV58 R	CTT GTT GGG TTA AGT ATT GTG C	22	
E5 HPV45 F	TTGTGCTTTTCTGTGTGCCTT	21	131
E5 HPV45 R	GCAAATGCTGTTAATGGGGAT	21	

Fonte: Autor.

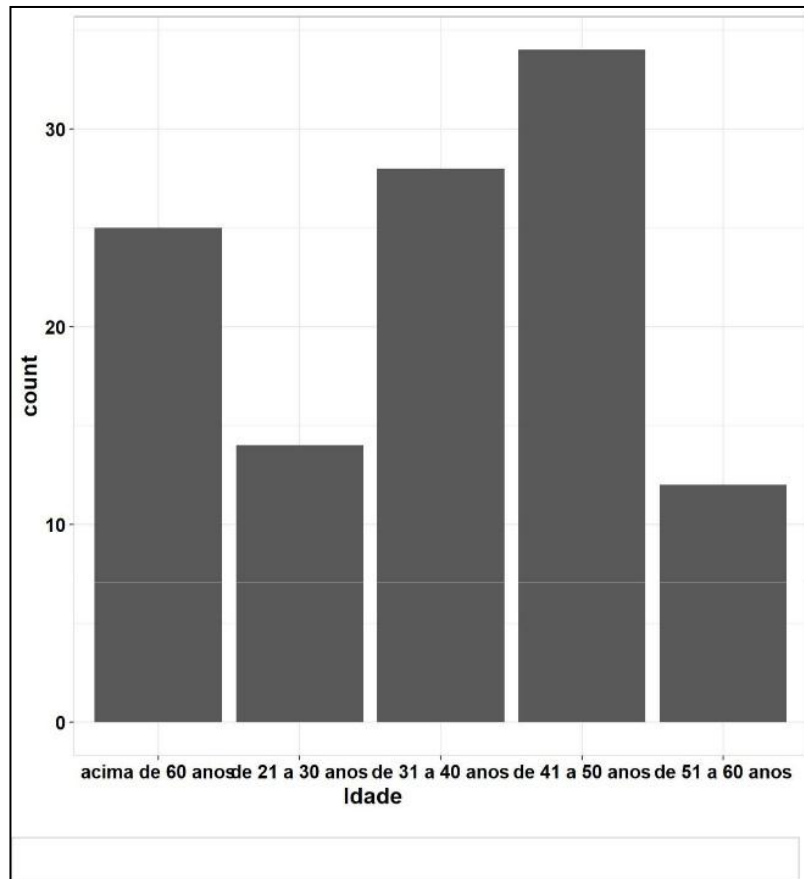
4.7.4 Análise Estatística

Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa Prisma Versão 5.0 e para a análise da associação entre as variáveis e o diagnóstico histopatológico foram calculados os Odds Ratio com intervalo de confiança de 95% no teste de Fisher e T. As variáveis estudadas foram: origem da paciente, idade, laudo histopatológico, laudo citológico, genotipagem e tipificação do HPV. Os diagnósticos foram divididos em três grupos: HPV / NIC 1, NIC 2 / NIC 3, câncer invasor/adenocarcinoma e cervicite. O grupo HPV / NIC 1 foi usado como referência para a análise.

5 RESULTADOS

Participaram desse estudo 113 mulheres com idade média de 49 anos. De forma geral, a idade variou entre 21 e 85 anos, com predomínio nas faixas 41 a 50, 31 a 40 anos e acima de 60 anos, representando 30,09%, 24,78% e 22,12%, respectivamente conforme apresentado na figura 6.

Figura 6: frequência de idade



Fonte: Autor.

Do grupo de pacientes analisadas, 62,83% são oriundas do interior do Estado e 37,17% são da capital Teresina. O grau de instrução predominante entre elas, foi o ensino fundamental com 59,29% do total, seguido de 17,70% com ensino médio, 15,04% analfabetas e 7,96% possuíam nível superior.

Foram analisadas as citologias das pacientes conforme a tabela 3, onde a maior parte das pacientes, 57,52%, apresentaram apenas citologia inflamatória, seguido de HSIL com 17,70% e Carcinoma/Adenocarcinoma com 13,27%.

Tabela 3: Frequência de diagnóstico citológico.

Citologia	Frequência	Porcentagem
1- Normal	1	0,88%
2- Inflamação	65	57,52%
3- LSIL	8	7,08%
4- HSIL	20	17,70%
5- Carcinoma/Adenocarcinoma	15	13,27%
6- ASCUS/ASCH	4	3,54%
Total	113	100,00%

Fonte: Autor

Foram analisados os exames histopatológicos das pacientes conforme a tabela 4, onde a maior parte das pacientes 40,71% apresentaram diagnóstico para NIC II/NIC III, seguido de Carcinoma com 35,40% e NIC I/HPV 15,93%.

Tabela 4: Frequência dos diagnósticos histopatológicos

Histopatológico	Frequência	Porcentagem
1- Cervicite	4	3,54
2- NIC I/HPV	18	15,93
3- NIC II/III	46	40,71
4- Carcinoma	40	35,40
5- Adenocarcinoma	5	4,42
Total	113	100,00

Fonte: Autor

Analisando a relação entre os diagnósticos do exame citológico e o exame histopatológico, observamos uma considerável discordância entre os resultados, como mostra a tabela 5. Principalmente nas citologias inflamatórias, que no histopatológico foram diagnosticadas como NIC2/3, carcinoma ou adenocarcinoma.

Tabela 5: relação citologia x histopatológico. Citologia: 1-normal, 2-inflamação, 3-LSIL, 4-HSIL, 5-Carcinoma/Adenocarcinoma, 6-ASCUS/ASC-H; Histopatológico: 1-Cervicite, 2-NIC I/HPV, 3-NIC II/III, 4-Carcinoma, 5-Adenocarcinoma.

citologia	histopatologico					Total
	1	2	3	4	5	
1	0 0.00	1 5.56	0 0.00	0 0.00	0 0.00	1 0.88
2	3 75.00	12 66.67	26 56.52	22 55.00	2 40.00	65 57.52
3	0 0.00	5 27.78	1 2.17	1 2.50	1 20.00	8 7.08
4	0 0.00	0 0.00	15 32.61	5 12.50	0 0.00	20 17.70
5	1 25.00	0 0.00	1 2.17	11 27.50	2 40.00	15 13.27
6	0 0.00	0 0.00	3 6.52	1 2.50	0 0.00	4 3.54
Total	4 100.00	18 100.00	46 100.00	40 100.00	5 100.00	113 100.00

Pearson chi2(20) = 50.4369 Pr = 0.000
Fisher's exact = 0.000

Fonte: Autor.

A detecção viral foi realizada inicialmente a partir dos *primers* genéricos MY 09/11 (amplificação da região L1 do genoma viral de 445 pb) e GP (170 pb) a partir das 113 amostras. Onde foi observada a positividade para HPV em 81 (71,68%) das 113 amostras analisadas conforme a tabela 6.

