



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Epidemiologia molecular do Papilomavírus humano em mulheres  
atendidas no Sistema Único de Saúde no município de Olinda - PE**

MAREK HENRYQUE FERREIRA EKERT

RECIFE – PE

Agosto 2011

MAREK HENRYQUE FERREIRA EKERT

**Epidemiologia molecular do Papilomavírus humano em mulheres  
atendidas no Sistema Único de Saúde no município de Olinda - PE**

ORIENTADORA: PROFa. DRa. DANYELLY BRUNESKA GONDIM MARTINS

COORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

RECIFE – PE

Agosto 2011

**Ekert, Marek Henryque Ferreira**

**Epidemiologia molecular do Papilomavírus humano em mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde no município de Olinda-PE / Marek Henryque Ferreira Ekert. – Recife: O Autor, 2011.**

**76 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins**

**Co-orientador: José Luiz de Lima Filho**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.**

**Inclui bibliografia e anexos**

**1. Papilomavírus humano 2. Reação em cadeia de polimerase 3. Cancer (epidemiologia) I. Título.**

**579.2445**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2011-198**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Epidemiologia molecular do Papilomavírus humano em mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde no município de Olinda - PE

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno **MAREK HENRYQUE FERREIRA EKERT** ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, julgada adequada e **APROVADA**, pelos Membros da Banca Examinadora, na sua redação, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Recife, 29 de agosto de 2011.

---

Presidente (Orientadora): Prof. Dra. Danyelly Brunaska Gondim Martins  
Departamento de Bioquímica, UFPE

---

Membro interno (Coorientador): Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho  
Departamento de Bioquímica, UFPE

---

Membro externo: Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo  
Departamento de Bioquímica, UFPE







“Tudo se consegue através de muita dedicação, perseverança e muito desejo de vitória na vida. Seja quem você for, seja qual for a posição social que você tem na vida, tenha sempre como meta muita força, muita determinação, buscando seu último limite e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus. Um dia você chega lá... ... de alguma maneira você chega lá.“

Ayrton Senna

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela paz, tranqüilidade e serenidade nos momentos necessários.

A minha mãe, Solange Ferreira Ekert, pela segurança passada nas horas de incertezas, perseverança me fazendo acreditar que tudo vai da certo, conversas diárias, brincadeiras e amor. Uma mulher única e insubstituível.

Ao meu Pai, Marek Ekert, por acreditar que o filho é motivo de orgulho e pelo ensinamento, entre muitos outros, de que a tônica do sucesso se faz através da humildade e da competência.

A minha irmã, Agnieszka Adrieny Ferreira Ekert, por sempre acreditar em mim e torcer pelo meu sucesso.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danyelly Brunaska, pela competência em transmitir com sabedoria os conhecimentos que fundamentaram essa dissertação, pelo estímulo e confiança depositados em mim e, principalmente, pela amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pelas oportunidades e incentivo profissional em todos os momentos. Uma pessoa extraordinária e, sinceramente, rara de se encontrar.

A Clarice Cardim, por ter contribuído principalmente com a realização da apresentação desta dissertação e, ainda contribuir com meu crescimento acadêmico, profissional e, principalmente pessoal. Uma grande mulher.

A toda a nação Prospecmol, Alexandre Luna, Antônio Marinho, Alice Bezerra, Chirleanny Mendes, Conceição Gomes, Daianna Martins, Eliete Rodrigues, Flávia Araújo, Henrique Castelletti, Juan Coelho, Juliana Landim, Julianna Nunes, Kleiton Borges, Laís Weinstein, Marcela Wanderley, Maíra Mafra, Monique Ferraz, Rodrigo Pimentel, Sabine Lima e Talitha Mey pelo clima de família passado diariamente e, por fazer do laboratório um fantástico ambiente não só para o trabalho, mas de aprendizagem para toda a vida. Em especial a Aíla Lima, pela ajuda na formatação desta dissertação.

Aos amigos do LIKA, Eliane Coimbra, Eriton Cunha, Gustavo Alves, Marina Cartaxo, Rafael Padilha e André Galvão pelas conversas, ensinamentos e idéias trocadas dentro e fora do laboratório.

Aos amigos Afonso Agra, Allan Chernichiarro, João Scavuzzi, Igor Souza e Rafael Lira pelo companheirismo e momentos de descontração entre um experimento e outro, dentro e fora da Universidade.

Aos professores Dr.: José Luiz de Lima Filho e Dra.: Rosângela Frade pelas contribuições dadas na qualificação.

A instituição, LIKA pela estrutura oferecida para o desenvolvimento das pesquisas.

Em especial às pacientes que cederam material biológico em prol da ciência.

Obrigado!

## RESUMO

Os Papilomavírus humano (HPV) são responsáveis por causar lesões epiteliais, podendo evoluir a diversos tipos de carcinomas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o câncer cervical sendo detectado em aproximadamente 99% dos casos. O HPV 16, assim como o HPV 18, são os genótipos virais mais prevalentes em carcinomas cervicais invasivos no mundo. O teste molecular é mais eficiente em exames preventivos, ratificando sua utilização para a triagem do HPV e, desta forma, favorecendo a prevenção das lesões causadas pelo vírus. A presente dissertação teve como objetivo identificar os genótipos prevalentes do HPV em amostras cervicais consideradas normais e com alterações. O estudo de corte transversal foi realizado com 241 mulheres de 18 a 60 anos, atendidas numa Unidade de Saúde da Família do município de Olinda - PE. As amostras de DNA foram extraídas de células de raspado do colo uterino utilizando kit comercial. A infecção pelo HPV foi investigada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers consensus* MY09/11 e GP5+/6+. Alterações celulares foram visualizadas pelo exame citopatológico (Papanicolaou). O PapilloCheck® HPV-screen DNA-chip foi utilizado para genotipar os HPV presentes nas amostras biológicas. Através do exame citopatológico observou-se que apenas 2,90% das pacientes apresentaram alterações celulares características da infecção pelo HPV, enquanto que o diagnóstico molecular permitiu detectar a presença do DNA viral em 23,23% das pacientes. Os dois pares de *primers* testados tiveram eficiências similares, sendo o MY09/11 com 15,35% e, o GP5+/6+ com 17,01%, entretanto o percentual de concordância entre ambos foi de apenas 39,28%. Neste estudo, o HPV6 (16,94%) e os HPV16 e HPV11, cada um com 10,16%, foram os genótipos virais mais prevalentes, em conjunto respondendo por quase 30% dos casos. O percentual de amostras com múltipla infecção foi de 22,03% sendo o HPV52 o genótipo mais prevalente (8,47%). Neste estudo o HPV 18 não figurou como sendo um dos genótipos mais prevalentes. A alta prevalência dos genótipos HPV6, 16 e 11 contribui para a discussão sobre estratégias de implantação de uma vacina contra o HPV, melhorando assim, a qualidade da assistência à saúde, além de reduzir os gastos públicos com tratamentos. Contudo, estudos incluindo uma maior amostragem em diferentes áreas do município se faz necessário para obter uma visualização mais detalhada da prevalência genotípica do HPV na região.

**Palavras-chave:** Papilomavírus, PCR, genotipagem.

## ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) are responsible for epithelial damage, which can progress to various types of carcinomas. According to the World Health Organization, HPV infection is the major risk factor for cervical cancer is detected in approximately 99% of cases. HPV 16, and HPV 18 viral genotypes are more prevalent in invasive cervical cancers worldwide. The molecular test is more effective in preventive examinations, confirming its use for screening of HPV, and thus promoting the prevention of injuries caused by the virus. This dissertation aimed to identify the prevalent genotypes of HPV in cervical samples with normal and considered changes. The cross-sectional study was conducted with 241 women from 18 to 60 years, attended a Family Health Unit of the municipality of Olinda - PE. DNA samples were extracted from cells scraped from the cervix using a commercial kit. HPV infection was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers and MY09/11 consensus GP5 + / 6 +. Cellular changes were viewed by the Pap test (Papanicolaou). The PapilloCheck HPV-DNA-chip screen was used to genotype the HPV present in biological samples. Through the Pap test showed that only 2.90% of patients showed cellular changes characteristic of HPV infection, whereas the molecular diagnosis allowed us to detect the presence of viral DNA in 23.23% of patients. The two primer pairs tested had similar efficiencies, and the MY09/11 with 15.35% and the GP5 + / 6 + 17.01%, however the percentage of agreement between them was only 39.28%. In this study, HPV6 (16.94%) and HPV16 and HPV11, each with 10.16%, were the most prevalent viral genotypes, together accounting for nearly 30% of cases. The percentage of samples with multiple infections was 22.03%, with HPV52 the most prevalent genotype (8.47%). In this study, HPV 18 did not figure as one of the most prevalent genotypes. The high prevalence of genotypes HPV6, 16 and 11 contributes to the discussion on strategies for implementation of an HPV vaccine, thus improving the quality of health care, and reduce public spending on treatments. However, studies including a larger sample in different areas of the county is required to obtain a more detailed view of the prevalence of HPV genotype in the region.

**Keywords:** Papillomavirus, PCR, genotyping

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

- Figura 1:** Árvore filogenética dos Papilomavírus. 4
- Figura 2:** Representação do mapa genômico do HPV 16. URR (LCR). 6
- Figura 3:** Esquema mostrando a infecção pelo Papilomavírus humano. 9
- Figura 4:** Imagem esquemática e colposcópica dos diferentes graus de lesões cervicais. 10
- Figura 5:** Processo de transformação maligna das células infectadas pelo HPV. 11
- Figura 6:** Mecanismos moleculares pelos quais as oncoproteínas do Papillomavírus humano cooperam para induzir a carcinogênese cervical. 13
- Figura 7:** Prevalência do HPV entre mulheres com citologia normal e prevalência dos cinco genótipos mais frequentes do HPV no mundo. 15
- Figura 8:** Os dez tipos mais freqüentes de HPV entre as mulheres com e sem lesões cervicais no Brasil. 16
- Figura 9:** Microscopia óptica demonstrando alterações morfológicas celulares causadas por HPV – Coilocitos. 19
- Figura 10:** Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). 21

### Capítulo 1

- Figure 1:** Most prevalent HPV genotypes in women without cervical lesion. 42

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Tabela 1:</b> Incidência da infecção pelo HPV no Brasil.	16
<b>Tabela 2:</b> Estimativa para os anos de 2010/2011 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de casos novos por câncer, no Brasil, em mulheres, segundo localização primária.	17
<b>Tabela 3:</b> Estimativa para o ano de 2011 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de casos novos por câncer, em mulheres do estado de Pernambuco, segundo localização primária.	17
<b>Tabela 4:</b> Classificação de Papanicolau, Bethesda e NIC para – Interpretações e orientações.	20

### Capítulo 1

<b>Table 1:</b> Characteristics of age and sex of patients seen between April and June 2011.	39
<b>Table 2:</b> Distribution of HPV genotypes among the 52 negative samples by Pap smear.	41
<b>Table 3:</b> Cervical lesions associated with HPV genotype, age and number of partners.	43

## LISTA DE ABREVIÇÕES

PV	Papilomavírus
L	gene que codifica proteína Late ou tardia
ICTV	International Council on the Taxonomy of Viruses
HPV	Human Papillomavirus (Papilomavírus humano)
ORF	open reading frame (quadro de leitura aberta)
H	histona
E	gene que codifica proteína early ou imediata
kD	quilodaltons
nm	nanômetros
ORI	origem de replicação
LCR	longa região de controle
NIC	neoplasia intraepitelial cervical
E6-AP	proteína associada a E6
p53	proteína 53, supressora de tumor
pRb	proteína do retinoblastoma
E2F	família de fatores de transcrição específica
WHO	World Health Organization
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PNAO	Política Nacional de Atenção Oncológica
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
ASCUS	atipias de células escamosas de caráter desconhecido
AGUS	células glandulares atípicas
LSIL	lesão intraepitelial de baixo grau
HSIL	lesão intraepitelial de alto grau
G1	período de crescimento celular
S	período de síntese (replicação) celular

# Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	vii
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	3
2.1 Taxonomia.....	3
2.2 Genoma Viral.....	5
2.3 Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) .....	7
2.4 HPV <i>versus</i> câncer cervical .....	9
2.4.1 <i>Cofatores</i> .....	13
2.5 Epidemiologia do câncer cervical .....	14
2.6 Métodos de diagnóstico para HPV e alterações cervicais .....	18
<b>3. Objetivos</b> .....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	23
<b>5. Capítulo 1</b> .....	29
<b>6. Conclusões e Perspectivas</b> .....	58
<b>7. Informações Complementares</b> .....	59
Trabalho aceito para o XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia e de La Sociedad Latinoamericana de Patologia. ....	59
<b>8. Anexos</b> .....	60
8.1 Código dos nucleotídeos que apresentam ambiguidade – IUPAC .....	60
8.2 Questionário padronizado para obtenção de informações sócio- demográficas, comportamentais, nutricionais e reprodutivas das pacientes.....	61
8.3 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	68
8.4 Instruções para autores .....	69
8.4.1 <i>International Journal of Infectious Diseases</i> .....	69

# 1. Introdução

Os Papilomavírus (PV) são responsáveis por causar diversas lesões epiteliais, infectando epitélios cutâneos e mucosos, e causando desde lesões benignas a carcinomas. O Papilomavírus humano (HPV), sexualmente transmissível, apresenta grande ocorrência na população mundial estando relacionado com a carcinogênese cervical.

Atualmente, sabe-se que existem mais de 150 genótipos de HPV (Bravo, *et al.*, 2010) e que cerca de 40 podem ser encontrados na região anogenital, causando o câncer cervical. No entanto, o HPV pode ser encontrado em vários outros locais de infecção, levando a outros tipos de cânceres, tais como: olho, cabeça e pescoço, faringe, laringe, pele, mama, dedo e unha, pulmão, fígado, estômago, bexiga, cólon, vagina, vulva, pênis e ânus (zur Hausen, 2009a, 2009b, Beltrão *et al.*, 2010), sítios de infecção diferentes ao qual foi originalmente vinculado (zur Hausen *et al.*, 1977, Shukla *et al.*, 2009).

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 530 mil casos novos por ano no mundo, sendo responsável pelo óbito de 274 mil mulheres por ano (WHO, 2010). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2011, são esperados, no Brasil, 18.430 casos novos, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2010). Desta forma, o câncer de colo de útero constitui um problema de saúde pública e apesar do exame citopatológico ser realizado para detecção precoce, ainda apresenta limitações importantes devido a erros na coleta, preparação e leitura das amostras citológicas (Gontijo *et al.*, 2004; Jordão *et al.*, 2003).

Atualmente existe grande preocupação em torno do aperfeiçoamento dos métodos de detecção citopatológicos do HPV, portanto se faz necessária a implementação de novas ferramentas diagnósticas mais sensíveis e específicas, tais como o diagnóstico molecular. Devido aos resultados rápidos e precisos das

técnicas de biologia molecular, como na reação em cadeia de polimerase (PCR), é provável que seja incorporado aos laboratórios citopatológicos como rotina de trabalho (Carmo; Fiorini, 2007).

Em Pernambuco, a grande incidência do HPV e do câncer cervical (INCA, 2010) ratifica a necessidade de implantação dessas novas estratégias de diagnóstico, com o intuito de tornar o tratamento e acompanhamento dessas pacientes mais eficazes.

Desta forma, tendo em vista a importância social e econômica do tema, a presente dissertação buscou avaliar a prevalência do HPV na população feminina de Olinda, identificando os diferentes genótipos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer do colo do útero, visando contribuir para a discussão sobre a implantação de programas de vacinação frente ao HPV no Sistema Único de Saúde.

Assim, esse estudo poderá servir como uma ferramenta para o gerenciamento e possível implementação, via gestão pública, de novas políticas sociais de combate ao HPV e, conseqüentemente, do câncer do colo uterino, melhorando assim, a qualidade da assistência à saúde, além de reduzir os gastos públicos com tratamentos.