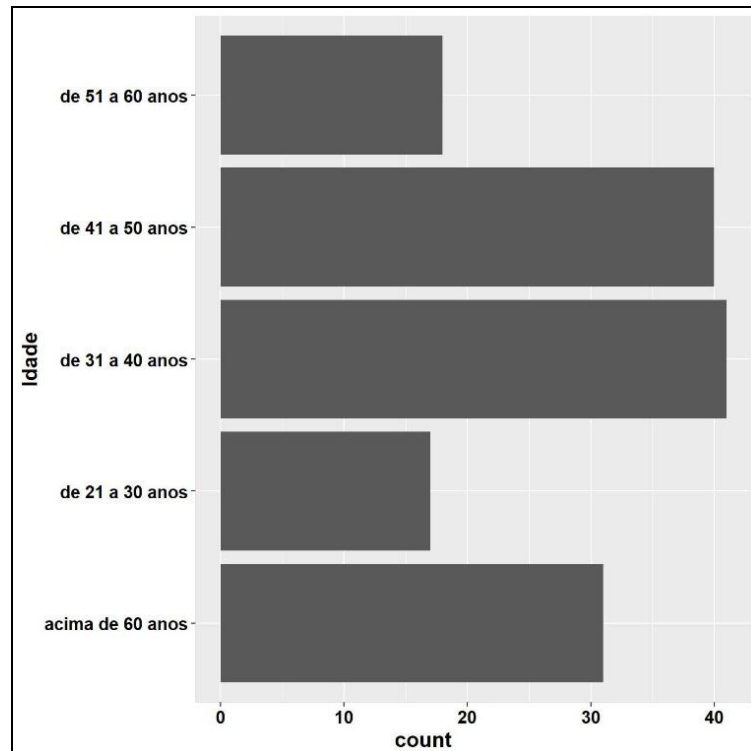
Tabela 6: Distribuição das amostras analisadas quanto à detecção viral.

HPV	n	%
Positivo	81	71,68
Negativo	32	28,32
Total	113	100,00

Fonte: Autor.

Após a detecção viral, verificou-se a relação entre a infecção por HPV e a idade dos pacientes, como mostrado na figura 7. Com as maiores frequência na faixa de 31 a 40 anos, em segunda na faixa de 41 a 50 anos, em terceiro acima dos 60 anos, em quarto de 51 a 60 anos e por último de 21 a 30 anos.

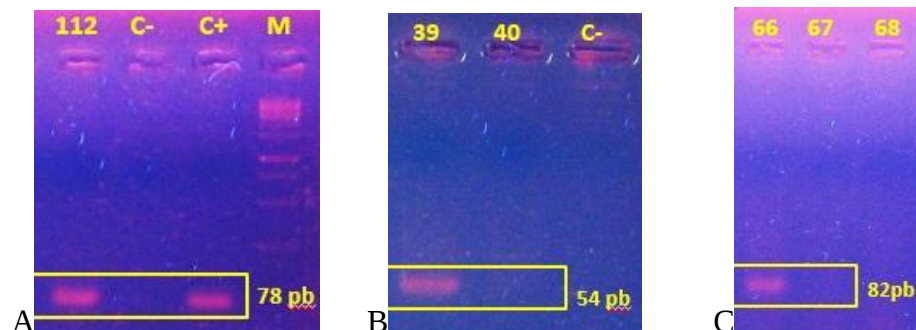
Gráfico 7: frequência do HPV x Idade

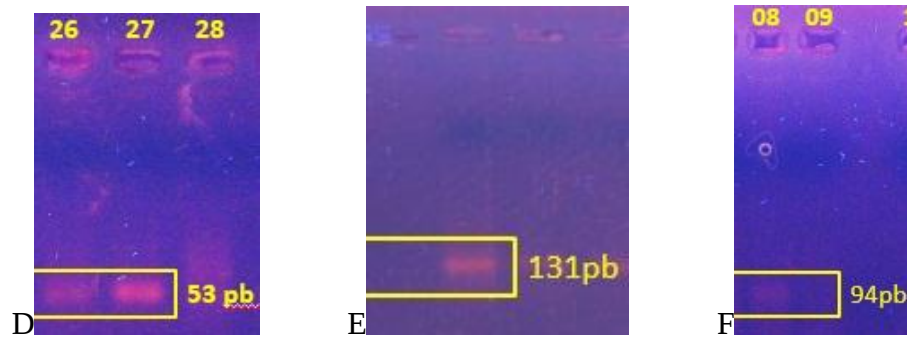


Fonte: Autor.

Para análise de genotipagem foram utilizados os *primers* específicos para seis tipos de HPV de alto risco: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-58 e HPV-45.

Figura 8: Gel representativo demonstrando a tipificação viral com o uso dos primers específicos para E5 dos HPVs 16, 16, 31, 33, 45 e 58. Géis de Agarose 1.5% corados com brometo de etídio. (A) HPV16 (B) HPV18 (C) HPV31 (D) HPV33 (E) HPV45 (F) HPV58.

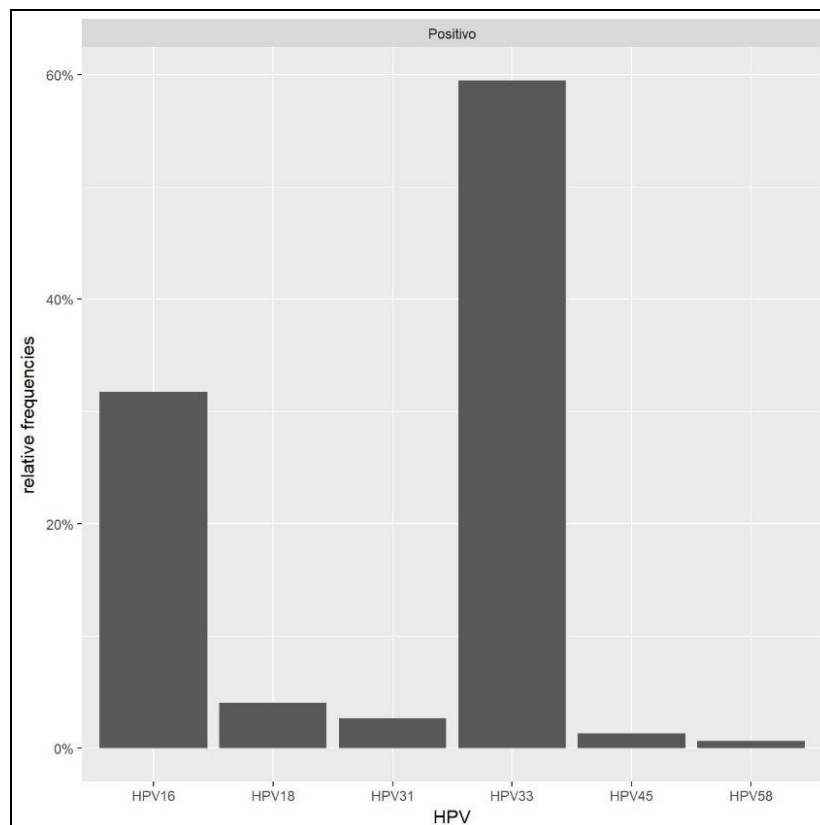




Fonte: Autor.

Conforme demonstrado na figura 9, as prevalências dos genótipos encontrados nas 113 amostras foram: HPV-33 em 87 testes (76,99%); HPV-16 em 47 testes (41,59%); HPV-18 em 6 testes (5,28%); o HPV-31 esteve presente em 4 testes (3,54%), HPV-45 em 2 testes (1,77%) e o HPV-58 em 1 teste (0,88%).