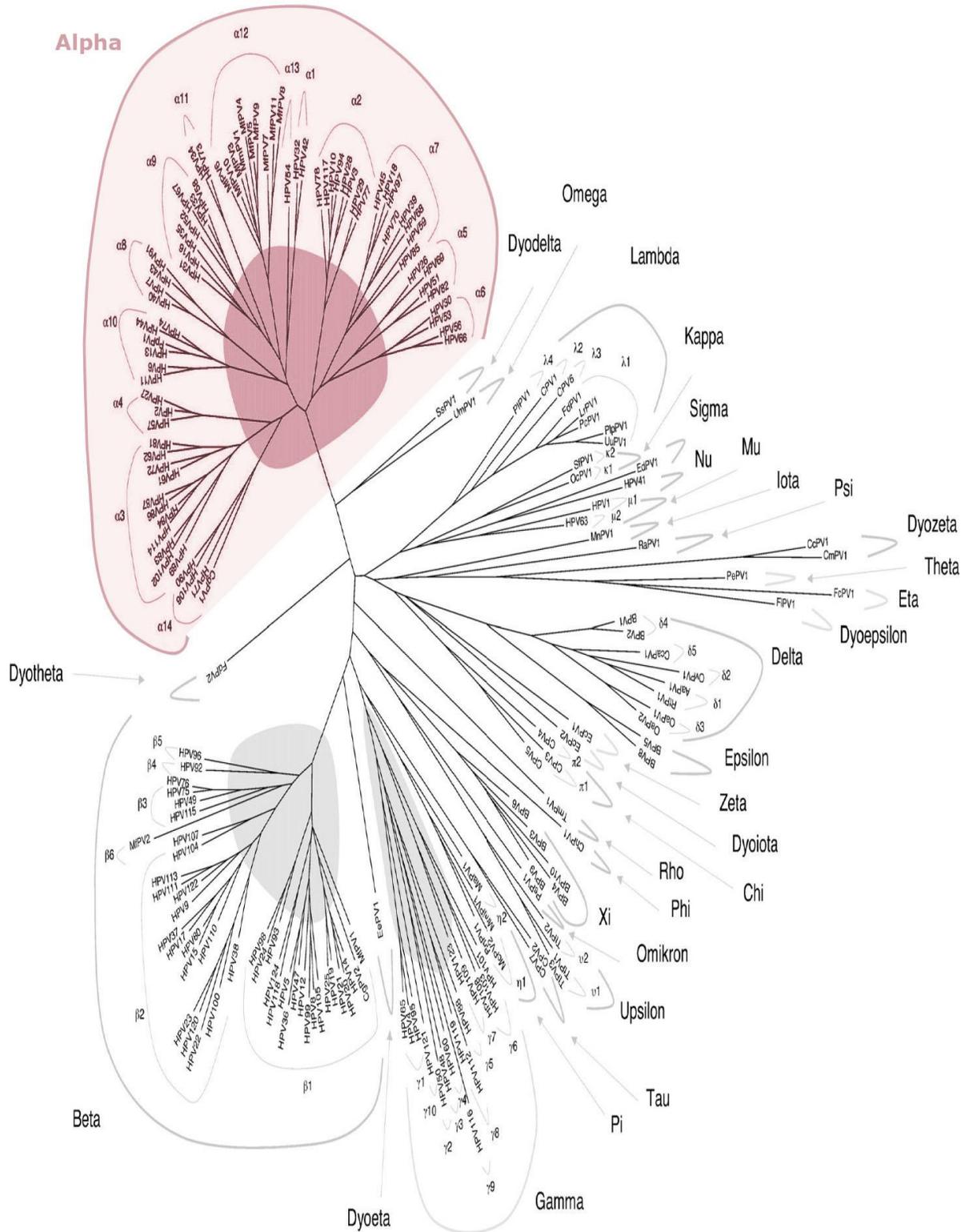
## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Taxonomia

De acordo com o *International Council on the Taxonomy of Viruses* (ICTV), o Papilomavírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, que agrega, atualmente, 29 gêneros, dentre os quais cinco têm como hospedeiro o homem: alfa-papilomavirus, beta-papilomavirus, gama-papilomavirus, mu-papilomavirus e nu-papilomavirus (**Figura 1**) (de Villiers *et al.*, 2004). Clinicamente, o gênero alfa-papilomavírus é o mais importante, sendo dividido em espécies 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, que agregam todos os genótipos de HPV associados às lesões da mucosa genital. O HPV16, por exemplo, está classificado no gênero alfa, espécie 9 (Bernard, 2005).

A validação entre tipos, subtipos e variantes é determinada pelo gene L1, um dos genes mais conservados do genoma dos Papilomavírus (PV), e que vem sendo usado para identificação e classificação. Para que um novo tipo de PV seja registrado é necessário que seu genoma tenha no mínimo 10% de diferença entre todos os tipos de PV conhecidos. Foi criado o termo subtipos para diferenças na L1 abaixo de 10% e acima de 2%. Diferenças abaixo de 2% entre o genoma novo e o protótipo, genoma de referência, são classificados como variantes. Tais variantes têm sua diferença máxima no genoma quando se compara grupos étnicos com uma longa separação temporal (de Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010).

As árvores filogenéticas também podem ser observadas como uma representação hipotética da história da evolução molecular. A importância de



**Figura 1:** Árvore filogenética dos Papilomavírus construída por alinhamento de aminoácidos das proteínas E1, E2 e L1. O gênero Alfa está destacado em vermelho. Modificado a partir de Bernard et al., 2010.

conhecer a diversidade, taxonomia e evolução viral para o diagnóstico se correlaciona com o fato de que abordagens terapêuticas têm sido valorizadas, visto que dados epidemiológicos e interações a nível molecular têm sido apontadas como dependente destes fatores (Bernard *et al.*, 2006).

A partir da década de 70, o virologista alemão Harold zur Hausen iniciou os estudos sobre papel do HPV no câncer cervical, até que em meados da mesma década, ele estabeleceu o papel do HPV como sendo o fator promotor para esta neoplasia, tal descoberta lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2008.

Mais de 150 genótipos de HPV já foram sequenciados e bem caracterizados (Bravo *et al.*, 2010), sendo que cerca de 40 estão relacionados às infecções anogenitais. Os genótipos virais podem ser classificados quanto ao risco de malignidade que oferecem ao trato genital em: alto-risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82), e baixo risco, associado com lesões benignas genitais e verrugas na pele (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44) (Dalstein *et al.*, 2009). O HPV16, assim como o HPV18, são os genótipos virais mais prevalentes em carcinomas cervicais invasivos e neoplasias intraepiteliais cervicais, sendo encontrados em mais de 50% dos achados (zur Hausen, 1996; Wheeler *et al.*, 2009; Vijayaraghavan *et al.*, 2010).

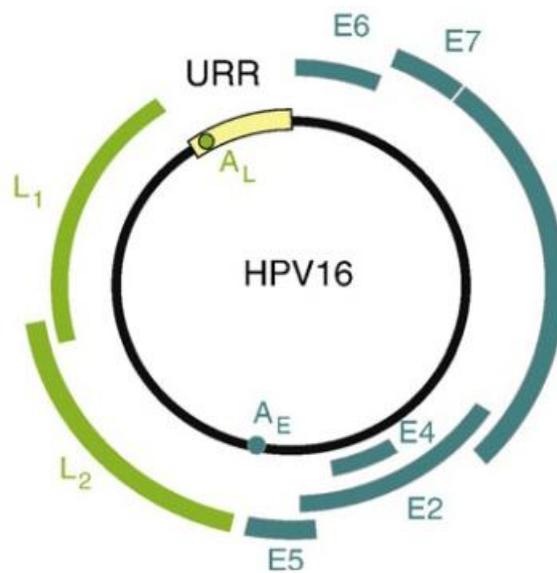
Existem oito genótipos de HPV responsáveis por cerca de 90% de todos os cânceres cervicais no mundo, aqui apresentados em ordem decrescente de frequência: HPV16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 (Wright *et al.*, 2006). Atualmente, sabe-se que o HPV pode ser encontrado em sítios de infecção diferentes ao qual foi originalmente vinculado (zur Hausen *et al.*, 1977, Shukla *et al.*, 2009). Através de técnicas de biologia molecular já se consegue detectar o DNA do HPV em 92,9% a 99,7% dos espécimes de câncer cervical invasivo (Muñoz *et al.*, 2006).

## **2.2 Genoma Viral**

Os HPV são responsáveis por causar diversas lesões epiteliais, infectando epitélios cutâneos e mucosos, e causando desde lesões benignas a carcinomas.

A organização genômica de todos os HPV é semelhante, possuindo todas as suas regiões com potencial para codificar proteínas, denominadas ORFs (*Open Reading Frames*) numa mesma fita do DNA (Esquenazi *et al.*, 2010).

O material genético do vírus é caracterizado por uma dupla cadeia de DNA circular, com aproximadamente oito mil pares de bases, (**Figura 2**) envolvida com as histonas H2a, H2b, H3 e H4, constituída por oito genes que são agrupados de acordo com a velocidade pela qual são expressos. Os genes de expressão tardia “*Late*”: L1, de 55kD de tamanho (80% da proteína total viral) e L2, de peso molecular de 70kD codificam proteínas do capsídeo viral. O capsídeo viral possui forma icosaédrica com um diâmetro de 50nm a 60nm, é formado por 72 capsômeros e não é revestido por envelope lipídico. Os genes de expressão rápida “*Early*”: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 codificam proteínas envolvidas na replicação, transcrição e transformação viral (Esquenazi *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Representação do mapa genômico do HPV 16. URR (LCR) – Região regulatória upstream. L1 e L2 - genes “late”; E2 a E7 - genes “early”. Modificado a partir de Stanley, 2010.

O genoma viral ainda possui uma região reguladora longa (LCR ou URR) não codificante, apresenta sequências ativadoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (ORI), variando de 400 a 1000 pb, localizada entre as regiões L1 e E6 (Kisseljov, 2000; Burd, 2003; Silva *et al.*, 2003).

Durante a transcrição, o genoma do HPV é controlado por diversos promotores, dentre os quais, o promotor P97 (para o HPV-16) é considerado o principal, sendo responsável pelo direcionamento da expressão de E6 e E7 (Chow, 2010). Vários promotores adicionais já foram identificados em diferentes regiões do genoma viral, porém seus significados para a expressão dos genes precoces e tardios e sua atividade relacionada com a diferenciação celular ainda não são conhecidos em detalhe (Mistry, 2007).

O genoma do HPV pode sofrer variações por mutações pontuais, deleções e inserções, que podem se tornar permanentes numa população, se selecionadas positivamente ou, se forem funcionalmente neutras, pela expansão seletiva da população hospedeira infectada (Bernard, 2010).

### **2.3 Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV)**

A infecção por HPV ocorre pelo contato direto, através de microlesões na pele que expõem a membrana basal do epitélio, sendo considerada como causa majoritária para o desenvolvimento do câncer cervical, porém apenas 10% das mulheres infectadas por genótipos de alto-risco devem desenvolver a doença (Cavalcanti; Carestiato, 2006).

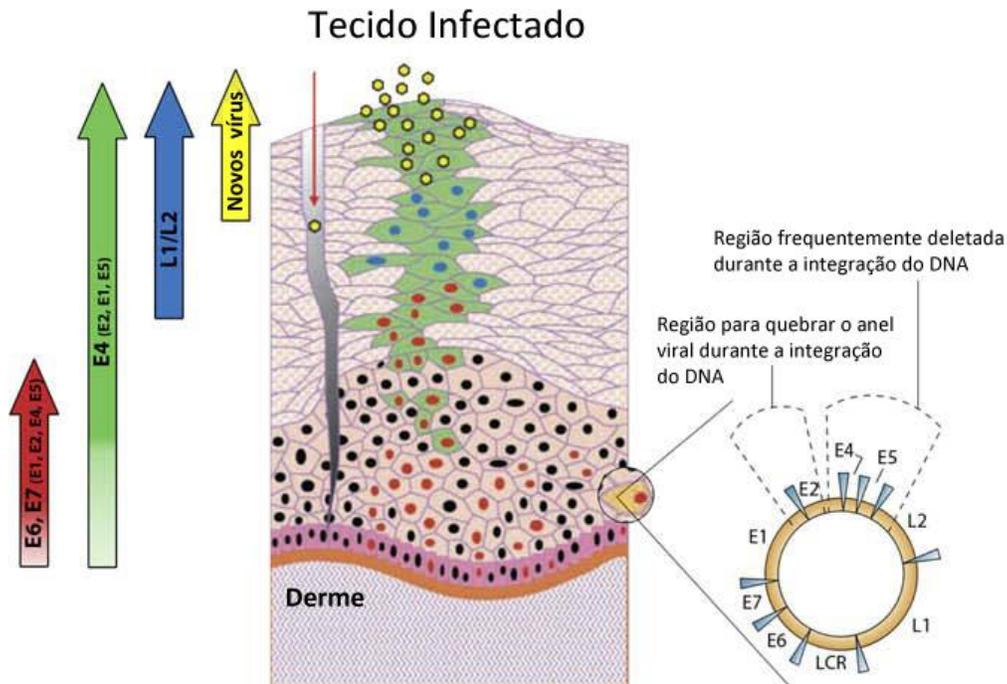
As vias de transmissão do HPV podem ser sexual, não sexual (familiar ou nosocomial por fômites) ou materno – fetal, podendo ser gestacional, intra e periparto. Entre elas, a via sexual representa a grande maioria dos casos. Outros tipos de contato genital com ausência de penetração, incluindo o sexo oral, também têm sido relatados. Com relação à via não-sexual, é provável que o HPV possa ser transmitido também pelo instrumental ginecológico, quando não esterilizado adequadamente (Queiroz; Cano; Zaia, 2007).

A maioria dos vírus infectam uma célula-alvo e passam a produzir a progênie viral a partir dessa mesma célula infectada. Por outro lado, em infecções por HPV, a síntese de novos vírions ocorre somente após a célula infectada ter sofrido mitose e uma das filhas dessa célula infectada ter-se diferenciado (Howley, 2007).

O ciclo de vida do HPV (**Figura 3**) inicia-se por um processo infeccioso que ocorre na camada basal de queratinócitos do epitélio, resultando numa infecção clínica ou subclínica. No primeiro estágio do ciclo viral, o genoma do HPV é estabilizado na forma de elemento extracromossômico (epissomo) na célula basal epitelial, o qual é replicado para um número de 50 a 100 cópias aproximadamente junto com o DNA do hospedeiro, na fase S. Os primeiros genes a serem expressos são E1 (helicase) e E2 que formam um complexo para se ligar à origem de replicação do genoma viral e recrutar a maquinaria necessária da célula, como polimerase e proteínas acessórias (Mohr *et al.*, 1990; Frattini *et al.*, 1994; Conger *et al.*, 1999). Além disso, a proteína E2 funciona como um fator de transcrição que ativa ou reprime a transcrição dos outros genes E (McBride *et al.*, 1991). As proteínas E5, E6, e E7 participam da transformação celular pela indução da proliferação basal e parabasal das células, levando a hiperplasia epitelial com papilomatoses de várias extensões (Stoler *et al.*, 1989; Haller *et al.*, 1995).

O segundo estágio do ciclo corresponde a um alto nível de expressão de proteínas virais não-estruturais (E4) e estruturais (L1 e L2) para a montagem dos vírions e sua liberação. A proteína E4 facilita a liberação dos vírions através do rompimento do citoesqueleto citoplasmático (Doorbar *et al.*, 1991). Nesta fase, ocorre a migração de uma das células infectadas para as camadas mais superiores (sentido apical) do epitélio com a finalidade de acompanhar o programa de diferenciação dos queratinócitos enquanto isso, a célula-filha infectada que permaneceu na camada basal se multiplica e mantém um verdadeiro reservatório de DNA viral (McCance, 2005).

O tempo de infecção até a liberação das partículas virais é de aproximadamente três semanas e corresponde ao tempo necessário para a diferenciação completa e descamação do queratinócito basal (Stanley, 2005). O tempo entre a infecção inicial e o aparecimento de papilomas pode depender da concentração e do tipo do vírus que infecta o tecido, também é sugerido que o estado de latência pode resultar da baixa concentração de vírus inoculado (Zhang *et al.*, 1999; Campo, 1995).



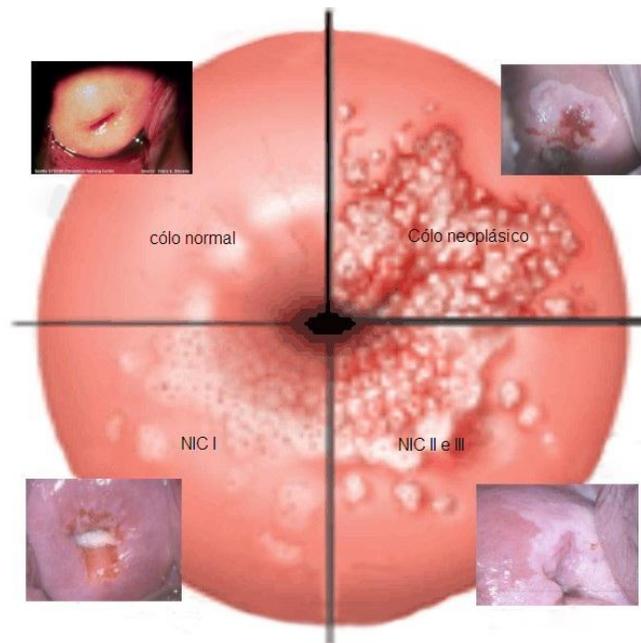
**Figura 3:** Esquema mostrando a infecção pelo Papilomavírus humano. Modificado a partir de Simonetti et al., 2010.

## 2.4 HPV versus câncer cervical

O câncer do colo do útero é caracterizado por uma replicação desordenada do epitélio de revestimento do dito órgão, comprometendo o tecido subjacente, chamado de estroma, e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou a distância. Existem duas principais categorias de carcinomas invasores do colo uterino, dependendo da origem do epitélio comprometido: o carcinoma epidermóide, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso (representa cerca de 80% dos casos), e o adenocarcinoma, tipo mais raro e que acomete o epitélio glandular (20% dos casos) (Moscicki *et al.*, 2006).

É uma doença de desenvolvimento silencioso, que pode cursar de maneira assintomática em fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados (Moscicki *et al.*, 2006).