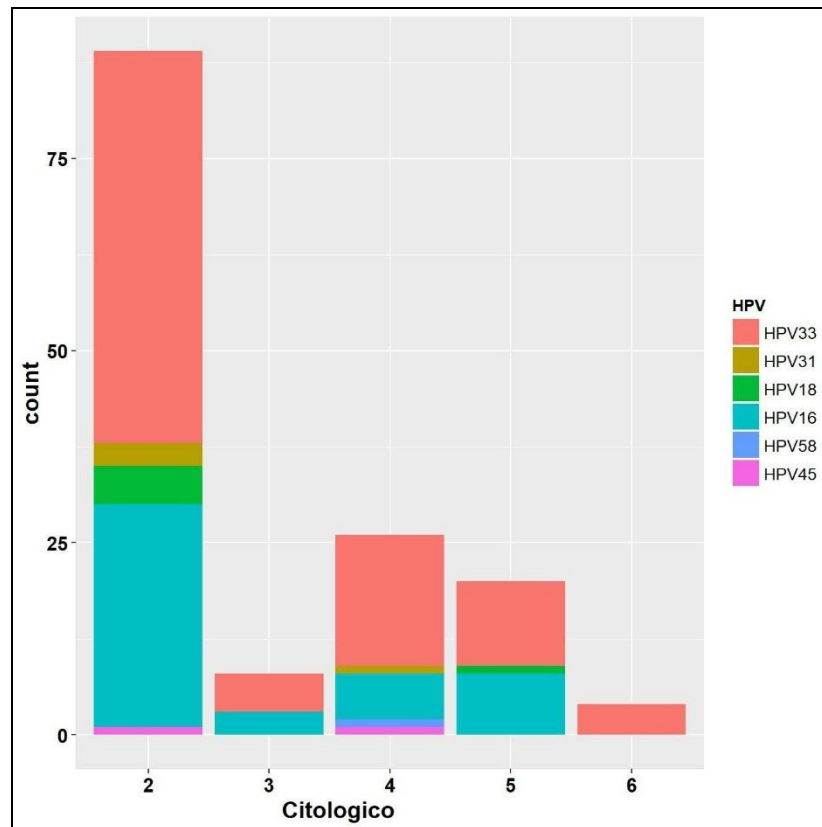
Figura 9: frequência de HPV



Fonte: Autor

Analisando a frequência de HPV nas citologias, podemos verificar os seguintes dados, conforme a figura 10, onde as citologias com apenas inflamação apresentaram a maior frequência e variação dos genótipos do HPV, seguido do HSIL e Carcinoma/Adenocarcinoma, e teve a maior presença dos HPV's 33 e 16.

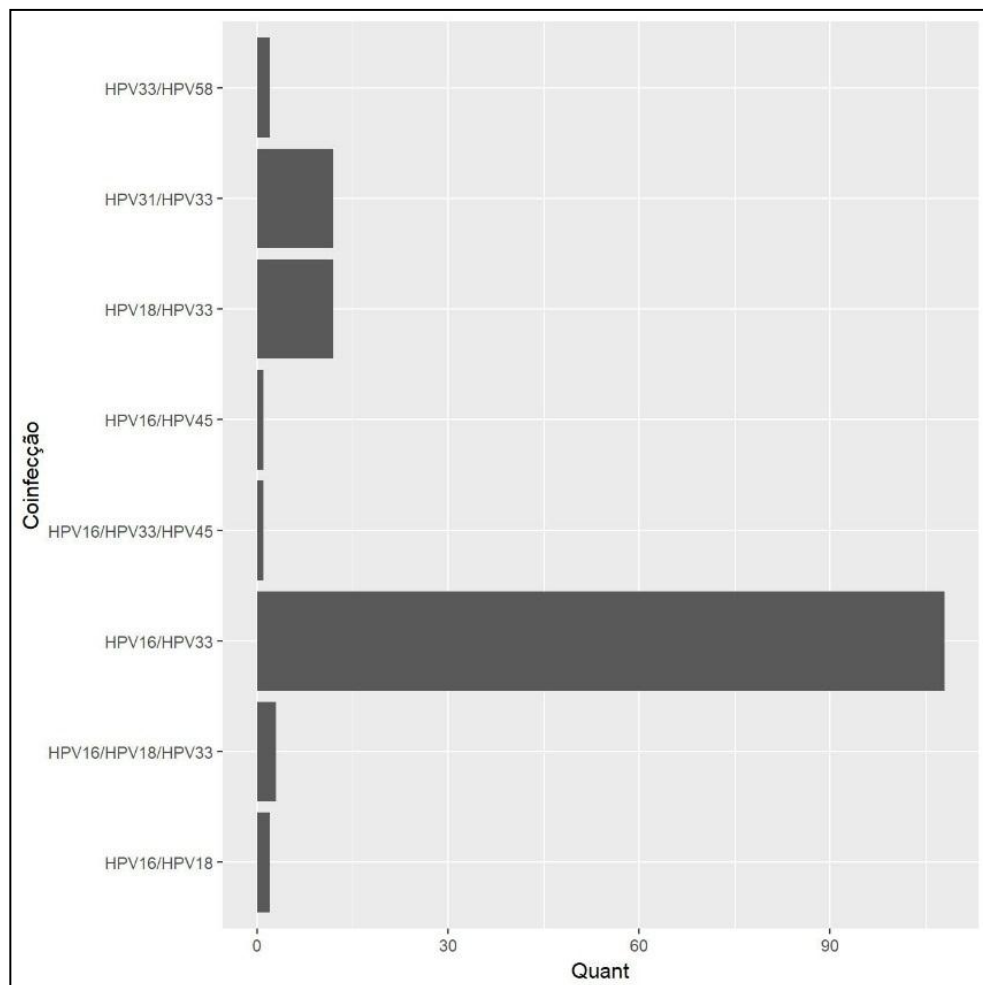
Figura 10: frequência do HPV x diagnóstico citológico. Diagnóstico citológico: 1-normal, 2-inflamação, 3-LSIL, 4-HSIL, 5-carcinoma/adenocarcinoma, 6-ASCUS/ASCH



Fonte: Autor

Após a tipificação, foi constatado nas amostras, 28 infecções e 84 coinfeções: HPV-16/33, HPV-31/33, HPV-33/18, HPV-16/18/33, HPV-33/58, HPV-16/18, HPV-16/45 E HPV-16/33/45 como mostra a figura 11. Além disso, podemos analisar as coinfeções do HPV nas pacientes que se mostraram positividade para o vírus e verificar a frequência do mesmo nas amostras.

Figura 11: frequência das coinfeções por HPV.



Fonte: Autor.

6 DISCUSSÃO

O problema da morbimortalidade atribuída ao câncer do colo do útero difere entre países desenvolvidos e em desenvolvimento devido à má gestão ou limitações orçamentárias aplicadas a prevenção e controle do câncer cervical. Alguns países desenvolvidos reduziram o número de casos de câncer cervical significativamente, devido a implementação de programas efetivos de rastreio e tratamento das lesões cervicais.

O objetivo principal da triagem do câncer cervical é detectar lesões intra-epiteliais iniciais e com isso submeter a paciente ao tratamento adequado evitando o desenvolvimento do câncer. Para isso, é necessário que o rastreio apresente uma taxa de cobertura ampla, seja de fácil acesso e ofertado de forma sistemática e regular, com continuidade.

No Brasil, dificuldades na execução dos programas de rastreio, através da citologia, e no cumprimento do fluxograma preconizado pelo Ministério da Saúde, tem resultado na manutenção da alta incidência do câncer cervical no país.