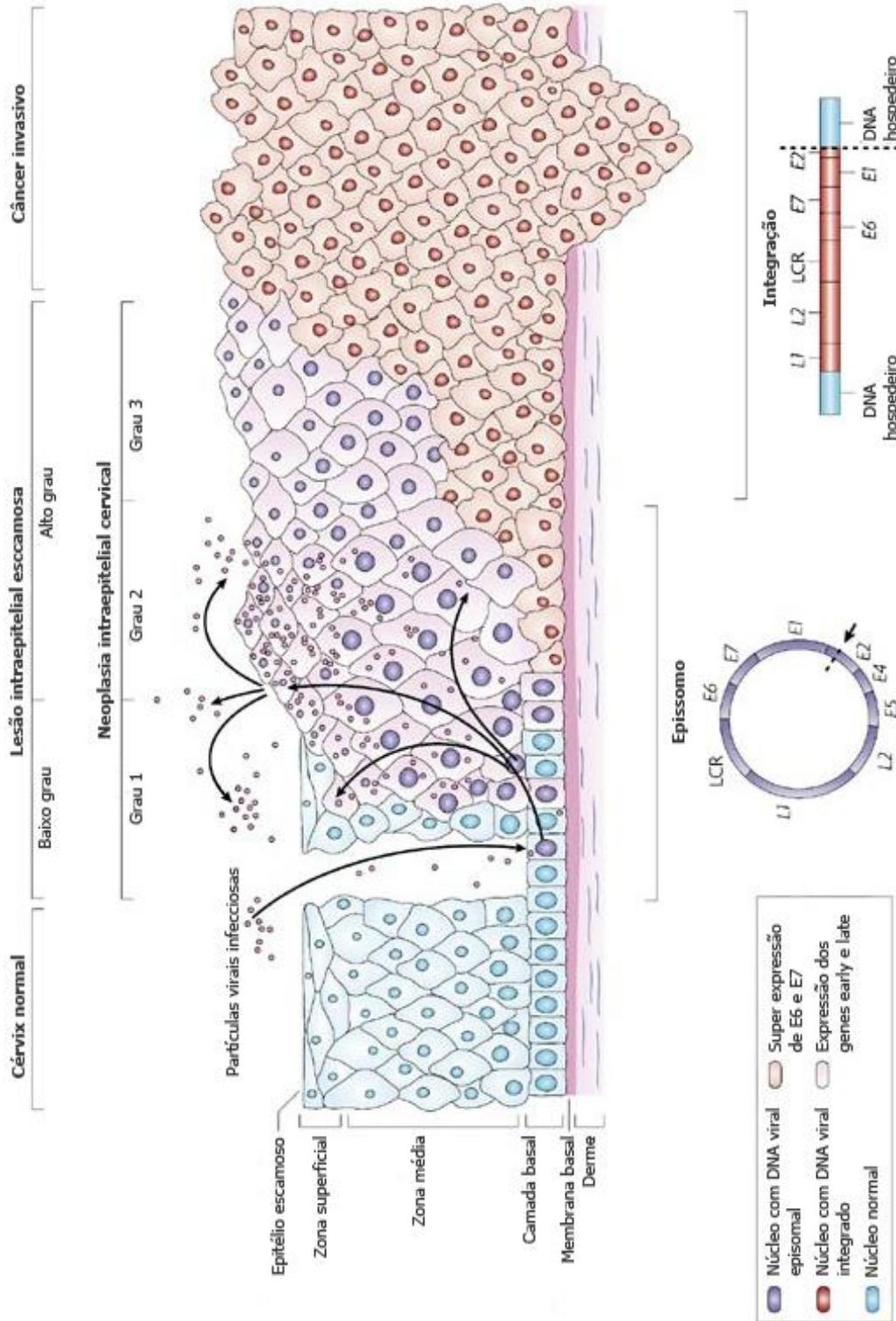
O seu desenvolvimento ocorre a partir das lesões cervicais precursoras que se apresentam em três graus evolutivos, do ponto de vista cito-histopatológico, e são classificadas como neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de graus I (lesão de baixo grau), II e III (lesões de alto grau) (Sampaio; Almeida, 2009), como se pode ver na **Figura 4**.



**Figura 4:** Imagem esquemática e colposcópica dos diferentes graus de lesões cervicais possíveis de serem observados durante o exame de colposcopia. Fonte: American society colposcopy and cervical pathology, Seattle STD/HIV prevention training center, Hopkins Medicine. Disponível em: <http://gineco.med.br/hpv/>

O processo de transformação maligna das células infectadas pelo HPV (**Figura 5**) é mediado através da interação entre os produtos dos genes virais E6 e E7 e as suas oncoproteínas, que têm demonstrado serem suficientes para garantir a transformação, imortalização celular e formação do tumor (Munger *et al.*, 1989; Doobar, 2005; Munõz *et al.*, 2006).

A atividade transformadora da oncoproteína E6 é dependente da sua ligação com a proteína supressora de tumor p53 por uma via ubiquitina-dependente (Thomas *et al.*, 1999). A associação da E6 com a p53 é mediada por uma proteína celular adicional, chamada proteína associada a E6 (E6-AP). A formação do complexo E6-p53 é fundamental para a inativação das funções supressoras da p53. Essa parece ser uma atividade específica dos HPV de alto risco, visto que os de



**Figura 5:** Processo de transformação maligna das células infectadas pelo HPV. A progressão das lesões cervicais está associada com a integração do genoma do HPV em cromossomos do hospedeiro (núcleos vermelhos), com perda associada ou interrupção de E2 e subsequente expressão dos oncogenes E6 e E7. Modificado de Ciaran et al, 2007.

baixo risco que codificam E6 não inativam a p53 pelo mesmo mecanismo (Werness *et al.*, 1990). Embora os efeitos da oncoproteína E6 de alto risco sobre a p53 sejam fundamentais para o desenvolvimento de câncer genital, rotas alternativas e independentes da p53 desempenham papéis igualmente importantes (Moody *et al.*, 2010).

A proteína E7 também contribui para a imortalização celular devido à sua capacidade de interagir com a proteína supressora tumoral do retinoblastoma (pRb), assim como membros de sua família, a p107 e p130. A família do Rb controla a transição de fase G1 para S, regulando a atividade da família de fatores de transcrição E2F (Dyson *et al.* 1998). Além de formar complexos com a pRb, a E7 também orienta a degradação através da via proteossômica ubiquitina-dependente (Boyer *et al.* 1996) induzindo a anti-apoptose.

Desta maneira, os oncogenes E6 e E7 dos HPV de alto risco quando co-expressos podem facilitar a imortalização de células epiteliais primárias. A contínua expressão de E6 e E7 é necessária para a manutenção do fenótipo transformado em quase todos os carcinomas cervicais. Este processo é potencializado pela ação de outra oncoproteína viral, a E5 (Moody *et al.*, 2010), na qual sua expressão prolongada causada pela infecção persistente possibilita o acúmulo de aberrações cromossômicas que culminam em transformação maligna. (Duesing e Munger, 2004) **(Figura 6)**.

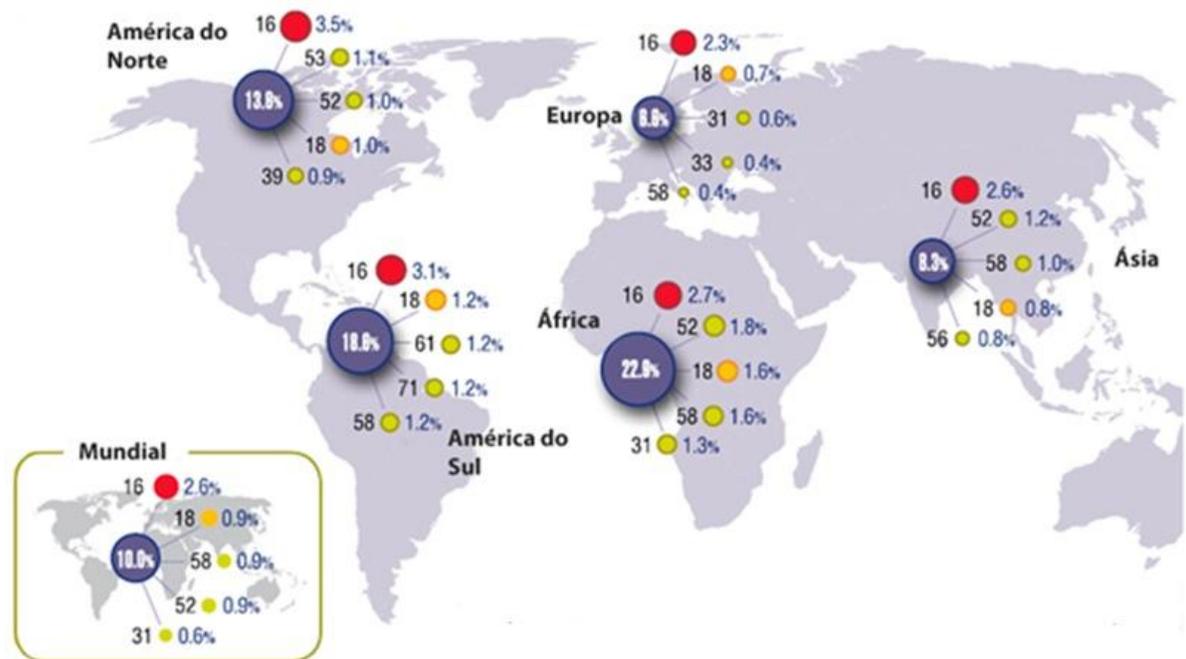


células apresentadoras de antígenos e que são responsáveis pela ativação de imunidade celular local contra o HPV (Queiroz; Cano; Zaia, 2007).

O número de parceiros sexuais, durante a vida, e a promiscuidade do parceiro sexual são fatores de risco importantes para a infecção por HPV genital. Tem sido relatado ainda que parceiros sexuais de mulheres com câncer cervical tiveram várias infecções genitais, incluindo verrugas e até câncer de pênis. A alta paridade é um fator consistente para o câncer cervical em mulheres que possuem DNA do HPV uma vez que o fator de risco dobra nas que tiveram quatro filhos, quando comparado com as que tiveram um ou nenhum (Albring; Brentano; Vargas, 2006).

## **2.5 Epidemiologia do câncer cervical**

Com aproximadamente 530 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de 274 mil mulheres por ano e, sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos (WHO, 2008a). A prevalência dos cinco genótipos mais frequentes do HPV no mundo pode ser visualizada na **Figura 7**.



**Figura 7:** Prevalência do HPV entre mulheres com citologia normal e prevalência dos cinco genótipos mais frequentes do HPV no mundo. Modificado de [www.who.int/hpvcentre](http://www.who.int/hpvcentre), 2009.

As taxas de incidência estimada e de mortalidade no Brasil apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoces bem estruturados. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas, enquanto países da América Latina e, sobretudo, de regiões mais pobres da África, apresentam valores bastante elevados. Segundo a OMS, mais de 80% dos casos de câncer do colo do útero ocorrem nos países em desenvolvimento (WHO, 2008b), que concentram 82% da população mundial (UN Populations Divisions, 2009).

O Brasil tem uma população de 69,14 milhões de mulheres com idades a partir dos 15 anos, que estão em risco de desenvolver câncer cervical. As estimativas atuais indicam que a cada ano 24.562 mulheres são diagnosticadas com câncer de colo uterino e 11.055 morrem da doença. O câncer cervical aparece como o segundo tipo mais frequente de câncer entre as mulheres no Brasil, e o segundo câncer mais freqüente entre as mulheres entre 15 e 44 anos de idade. A infecção pelo HPV é estimada em 14,1% das mulheres na população com citologia

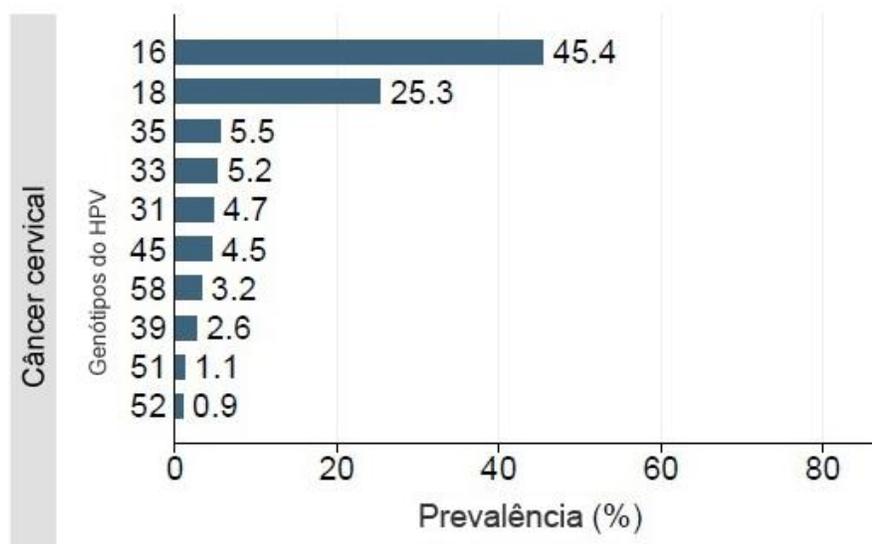
normal (**Tabela 1**), em um determinado momento de suas vidas. Como podemos observar na **Figura 8**, 70,7% dos cânceres cervicais invasivos são atribuídos aos HPV 16 ou 18 (WHO, 2010).

**Tabela 1:** Incidência da infecção pelo HPV no Brasil. Modificado de WHO, Set. 15, 2010.

	Nº testados	% (95% CI)
Prevalência do HPV em mulheres com citologia normal	5582	14.1 (13.2-15.1)
Prevalência HPV 16/18:		
Citologia normal	842	4.3 (3.0-5.9)
Lesões cervicais de baixo grau <sup>a</sup>	144	34.7 (27.0-43.1)
Lesões cervicais de alto grau <sup>b</sup>	191	54.0 (46.6-61.1)
Câncer cervical	573	70.7 (66.8-74.4)

<sup>a</sup> Lesões cervicais de baixo grau: LSIL ou NIC-1.

<sup>b</sup> Lesões cervicais de alto grau: NIC-2, NIC-3 ou HSIL.



**Figura 8:** Os dez tipos mais frequentes de HPV entre as mulheres com e sem lesões cervicais no Brasil. Modificado a partir de WHO, Set. 15, 2010.

Segundo o INCA, no Brasil, para o ano de 2011, são esperados 18.430 casos novos, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres, como mostrado na **Tabela 2** (INCA, 2009).

**Tabela 2:** Estimativa para os anos de 2010/2011 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de casos novos por câncer, no Brasil, em mulheres, segundo localização primária. Fonte: INCA, 2010.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traqueia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
<b>Subtotal</b>	<b>192.590</b>	<b>192,74</b>	<b>66.270</b>	<b>282,03</b>
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>253.030</b>	<b>253,23</b>	<b>79.070</b>	<b>336,52</b>

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Na análise regional no Brasil, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte, com 23 casos por 100 mil mulheres. Nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, o câncer cervical ocupa a segunda posição, com taxas de 20/100 mil e 18/100 mil, respectivamente, e é o terceiro mais incidente nas regiões Sudeste (21/100 mil) e Sul (16/100 mil) (INCA, 2009). Na região Nordeste, Pernambuco tem uma taxa estimada de 1.020 novos casos de câncer de colo de útero para cada 100.000 mil habitantes para os anos de 2010/2011 (Tabela 3) (INCA, 2010).

**Tabela 3:** Estimativa para o ano de 2011 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de casos novos por câncer, em mulheres do estado de Pernambuco, segundo localização primária. Fonte: INCA, 2010.

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	2.120	46,35	720	84,25
Colo do Útero	1.020	22,21	190	22,52
Cólon e Reto	440	9,53	170	20,39
Traqueia, Brônquio e Pulmão	350	7,72	110	13,13
Estômago	310	6,72	70	8,80
Leucemias	190	4,11	50	5,97
Cavidade Oral	210	4,46	30	4,11
Pele Melanoma	60	1,22	**	1,69
Esôfago	110	2,31	20	2,11
Outras Localizações	2.470	54,02	1.240	145,77
<b>Subtotal</b>	<b>7.280</b>	<b>159,22</b>	<b>2.610</b>	<b>306,83</b>
Pele não Melanoma	3.880	84,81	480	57,00
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>11.160</b>	<b>244,04</b>	<b>3.090</b>	<b>363,12</b>

As maiores prevalências de HPV são encontradas em mulheres com idade abaixo dos 25 anos, com progressivo declínio linear após esta idade, devido à elevação da idade resultar em mudanças dos hábitos sexuais, tornando as mulheres menos expostas (Rama *et al.*, 2008). A mortalidade aumenta progressivamente a partir da quarta década de vida, com expressivas diferenças regionais, porém, é o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente (Brasil. Datasus/SIM).

Impulsionado pelo Programa Viva Mulher, criado em 1996, o controle do câncer do colo do útero foi firmado como prioridade na Política Nacional de Atenção Oncológica (PNAO) (INCA, 2005) e no Pacto pela Saúde (BRASIL, 2006).