Esse estudo foi realizado no Hospital São Marcos em Teresina, que é referência para o tratamento do câncer no Estado do Piauí. Lá são recebidas pacientes de interior e da capital do Estado. Além do mais, também podemos considerar relevante por ser o primeiro estudo que visa caracterizar o perfil infectivo do HPV. Esse destaque se dar porque além do programa de rastreio brasileiro utilizar o exame citológico, houve um incremento substancial em vacinação profilática, utilizando para isso a vacina quadrivalente (4HPV), que inclui os HPV-6, 11, 16 e 18. Entretanto, a efetividade da vacinação depende, em parte, dos perfis infectivos de HPV em cada região.

A genotipagem com *primers* específicos encontrou positividade para 111 (98,24%) casos, e somente 2 (1,76%) casos foram realmente negativos para o DNA do HPV. Isso pode ter ocorrido pelo fato das amostras de DNA terem sido extraídas de material parafinado, que muitas vezes faz com que haja degeneração do material genético não havendo anelação dos *primers* e, conseqüentemente, a não amplificação da região de interesse.

Além dos problemas de degeneração, ao extrair DNA de material parafinado, outra hipótese deve ser considerada, há de que possam existir outros genótipos que não os utilizados neste experimento. Seria adequado para essas amostras negativas a realização de genotipagem para uma confirmação mais confiante.

Na genotipagem foram encontrados os seguintes tipos de HPV: HPV-33/(76,99%); HPV-16/(41,59%); HPV-18/(5,28%); o HPV-31/(3,54%), HPV45/(1,77%) e o HPV-58/(0,88%). Sanjose et al., (2010), num estudo epidemiológico mostrou que tipos de HPV

mais comuns em mulheres HPV-positivas em todo o mundo foram HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-58 e HPV-52, representando 50% de todas as infecções por HPV, e que o HPV-16 e HPV-18 são responsáveis por cerca de 70% pelos casos de câncer cervical invasivo no mundo.

Diversos estudos mostraram muitos resultados divergentes sobre distribuição de genótipos do HPV no Brasil. Gurgel et al., (2013) e Baldez et al., (2009) demonstraram que o HPV-16 é o mais prevalente no Brasil. Rabelo-Santos et al. (2003) em seu estudo na região Central do Brasil, observou a prevalência do HPV-16, 33, 18 e 31. Já Baldez et al. (2009) mostraram que a incidência de HPV em região metropolitana de Recife foi: HPV-16 (78,67%), HPV-31 (15,49%), HPV-18 (2,82%) e HPV-33 (2,82%). Pitta et al. (2010) em dois estudos na região Sudeste, apresentaram diferentes tipos de distribuição de HPV, com prevalência dos tipos 16, 18, 45 e 58 e no Estado do Rio de Janeiro os tipos 16, 31, 45 e 18 no Estado de São Paulo. Castro et al. (2011) reportou que na Região Norte do Brasil a distribuição dos tipos de HPVs 16, 33, 58, 66 e 68. E nos estudos de Rocha et al. (2013) e Santos et al. (2013) na região amazônica, encontraram uma prevalência significativa de HPV-58 em mulheres ao estudar o exame pélvico de rotina.

Bruno et al. (2014) em um estudo conduzido com mulheres na Bahia, verificou que o tipo oncogênico mais frequente foi o HPV-16, presente em 18,5%, seguido pelo HPV-56 em 14% e o HPV-39 em 13,4%, já o HPV-18 esteve entre os menos comuns com apenas 5,4% das mulheres. Fernandes et al. (2010) demonstrou que os HPVs 16, 18, 58 são os tipos mais frequentes no Rio Grande do Norte. Mas de acordo com Filho et al. (2012), em estudo realizado em mulheres em Alagoas, os quatro tipos de HPV de alto risco detectados mais prevalentes foram os HPVs 16, 58, 31 e 33, que são consistentes com dados mundiais.

Resultados de identificação dos tipos virais podem sofrer algumas diferenças por influências de alguns fatores, entre eles, o tamanho da casuística e a escolha da técnica de genotipagem. Esse estudo contou com PCR utilizando *primers* específicos, esta técnica acaba excluindo a possibilidade de identificação completa do perfil genotípico para todos os tipos de HPV que infectam a cérvix humana. Outras técnicas opcionais também podem ser utilizadas, mas demanda um alto custo laboral e financeiro. Um exemplo seria o sequenciamento, porém esse métodos além de ser caro, torna-se inviável quando na presença de coinfeções, devido as sobreposições de picos dos nucleotídeos nos eletroferogramas, necessitando ainda provas complementares através de outras técnicas moleculares.

Neste estudo, 57,52% das citologias eram apenas inflamatórias, ou seja, Negativo para Lesões Intra-epiteliais e Malignidade (NILM), mas o DNA do HPV estava presente nas amostras, provando o caráter transitório da infecção ou em processo de evolução neoplásica. Os genótipos mais frequentes foram HPV-33, seguido de HPV-16, HPV-18 e HPV-31. Martins et al. (2016) no seu estudo com mulheres com ou sem lesões cervicais em São Paulo e Barretos, verificou que os HPVs 16 e 56 foram os tipos de HPV mais frequentemente detectados, onde o HPV-56 foi encontrado principalmente em LSIL e NILM sugerindo um baixo potencial oncogênico, enquanto que o HPV-16 continua a ser o tipo mais prevalente em lesões de alto grau. O HPV 18 foi encontrado em baixa frequência em NILM e esfregaços anormais.

Na análise dos exames histopatológicos verificamos que 40,71% das pacientes foram diagnosticadas com NIC II/III, seguido carcinoma escamoso (35,40%) e NIC I/HPV (15,93%). De forma geral, verifica-se um percentual elevado na frequência de lesões de alto grau e invasivas, principalmente por que acometeu boa parte das pacientes na faixa etária de 41 a 50 anos. De acordo com IARC (2007) vários estudos prospectivos mostraram que as mulheres que são HPV-positivas na linha de base têm um maior risco de desenvolver NIC-III ou câncer cervical invasivo durante o seguimento do que as mulheres com HPV-negativas. No entanto, muitos desses estudos iniciais não avaliaram a carcinogenicidade específica do tipo HPV.

Segundo os estudos de Khan et al., (2005) e IARC (2007) avaliaram o risco específico de HPV para desenvolver NIC II/III e eles relataram consistentemente um risco aumentado de NIC II/III ligado à detecção basal de HPV-16. Alguns deles relataram riscos aumentados associados com a presença de HPV-18 e de tipos HPV relacionados filogeneticamente com HPV-16 e HPV-18. De acordo com IARC (2007) e Winer et al., (2005), o NIC II/III desenvolvem-se dentro de aproximadamente 2 anos da detecção do DNA do HPV, indicando que, ao contrário da teoria de que a infecção prolongada pelo HPV é necessária para a progressão para NIC II/III, essas lesões pré-cancerosas podem ser uma manifestação precoce da infecção por HPV, pelo menos em mulheres jovens.

Segundo o Portal Brasil (2016), desde junho de 2013, o Ministério da Saúde brasileiro anunciou a decisão de introduzir a vacina quadrivalente para HPVs (6, 11, 16 e 18 (4HPV) no programa nacional de imunização, o cronograma de vacinação (0 e 6 meses) foi atualizado em janeiro de 2016. A partir de 2014, esta vacina foi oferecida a meninas e

adolescentes de 11 a 13 anos e de 2015 para adolescentes entre 9 e 11 anos e em 2017 para meninos na faixa etária de 12 a 13 anos.

Além da vacina quadrivalente (4HPV), surge agora a nonavalente (9HPV) que fornece uma proteção mais ampla na prevenção das infecções cervicais, vulvar, vaginal e câncer anal causada por HPV-16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58, e para a prevenção de verrugas genitais provocadas pelos tipos de HPV-6 ou 11, resultando em um potencial de 90% de prevenção. Entretanto, esta vacina ainda apresenta elevado custo e o Brasil não se pronunciou ainda sobre sua aquisição.

Neste contexto, a genotipagem do HPV pode ser uma ferramenta essencial para avaliar a eficácia do programa através da identificação do perfil genotípico pré e pós vacinação contra o HPV.

As infecções múltiplas por HPV são comumente encontradas em estudos epidemiológicos moleculares. No nosso estudo foi constatado 84 (73,92%) casos de coinfeção pelo HPV. As coinfeções mais encontradas nas análises foram: HPV-16/33, em segundo HPV-31/33, seguido de HPV-18/33 e HPV-16/18/33. No entanto, a importância clínica destes múltiplos tipos de HPV na modulação do risco para lesões intraepiteliais escamosas (SIL) continua a ser controversa. Segundo Dickson et al., (2014) alguns estudos mostraram associação entre a lesão intraepitelial escamosa baixa grau (LSIL) ou as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) em mulheres infectadas com vários tipos de HPV.

Além disso, Cuschieri et al., (2004) demonstraram que a combinação específica de tipos de HPV, incluindo o objetivo dos genótipos da vacina nonavalete e HPV não vacinados, pode atuar sinergicamente para induzir qualquer SIL. De acordo com Chagas et al., (2015) coinfeções com HPV-16 ou HPV-18 apresentaram o maior risco de hospedar lesões cervicais quando comparadas à única infecção. Da mesma forma, vários tipos de HPV também foram associados a qualquer SIL. As infecções por um único HPV ou múltiplos com HPV-31 têm um risco aumentado de 2 a 3 vezes para qualquer SIL. Sendo consistentes com outros estudos como o de Dickson et al., (2013), onde as mulheres com múltiplas infecções por HPV apresentaram maior risco de NIC II e HSIL, quando comparada com infecção única.

Estudos de perfis regionais infectivos para HPV como este, principalmente no Brasil, devido as suas dimensões continentais e a diversidade do HPV, podem corroborar com a implementação de políticas públicas preventivas direcionadas, seja na disponibilidade de

profissionais especializados, tais como ginecologistas e colposcopistas, laboratórios de citologia clínica e nas campanhas vacinais.

Obviamente se faz necessário mais estudo com o intuito de conhecer a infectividade e desfecho da doença em um número maior de amostras, para se consolidar o conhecimento, bem como analisar as populações de homens e de mulheres com citologia negativa, utilizando a detecção de DNA de HPV e, se possível, genotipagem. Só assim teríamos o fiel retrato da região.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo pioneiro mostrou a presença dos HPV-33 e HPV-16 como sendo os mais frequentes em mulheres do Estado do Piauí, portadoras ou não de lesões intra-epiteliais ou invasivas, sinalizando a importância para a necessidade de serem mantidos os programas públicos de prevenção e detecção, bem como, implementar melhorias em áreas ainda com difícil acesso a citologia oncológica, colposcopia e histopatologia, se possível, associado ao teste de HPV e vacinação. Entretanto, deve-se considerar o genótipo mais prevalente em mulheres no Estado do Piauí foi o HPV-33, o qual não está inserido na vacina quadrivalente, comprometendo sua eficácia em grande parte das mulheres do Piauí.

REFERÊNCIAS

- APPLEBY P, BERAL V, BERRINGTON DE GONZALES A, COLIN D, FRANCESCHI S, GOODHILL A, et al 2007. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women from 24 epidemiological studies. **Lancet** 370(9599): 1609-1621.
- BALDEZ DA SILVA MFPT, CHAGAS BS, GUIMARÃES V, KATZ LMC, FELIX PM, MIRANDA PM, et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genet Mol Res GMR**. 2009; 8: 1437–1443. doi: 10.4238/vol8-4gmr677
- BRUNO A, SERRAVALLE K, TRAVASSOS AG, LIMA BGC. Distribuição dos Genótipos de papillomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2014;36(9):416–22
- BERNARD H-U, BURK RD, CHEN Z, VAN DOORSLAER K, HAUSEN H ZUR, DE VILLIERS E-M: Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology** 2010, 401:70-79
- BOONLIKIT, S. Correlation between Reid’s colposcopic index and histologic results from colposcopically directed biopsy in differentiating high-grade from low-grade squamous intraepithelial lesion at Rajavithi Hospital. **Med Assoc Thai**. 2011;94:59-65.
- BRUNI L, DIAZ M, CASTELLSAGUE X, FERRER E, BOSCH FX, de SANJOSÉ S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J Infect Dis**. 2010 Dec 15;202(12):1789-99. doi: 10.1086/657321. Epub 2010 Nov 10.
- BROOMALL EM, REYNOLDS SM and JACOBSON RM (2010). Epidemiology, clinical manifestations, and recent advances in vaccination against human papillomavirus. **Postgrad. Med**. 122: 121-129.
- 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.**, Chicago, v. 170, p.1077-1085, 1994.
- CASTRO MM, FARIAS IP, BORBOREMA-SANTOS CM, CORREIA G, ASTOLFI-FILHO S: Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genet. Mol. Res**. 2011, 10:186-196.
- CUSCHIERI KS, CUBIE HA, WHITLEY MW, SEAGAR AL, ARENDS MJ, MOORE C, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. **J Clin Pathol**. 2004; 57: 68–72. doi: 10.1136/jcp.57.1.68 PMID: 14693839
- CHATURVEDI AK. Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women. **J Adolesc Health**. 2010 Apr;46(4 Suppl):S20-6. doi: 10.1016/j.jadohealth.2010.01.016.
- CAPOTE NEGRIN, LUIS G. “Epidemiology of Cervical Cancer in Latin America.” **ecancermedicalscience** 9 (2015): 577. PMC. Web. 12 Mar. 2018. Dalstein, V., Riethmuller,

D., Pr  tet, J.-L., Le Bail Carval, K., Sauti  re, J.-L., Carbillet, J.-P., Kantelip, B., Schaal, J.-P. and Mougin, C. (2003), Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. **Int. J. Cancer**, 106: 396–403. doi:10.1002/ijc.11222

DALPICOLLI RODRIGUES, ADRIANA & CANTARELLI, VLADEMIR & ALICE FRANTZ, MIRIAM & PILGER, DIOGO & DE SOUSA PEREIRA, FABIANA. (2009). Compar  o das t  cnicas de captura de h  bridos e PCR para a detec  o de HPV em amostras cl  nicas. **J Bras Patol Med Lab** • v. 45 • n. 6 • p. 457-462 • dezembro 2009 .

DICKSON EL, VOGEL RI, BLISS RL, DOWNS LS. Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections: A Cross-Sectional Analysis of the Prevalence of Specific Types in 309,000 Women Referred for HPV Testing at the Time of Cervical Cytology. **Int J Gynecol Cancer**. 2013; 23: 1295–1302. doi: 10.1097/IGC.0b013e31829e9fb4 PMID: 23970156

DICKSON EL, VOGEL RI, GELLER MA, DOWNS LS Jr.. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31–65. **Gynecol Oncol**. 2014; 133: 405–408. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.03. 552 PMID: 24657488

DE VILLIERS E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H: Classification of Papillomaviruses. **Virology** 2004, 324:17-27

DE FREITAS AC, GURGEL APAD, CHAGAS BS, COIMBRA EC, DO AAMARAL CMM: Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecologic Oncology** 2012.