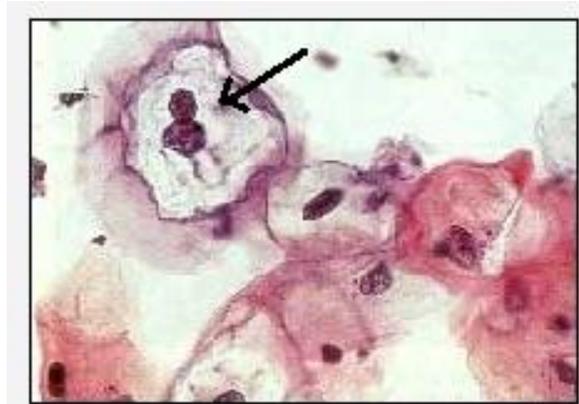
## **2.6 Métodos de diagnóstico para HPV e alterações cervicais**

Na maioria dos países em desenvolvimento, o câncer cervical é a doença maligna líder do sexo feminino e uma causa comum de morte entre as mulheres de meia idade. Em populações desenvolvidas com opções de boa triagem, o câncer cervical invasivo é uma condição relativamente rara. (Bosch e De Sanjose, 2003).

Há necessidades atuais na perspectiva do controle do câncer cervical que podem ser atendidas pela ampliação e pelo aperfeiçoamento do diagnóstico, rastreamento e tratamento das lesões precursoras e dos casos de câncer detectados, que podem ter impacto na redução da mortalidade em aproximadamente 10 anos (WHO, 2002), principalmente na população com maior incidência deste tipo de câncer.

O diagnóstico para o HPV pode ser realizado de maneiras distintas, de acordo com a fase na qual se encontra a infecção. Na fase latente, utilizam-se as técnicas de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), enquanto que na fase sub-clínica preza-se pela colposcopia (biópsia) e microscopia dos raspados vaginais em busca das alterações celulares características da infecção viral. O achado citológico característico é a presença de coilócitos, (**Figura 9**) células binucleadas com halo perinuclear e bordos delimitados, contendo partículas virais em seu interior.

Na fase aguda, a análise é feita observando as manifestações clínicas de condiloma acuminado (verrugas) e extensas lesões (Burd *et al*, 2003).



**Figura 9:** Microscopia óptica demonstrando alterações morfológicas celulares causadas por HPV – Coilocitos. Fonte: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=327](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327)

Devido à variedade dos laudos citopatológicos para diagnóstico de células infectadas pelo HPV, estudiosos vem buscando padronizar a classificação das lesões. A primeira normatização existente foi dada em 1941 por George Papanicolaou, a qual foi modificada em 1988 pela Classificação de Bethesda. Em 1991, esta classificação foi revisada e em 2001 introduziram-se novas técnicas para detecção do HPV em achados citológicos, passando a ser conhecido por sistema NIC (**Tabela 4**). (Frappart *et al.*, 2006).

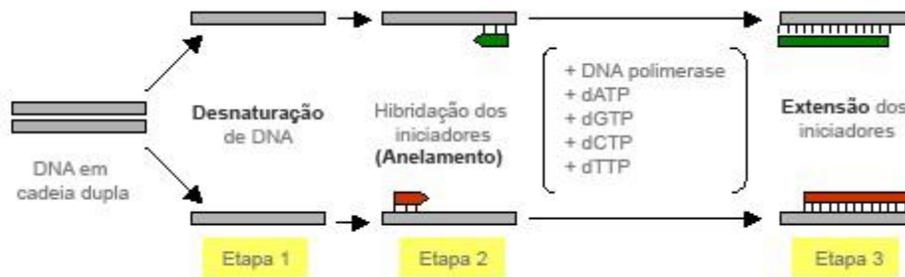
**Tabela 4:** Classificação de Papanicolau, Bethesda e NIC para – Interpretações e orientações. (modificado a partir de Burd et al. 2003) e <http://www.prevencaodecancer.com.br>

Classificação			Interpretação	Orientação
<i>Papanicolau</i>	<i>Sistema Bethesda</i>	<i>Sistema NIC</i>		
Classe I	Negativo para células neoplásicas	Normal	Normal	Repetir exame em 1 ano ou conforme orientação médica.
Classe II	Inflamatório		Característico da 2ª fase do ciclo ou corrimento	Repetir exame em 1 ano ou conforme orientação médica e tratar inflamação se necessário.
Atipia celular escamosa	ASCUS - atipias de células escamosas de caráter desconhecido		Leve suspeita de alteração	Colposcopia e biópsia dirigida definirão o tratamento
Atipia celular glandular	AGUS - células glandulares atípicas	NIC 1	Suspeita de alteração	Colposcopia e a biópsia dirigida que definirá o tratamento. Em caso de menopausa, investigar o endométrio.
Classe III	LSIL - lesão intra-epitelial de baixo grau	NIC 2/ 3	Alterado	Colposcopia e biópsia dirigida definirão o tratamento
	HSIL - lesão intra-epitelial de alto grau		Alterado	Idem
Classe IV	HSIL - lesão de alto grau		Alterado	Idem
Classe V	Suspeita de câncer	Carcinoma celular escamoso invasivo, Adenocarcinoma	Alterado	Idem

O INCA (2010) reconhece o teste citológico de Papanicolau como muito efetivo no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo do colo do útero. Porém, a incidência da doença mantém-se como uma das mais altas entre as neoplasias malignas que ocorrem em mulheres brasileiras.

A PCR é uma técnica baseada na amplificação enzimática de segmentos específicos de DNA (**Figura 10**) do HPV através de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) e polimerização com enzimas (DNA polimerase). A PCR realizada no diagnóstico do HPV pode ser de dois tipos: genérica e específica. No caso da PCR genérica, utilizam-se *primers* consensuais para detectar uma grande variedade de tipos de HPV em uma só amplificação, resultado do reconhecimento

da região conservada do genoma viral correspondente ao gene L1. A PCR específica é normalmente utilizada na genotipagem do vírus, pois se baseia nas variações presentes nos genes E6 e E7 de cada tipo de HPV, que apresentam variações nucleotídicas determinantes da patogenia viral (Magalhães *et al.*, 2008).



**Figura 10:** Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Modificado a partir de: [www.jornalufgonline.ufg.br/page.phpsite\\_id=242&noticia=1300114675](http://www.jornalufgonline.ufg.br/page.phpsite_id=242&noticia=1300114675)

A amplificação por PCR é considerada o método mais sensível para a detecção de DNA do HPV, sendo altamente reprodutível e de fácil acompanhamento (Depuydt *et al.*, 2007).

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a prevalência do HPV na população feminina de Olinda - PE, identificando os diferentes genótipos presentes.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a presença do HPV nas amostras cervicais coletadas de mulheres atendidas em Unidade de Saúde da Família no município de Olinda, Brasil;
- Avaliar o genótipo do HPV presente nas amostras positivas;
- Analisar a epidemiologia da infecção pelo HPV na comunidade de Olinda com ênfase nos genótipos de HPV encontrados.

## 4. Referências Bibliográficas

Albring L, Brentano JE, Vargas VRA. O câncer do colo do útero, o Papilomavírus humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas. Guarani: estudo de revisão. Revista Brasileira Análises Clínicas 2006;v. 38(2): 87-90.

Beltrão MFS. Estudo Clínico e Genético do Papilomavírus humano sorotipo 16. 2011.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J. Clin Virol. 2005;32 Suppl 1:S1-6.

Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human Papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. Int. J.Cancer 2006; 118: 1071-1076.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology 2010; 401, 70–79.

Bosch FX e De Sanjose S. Chapter 1: Human Papillomavirus and cervical cancer: burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr 2003;n.31, p.3-13.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human Papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin proteasome pathway. Cancer Res. 1996; 56: 4620–4624.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Departamento de Apoio à Descentralização. Coordenação-Geral de Apoio à Gestão Descentralizada. Diretrizes operacionais dos Pactos pela Vida, em Defesa do SUS e de Gestão. Brasília, 2006. 76p.

Bravo IG, de Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. Trends Microbiol. 2010; 18(10): 432-8.

Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 1-17.

Campo MS. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. Trends Microbiol 1995;3:92–97.

Cavalcanti SMB, Carestiato FN. Infecções causadas pelos Papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis 2006;18(1): 73-79, 2006.

Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995; 9; 2335–2349.

Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010; 118: 422–449.

Ciaran B, Woodman J, Stuart I, Young S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Can* 2007;7, 11-22.

Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human Papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 1999;274:2696-2705.

Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods* 2009; 156: 77–83.

Depuydt CE, Boulet GAV, Horvath CAJ, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med* 2007;Vol 11, No 4, pp. 881-891.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2005, 324(1):17-27.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1999;352:824-7.

Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Naphine S, Sterling J, Winter G and Griffin H. Characterization of events during the late stages of HPV-16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 1997;238, 40-52.

Doorbar J. The Papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32 (1): S7-15.

Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human Papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109(2):157-62.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998; 12: 2245–2262.

Esquenazi D, Filho IB, Carvalho MGC, Barros FS. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. *Jornal Brasileiro de otorrinolaringologia* 2010;76 (1): 78-84.

Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003;22:5201-5207.