DOORBAR J. The Papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**. 2005;32:7–15

Estimativa 2018: incid  ncia de c  ncer no Brasil / Instituto Nacional de C  ncer Jos   Alencar Gomes da Silva. Coordena  o de Preven  o e Vigil  ncia. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2017.

EFIRD JT, TOLAND AE, LEA CS, PHILLIPS CJ: The combined influence of oral contraceptives and Human Papillomavirus virus on cutaneous squamous cell carcinoma. **Clin Med Insights Oncol** 2011, 5:55-75

FERNANDES JV, MEISSNER RV, CARVALHO MG, FERNANDES TA, AZEVEDO PR, SOBRINHO JS, PRADO JC, VILLA LL: Prevalence of Human Papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Research Notes** 2010, 3:96.

GURGEL APAD, CHAGAS BS, DO AMARAL CMM, ALBUQUERQUE EMB, SERRA IGSS, SILVA NETO J DA C, et al. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. **BioMed Res Int**. 2013; 2013: 546354. doi: 10.1155/2013/546354 PMID: 23865057

GONZALES MF, AKHTAR I, MANUCHA V. Changing Trends and Practices in Cytopathology. **Acta Cytol**. 2017;61(2):91-95. doi: 10.1159/000460236. Epub 2017 Mar 22.

GIACCIO, CLAUDIA MARIA RICARDO SERAFIM; CALORE II, EDENILSON Eduardo; VILLELA, WILZA VIEIRA; CASTRO, BARBARA DE PAULA GOMES NUNES DE; FERNANDEZ, LEANDRO DA SILVA; TIRLONI, VANESSA UPPER. Evolu  o das les  es intraepiteliais de colo uterino de baixo grau: em uma coorte de pacientes acompanhadas por 18 meses. **Diagn. tratamento**; 15(4)out.-dez. 2010.

HO GY, BIERMAN R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD. Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med** 1998;338(7):423–8

HOORY T, MONIE A, GRAVIT P, WU T-C. Molecular epidemiology of Human Papillomavirus. **J Formos Med Assoc** 2008;107(3):198–217.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses, vol. 90. **Lyon: International Agency for Research on Cancer**, In press.

KITCHENER HC, BURNS S, NELSON L, MYERS AJ, FLETCHER I, DESAI M, et al. A randomised controlled trial of cytological surveillance versus patient choice between surveillance and colposcopy in managing mildly abnormal cervical smears. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology** 2004;11(1):63-70.

KHAN MJ, CASTLE PE, LORINCZ AT, WACHOLDER S, SHERMAN M, SCOTT DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. **J Natl Cancer Inst** 2005;97:1072–9

MELNIKOW J, NUOVO J, WILLIAN AR, CHAN BK, HOWELL LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol.** 1998;92(4 Pt 2):727-35

MARTINS TR, MENDES DE OLIVEIRA C, ROSA LR, DE CAMPOS CENTRONE C, RODRIGUES CL, VILLA LL, LEVI JE. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Viol J.** 2016 12 de agosto; 13: 138.

MATSUMOTO K, YOSHIKAWA H. Human papillomavirus infection and the risk of cervical cancer in Japan. **J Obstet Gynaecol Res.** 2013 Jan;39(1):7-17. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01977.x. Epub 2012 Aug 26.

PITTA DR, CAMPOS EA, SARIAN LO, ROVELLA MS, DERCHAIN SFM: Prevalence of HPV 16, 18, 45 and 31 in women with cervical lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** 2010, 32:315-320

PORTAL BRASIL [Internet] [citado 2016 Jan 26]. Available at <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/calendario-de-vacinacao-atualizado-ja-esta-em-vigor>. Acessado em 8 de Agosto de 2016.

PITTAYAKHAJONWUT D, ANGELETTI PC. Viral trans-factor independent replication of Human Papillomavirus genomes. **Viol J.** 2010;7:123

ROCHA DAP, BARBOSA-FILHO RAA, QUEIROZ FA, SANTOS CMB. High prevalence and genotypic diversity of human papillomavirus in Amazonian women, Brazil. **Infect Dis Obstet Gynecol.** 2013; 2013: 1-7

RABELO-SANTOS S, ZEFERINO L, VILLA L, SOBRINHO J, AMARAL R, MAGALHÃES A: Human Papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2003, 98:181-184

SALOMON D; NAYAR R. Sistema de Bathesda para citologia cervicovaginal. 2a Ed., Rio de Janeiro: **Revinter**, p.190, 2004.

SILVA NETA, J. C. Citologia Clínica do Trato Genital Feminino. **Editora Revinter**. 1ª Ed. 2012

SANTOS JC, CEZAR MRS, LISBOA MR, MOURA MMF. Occurrence of human papillomavirus in uterine cervix of women in the western Brazilian Amazon. **Acta Amazônica**. 2013; 43(2): 185-90.

S. DE SANJOSE, W. G. QUINT, L. ALEMANY et al., “Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study,” **The Lancet Oncology**, vol. 11, no. 11, pp. 1048–1056, 2010.

STEBEN M, DUARTE-FRANCO E. Human Papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecol Oncol** 2007;107(2 Suppl 1):S2–5.

SANKARANARAYANAN R; NENE BM; DINSHAW K. Early Detection of Cervical Cancer With Visual Inspection Methods: a summary of completed and on-going studies in India. **Salud Publica Mex**. n. 45 (Suppl 3), p.399-407, 2003.

TOTA JE, CHEVARIE-DAVIS M, RICHARDSON LA et al. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**. Vol 53, Supplement 1: S12-S21, 2011.

TERMINI L, BOCCARDO E, ESTEVES GH, HIRATA Jr, et al. Characerizacão of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. **BMC Medical Genomics**. 1, 29, 2008.

VIANNA LMS. Aplicabilidade do Sistema de Bethesda no Diagnóstico das Lesões Escamosas Orais e Importância do Papilomavírus na Gênese Dessas Lesões. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, f.124, 2008.

VILLA, L.L. Biologia Molecular: Conceitos e Princípios Básicos. In: MARTINS, N.V.; PEREYRA, E.A.G. (Ed.). **Conhecendo o HPV Patologia do trato-genital inferior Colposcopia e CAF**. São Paulo: Frôntis Editorial, 2000. cap. 20, p.137-143.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – Globocan 2012. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base no. 10 [internet]. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; 2015.

WINER RL, KIVIAT NB, HUGHES JP, ADAM DE, LEE SK, KUYPERS JM, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions after initial infection. **J Infect Dis** 2005;191:731–8.

WU, S.F.; MENG, L.; WANG, S.X.; MA, D. A comparison of four screening methods for cervical neoplasia. **International Federation of Gynecology and Obstetrics**. Published by Elsevier Ireland Ltd. 2005

WRIGHT TC Jr. Cervical cancer screening using visualization techniques. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr**. n.31, p.66-71, 2003.

ZUR HAUSEN H: Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta** 1996, 1288:F55-78

ZUR HAUSEN H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer** 2002, 2:342-350.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO COLETA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas
 Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares - LPCM
 Coordenador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto



Registro Interno No. _____

Questionário da Coleta Citológica

Data da coleta: ____/____/20____

Identificação

Paciente: _____ Idade: ____
 anos _____

Data nascimento: ____________ Município de origem: _____

() Capital () Interior
 Etnia: () Branco () Preto () Pardo () Amarelo () Indígena

Renda familiar: () abaixo de 1 salário mínimo
 () de 3 a 5 salário
 () entre 1 e 3 salários
 () acima de 5 salários

Escolaridade : () Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo
 () Ensino médio incompleto () Ensino médio completo
 () Ensino superior incompleto () Ensino superior completo

História Ginecológica

Menarca: _____ anos 1ª relação sexual: _____ anos Nº de parceiros: _____

Nº de gestações: _____ Nº de abortos: _____

Partos: Normal _____ Cesária _____

Está grávida/amamentando? () Não () Sim, grávida () Sim, amamentando

Anticoncepcional hormonal: () Não () Sim, qual? _____

Menopausa: _____ anos Hormônio para menopausa: () Não () Sim

História Médica

() Diabetes mellitus () Hipertensão arterial sistêmica () Doença cardiovascular

() Alguma doença inflamatória crônica? (Ex.: Artrite) Qual ()

() Transfusão sanguínea Quantas vezes _____

() Câncer, qual? _____ () Outra, qual? _____

Medicação contínua: () Não () Sim, qual? _____

Hábitos

Tabagismo: () Não () Sim, quantos cigarros/dia? _____

Tabagismo passivo em casa ou no trabalho: () Não () Sim

Etilismo: () Não () Sim, qual bebida/frequência? _____

Medidas

História Familiar

Peso: _____ Kg Câncer: () Não () Sim. Qual tipo? _____

Altura: _____ m Parentesco: _____

Material coletado: () Lâmina de citologia () Sangue () Escovado DNA () Escovado RNA

Citologia Anterior (se houver)

Resultado Citológico: _____ Data: ____/____/____

Exames da coleta

Resultado Citológico: _____



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido a Sra. para participar como voluntária da pesquisa “*Estudo molecular da carcinogênese das lesões cervicais: da pré-invasão a invasão*”.

Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: ESTUDO MOLECULAR DA CARCINOGENESE DAS LESÕES CERVICAIS: DA PRÉ-INVASÃO A INVASÃO

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Endereço/Telefone/e-mail para contato (inclusive ligações a cobrar):

Av.Prof. Moraes Rego, s/n – Departamento de Histologia e Embriologia-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901, Fone: 2126-8515, e-mail: jacinto.costa@ufpe.br

Pesquisador participante: Ismael Gomes da Rocha

Telefones para contato: 81-2126-8515

OBJETIVOS: Avaliar o perfil genotípico das infecções por HPV, a expressão dos genes E5, E6 e E7 do HPV e expressão de metaloproteínas da matriz em mulheres portadoras de lesões cervicais em vários estágios de progressão.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Se concordar em participar da pesquisa, você responderá a um questionário sobre alguns hábitos de vida, que podem facilitar a infecção pelo HPV e o aparecimento de lesões no colo do útero. Todas as informações que você der, bem como seu nome, serão mantidas em sigilo (segredo), ou seja, só terão acesso a essas informações os pesquisadores envolvidos na pesquisa. Além disso, você permitirá a utilização de uma amostra da biopsia e da citologia, que já serão coletados de você como parte da rotina de exames para a prevenção do câncer cervical. Também permitirá a retirada do bloco de biopsia após ser utilizado para o seu diagnóstico, sendo garantida a posterior devolução do mesmo ao serviço do hospital. Nós utilizaremos uma parte das amostras para desenvolver o nosso estudo, que tem como objetivo encontrar uma melhor forma de prevenção e tratamento do câncer cervical.

RISCOS E DESCONFORTOS: A paciente pode se sentir constrangida em responder ao questionário referente aos fatores de risco para desenvolvimento do câncer cervical. Os pesquisadores envolvidos na aplicação do questionário explicarão primeiramente do que se trata o projeto e a importância da colaboração da paciente para o estudo, deixando-a a vontade para decidir se deseja ou não fazer parte, de forma a minimizar esse desconforto. O risco na coleta de biopsia é inerente ao próprio procedimento de rotina para prevenção do câncer cervical, não estando relacionado ao presente projeto de pesquisa. A paciente pode sentir um desconforto no local em que será retirada a biopsia; caso ocorra, o médico irá realizar o tratamento adequado.

BENEFÍCIOS: Será possível retribuir a colaboração voluntária das pacientes com a detecção e identificação dos tipos de HPV de alto risco mais prevalentes na nossa região, presente nas amostras coletadas, auxiliando no diagnóstico preventivo do câncer cervical.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames e tratamentos oferecidos pelo hospital serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança pela sua participação neste estudo. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Você pode retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Todos os dados referentes a presente pesquisa serão armazenados no servidor do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob responsabilidade do Prof. Jacinto da Costa Silva Neto, com acesso restrito aos pesquisadores, durante o período de vigência do projeto.

Assinatura do Pesquisador Responsável:

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/ tratamento.

Recife, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do sujeito ou responsável:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ASSOCIAÇÃO PIAUENSE DE
COMBATE AO CÂNCER /
HOSPITAL SÃO MARCOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO MOLECULAR DA CARCINOGENESE DAS LESÕES CERVICAIS: DA PRÉ-
INVASÃO A INVASÃO

Pesquisador: Jacinto da Costa Silva Neto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17068913.6.3002.5584

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.514.401

Apresentação do Projeto:

O Câncer de colo uterino ocupa o terceiro lugar em mulheres em todo mundo. Estudos constataram que a infecção seguida da persistência do Papilomavirus Humano (HPV) tem papel principal no surgimento e progressão das lesões cervicais. Entre os seus mecanismos de indução ao câncer encontram-se as oncoproteínas E6 e E7 com capacidade de modificar o ciclo celular devido, principalmente a mutação da proteína p16INK4A, pRB e p53. O processo de progressão celular envolve proteínas virais e do hospedeiro, entre elas as oncoproteínas E6, E7 e as metaloproteinases da matriz (MMP), as quais podem estar associadas aos processos de invasão, metástase e recidiva tumoral devido à capacidade de degradação das macromoléculas da matriz. Coletivamente têm a capacidade de degradar todas as proteínas componentes da matriz extracelular e das membranas basais. Os queratinócitos são células produtoras de MMP. O objetivo desse estudo é analisar a progressão das lesões cervicais, desde suas alterações citológicas mínimas (ASC-US), histológicas (NIC-I) até a invasão (carcinoma cervical e adenocarcinoma) correlacionando as expressões das proteínas E5, E6, E7 e Metaloproteinases da matriz e inibidores (MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK) através das técnicas de citologia oncológica, histopatologia, imunohistoquímica, detecção, sequenciamento e genotipagem para vários tipos de DNA-HPV e análise da expressão dos genes E6 e E7 por RNAm através da técnica de PCR em

Endereço: Rua Olavo Bilac 2300

Bairro: centro

CEP: 64.001-180

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)2106-8102

Fax: (86)2106-8102

E-mail: cep.hsm@saomarcos.org.br

ASSOCIAÇÃO PIAUENSE DE COMBATE AO CÂNCER / HOSPITAL SÃO MARCOS



Continuação do Parecer: 1.514.401

tempo real. O perfil das proteínas estudadas poderá esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na progressão tumoral, auxiliando no diagnóstico, na precisão diagnóstica das lesões, conforme seu grau de estadiamento e na terapêutica que envolvem inibidores de MMP.

Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar o perfil genotípico das infecções por HPV, a expressão dos genes E5, E6, E7, proteína p16INK4A e das metaloproteínases em mulheres portadoras de lesões cervicais em vários estágios de progressão.

Verificar o perfil genotípico dos HPV presentes em mulheres portadoras de lesões cervicais; Correlacionar os genótipos encontrados com os graus de lesões cervicais; Conhecer os níveis de expressão dos genes E5, E6, E7, proteína p16INK4A e das Metaloproteínases em diferentes graus de lesões cervicais; Associar a expressão de E5, E6, E7 e Metaloproteínases; Associar a expressão de Metaloproteínases, E5, E6 e E7 aos diagnósticos citológico, histológico e colposcópico; Constatar a taxa de multinfecções, relacionando com o grau histológico da lesão; Avaliar os cofatores envolvidos com a infecção por HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo não trará risco adicional às mulheres participantes, visto que iremos estudar os resultados obtidos entre os exames complementares de diagnóstico citológico, colposcópico e anátomo patológico realizar os experimentos propostos com o material remanescente das técnicas empregadas de rotina do serviço hospitalar nas mulheres que preencham os critérios de inclusão. Para a obtenção de peças para o estudo anátomo patológico, usaremos a biópsia dirigida, segundo a técnica usual e usaremos para tal a pinça de biópsia tipo saca-bocados como a GaylorMedina.

Benefícios: Ao participar desta pesquisa as pacientes não terão nenhum benefício direto, pois o procedimento seria feito de qualquer maneira, seguindo as técnicas e protocolos estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre as lesões do colo uterino, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir no diagnóstico e tratamento precoce das lesões cervicais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado através do método observacional, analítico transversal. O presente trabalho será realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes, obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os pacientes e familiares que, após informação,

Endereço: Rua Olavo Bilac 2300

Bairro: centro

CEP: 64.001-180

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)2106-8102

Fax: (86)2106-8102

E-mail: cep.hsm@saomarcos.org.br

ASSOCIAÇÃO PIAUENSE DE COMBATE AO CÂNCER / HOSPITAL SÃO MARCOS



Continuação do Parecer: 1.514.401

concordarem em participar da pesquisa, assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A identidade das participantes será mantida em sigilo absoluto e o projeto não interferirá nos procedimentos de rotina dos serviços participantes. Por meio de emendas, o CEP foi notificado da necessidade de inclusão de novos pesquisadores e outras instituições, bem como da necessidade de prolongar o cronograma de execução da pesquisa. Demais aspectos do desenho e metodologia estão adequados e já previamente avaliados em pareceres anteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos: projeto, folhas de rosto, cartas de anuência das instituições, emendas, justificativas, autorizações para uso de dados, termo de confidencialidade, currículos dos participantes.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto atende às normas éticas vigentes e encontra-se apto para sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após discussão do colegiado o projeto foi aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_682516_E3.pdf	18/03/2016 10:01:05		Aceito
Parecer Anterior	parecer_jacinto_emenda.pdf	18/03/2016 09:59:51	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	18/03/2016 09:58:22	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	cv_ismael.docx	18/03/2016 09:56:00	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	justificativa_emendaparticipante.docx	18/03/2016 09:53:43	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	CartaAnuenciaHospUFPI.pdf	26/02/2016 09:12:09	Débora Viviane Albuquerque Granja Santana	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_SAME.jpg	15/01/2016 23:59:47	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Autorizacao_de_uso_de_dados.jpg	15/01/2016 23:59:01	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito

Endereço: Rua Olavo Bilac 2300

Bairro: centro

CEP: 64.001-180

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)2106-8102

Fax: (86)2106-8102

E-mail: cep.hsm@saomarcos.org.br

ASSOCIAÇÃO PIAUENSE DE COMBATE AO CÂNCER / HOSPITAL SÃO MARCOS



Continuação do Parecer: 1.514.401

Outros	Anuencia_HISLA.pdf	15/01/2016 23:57:22	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Anuencia_HSMarcos.pdf	15/01/2016 23:56:17	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Anuencia_HGV.pdf	15/01/2016 23:55:26	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_2016_01_15.doc	15/01/2016 23:51:42	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	projeto-metal--2015-04-02-b.docx	02/04/2015 17:41:25		Aceito
Outros	Carta_anuencia-Marilea-2013-08-20.pdf	20/08/2013 15:01:05		Aceito
Outros	TERMO DE CONFIDENCIALIDADE- 2013-08-20.pdf	20/08/2013 12:49:56		Aceito
Outros	Lattes-Antonio-2013-08-20.pdf	20/08/2013 12:48:19		Aceito
Outros	Lattes-Marilea-2013-08-20.pdf	20/08/2013 12:46:03		Aceito
Outros	Lattes-Jacinto-2013-08-20.pdf	20/08/2013 12:45:44		Aceito
Outros	Carta_anuencia-Marilea-2013-08-20.pdf	20/08/2013 12:44:53		Aceito
Outros	Carta_anuencia-ccb-2013-08-20.pdf	20/08/2013 12:39:47		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

TERESINA, 18 de Abril de 2016

Assinado por:
Neylany Raquel Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Olavo Bilac 2300

Bairro: centro

CEP: 64.001-180

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)2106-8102

Fax: (86)2106-8102

E-mail: cep.hsm@saomarcos.org.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO PI

ASSOCIAÇÃO PIAUIENSE DE COMBATE AO CÂNCER

SÃO MARCOS
Para toda vida

Hospital São Marcos

Rua Olavo Bilac, 2300 • Telefone 086 2106 8000 • Fax 086 2106 8074
C.G.C. 06870026/0001-77 • I. E. Isento • 64001-280 Teresina – Piauí

DECLARAÇÃO

A ASSOCIAÇÃO PIAUIENSE DE COMBATE AO CÂNCER, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ nº 06.870.026/0001-77, estabelecida na Rua Olavo Bilac nº 2300, bairro centro, em Teresina-PI, neste ato representada por seu Presidente **ALCENOR BARBOSA DE ALMEIDA**, declara que os pesquisadores Jacinto da Costa Silva Neto e Ismael Gomes da Rocha, submeteram a esta Entidade o projeto de pesquisa intitulado "Estudo molecular da carcinogênese das lesões cervicais: da pré-invasão a invasão", ciente de que a realização da pesquisa está condicionada a aprovação do referido projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa desta Entidade.

Declara ainda, que esta Entidade possui a infraestrutura necessária para a realização do projeto em questão.

Teresina, 23 de dezembro de 2015.

Edilson Carvalho de Sousa Júnior
ASSOCIAÇÃO PIAUIENSE DE COMBATE AO CÂNCER
EDILSON CARVALHO DE SOUSA JÚNIOR
Diretor Clínico

Ismael Gomes da Rocha

Fundada a 12 de novembro de 1953

•
Considerada de Utilidade Pública pela Lei Estadual nº 1.019 de 09 de junho de 1954

•
Considerada de Utilidade Pública Municipal pela Lei nº 1.414 de 12 de maio de 1973

•
Considerada de Utilidade Pública Federal pelo Decreto nº 89.057 de 24 de novembro de 1983

•
Certificado Definitivo de Entidade de Fins Filantrópicos expedido em 19 de março de 1984, pelo Conselho Nacional de Serviço Social do Ministério de Educação e Cultura

•
Cadastrada na Divisão Nacional de Doenças Crônicas - Degenerativas Processo DNC 9.918/72