Frappart L, Fontanière B, Lucas E, Sankaranarayanan R. *Cytopathology of the uterine cervix - digital atlas.* Lyon, 2006. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/atlasclassifbethesda.php>

Frattoni MG, Laimins LA. Binding of the human Papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:12398-12402.

Haller K, Stubenrauch F, Pfister H. Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human Papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* 1995;214:245–255.

Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuid A, Costa Clemens SA, Dubin G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow up from a randomized control trial. *Lancet.* 2006; 367(9518):1247-55.

Hausen HZ. Papillomaviruses and câncer: from basic studies to clinical application. *Nature Publishing Group* 2002;342-350.

Howley PM, Lowy DR. Pappilomaviruses and their replication. In: *Virology, Vol 2.* Fields BN, Knipe JB, Howley PM (eds). Lippincott/ The Williams & Wilkins Co: Philadelphia, PA: 2197-2229, 2001.

Howley PM, Lowy DR in *Fields Virology* (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 2299–2354 (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Portaria 2439. Política Nacional de Atenção Oncológica. 2005.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em: 10 set. 2010.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:  
[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=327](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327). Acesso em 04 de jul. 2011.

Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2, *Genes Dev.* 1997; 11: 2101–2111.

Kisseljov FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry* 2000; 65(1):68-77.

Leykauf K, Salek M, Schluter H, Lehmann WD, Alonso A. Identification of membrane proteins differentially expressed in human Papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 6):1427-31.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2):362-72.

Magalhães IM, Moysés N, Afonso LA, Oliveira LHS, Cavalcanti SMB. Comparação de dois pares de oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase para detecção de Papilomavírus Humanos em esfregaços cervicais. *DST – Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 2008; 20 (2): 93-98.

McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 1991; 266:18411-4.

McCance DJ. Transcriptional regulation by human papillomaviruses. *Curr Opin in genetics & development* 2005; 15:515-519.

Mistry N, Simonsson M, Evander M. Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal origin. *Virology Journal* 2007;4:27.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the Papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990; 250:1694-99.

Moody CA, Laimins LA. Human Papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews* 2010; 10: 550-60.

Motoyama S, Ladines-Llave CA. The role of human Papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004; 50 (1-2): 9-19.

Munoz N, Castellsague X, de Gonzales AB, Gissman L. Chapter 1: HPV in the etiology of human câncer. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3;S3:1-10.

Queiroz AMA, Cano MAT, Zaia JE. O Papilomavírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. Revista brasileira de análises clínicas (RBAC) 2007;v.39(2): 151-157.

Rama CH, Roteli-Martins C, Derchain SFM. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. Rev Saúde Pública 2008; 42(1): 123-130.

Sampaio LC, Almeida CF. Vitaminas antioxidantes na prevenção do câncer do colo uterino. Revista Brasileira de Cancerologia 2009; 55(3): 289-296.

Santos NSO. Introdução a Virologia Humana. Rio de Janeiro. 2002. 254 p.

Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, Das BC. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. Indian J Med Res 2009; 130:222-233.

Silva AMT, Amaral MVT, Cruz AD. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. Biotecnol Ciênc Desenvol 2003;29:48-54.

Simonetti AC, Melo JHL, Souza PRE, Bruneska D, Lima Filho JL. Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. Microbes and Infection 2009;11 435e442.

Stanley MA. Immune responses to human Papillomavirus. Vaccine 2005;24(S1):S16-S22.

Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. Gynecologic oncology 2010;117(2 Suppl): S5-10.

Stoler MH, Wolinsky SM, Whitbeck A, Broker TR, Chow LT. Differentiation linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. Virology 1989;172(1): 331–340.

Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. Oncogene. 1999; 18(53):7690-700.

UN Department of Economic and Social Affairs. The world population prospects: the 2008 revision. Disponível em:

<[http://www.who.int/pmnch/topics/2008\\_populationstats/en/index.html](http://www.who.int/pmnch/topics/2008_populationstats/en/index.html)>. Acesso em: 26 jun. 2010.

Vijayaraghavan A, Efrusy MB, Goodman KA, Santas CC, Huh WK. Cost effectiveness of using human papillomavirus 16/18 genotype triage in cervical cancer screening. Gynecol Oncol 2010; 119(2): 237-42.

Von Linsingen R. Polimorfismos de genes de citocinas e do gene MICA em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical. Tese na área de Genética da Universidade Federal do Paraná. 2008. 141p.

Werness BA, Levine J, Howley PM. Association of human Papillomavirus types 16 and 18 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-9.

Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human Papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 475–87.

Wilson R, Ryan GB, Knight GL, Laimins LA, Roberts S. The full-length E1<sup>E4</sup> protein of human Papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology* 2007; 362: 453-460.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2008. Lyon, 2008a. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 10 set. 2010.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2008b. Lyon: 2008b. Acesso em: 10 set. 2010.

World Health Organization. Information Centre on HPV and Cervical Cancer Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil, Fact Sheet 2010 (Set. 15, 2010)

Wright TC, Bosch FX, Franco EL, Cuzick J, Schiller JT, Garnett GP, Meheus A. Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer, conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine* 2006;v.24 Suppl 3, Aug 21, p.S251-61.

Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 1999;263:388–94.

zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1977;78: 1–30.

zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology* 2009a; 392(1):1-10.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account. *Virology* 2009b; 384(2): 260-265.

zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(2): 55-78.

# 5. Capítulo 1

1. TÍTULO: Genotyping of human papillomavirus in cervical samples of women with normal cytology.
2. AUTORES: Marek Henryque Ferreira Ekert, Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros, Rosângela Ferreira Frade de Araújo, Danyelly Brunaska Gondim Martins, José Luiz de Lima Filho.
3. REVISTA: International Journal of Infectious Diseases (impact factor 2.167)

.....  
**De:** International Journal of Infectious Diseases" <[ijid@elsevier.com](mailto:ijid@elsevier.com)>

**Data:** 28 de agosto de 2011 22:36

**Para:** [Marek.henryque@gmail.com](mailto:Marek.henryque@gmail.com)

**Assunto:** Manuscript number assigned IJID-D-11-00815

Manuscript Number: IJID-D-11-00815

Article Title: GENOTYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL SAMPLES OF WOMEN WITH NORMAL CYTOLOGY.

International Journal of Infectious Diseases

28 Ago 2011

Dear Mr Ekert,

Your submission entitled "Genotyping of human papillomavirus in cervical samples of women with normal cytology." has been received by the International Journal of Infectious Diseases

You will be notified shortly of the reference number assigned to your manuscript and the name of the Corresponding Editor who will be dealing with your paper

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijid/>.

Thank you for submitting your work to the International Journal of Infectious Diseases.

Kind regards,

International Journal of Infectious Diseases

\*\*\*\*\*

## **GENOTYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL SAMPLES OF WOMEN WITH NORMAL CYTOLOGY**

Marek Henryque Ferreira Ekert<sup>1 2\*</sup>, Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros<sup>1</sup>, Rosângela Ferreira Frade de Araújo<sup>1 2 3</sup>, Danyelly Brunaska Gondim Martins<sup>1 2 3</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>1 2 3</sup>.

<sup>1</sup>Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol), Laboratory of Immunopatology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratory of Immunopatology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

<sup>3</sup>Departament of Biochemistry - Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

**\* Corresponding:**

Molecular Biology Sector  
Laboratory of Immunopatology Keizo Asami (LIKA)  
Federal University of Pernambuco (UFPE)  
Campus Universitário, Cidade Universitária  
Recife - PE - Brasil  
CEP: 50670-901  
Phone: + 55 81 2126 8484  
Fax: + 55 81 2126 8485  
e-mail: [marek.henryque@gmail.com](mailto:marek.henryque@gmail.com)

## **ABSTRACT**

**Objectives:** The aim of this study was to genotype human papillomavirus present in cervical samples of women with normal cytology.

**Methods:** The cross-sectional study was conducted with 241 women from Olinda, Brazil. DNA samples were extracted from cells scraped from the cervix using a commercial kit. HPV infection was investigated by PCR using primers consensus MY09/11 and GP5+/6+. Cellular changes were viewed by the Pap test (Papanicolaou). The PapilloCheck HPV-DNA-chip screen was used to genotype the HPV present in biological samples.

**Results:** A cross-sectional study detected viral DNA in 23.23% of the samples, using consensus primers MY09/11 and GP5+/6+. They showed similar efficiency for both primers, despite the low agreement percentage (39.28%). Among low-risk, HPV6 was present in 17.30% of infections, followed by HPV11 with 9.61%. Among high-risk, HPV16, 45, 53 and 56 was present in 7.69%, each one. The percentage of samples with multiple infections was 19.23%, with HPV16 and 53 as the most prevalent genotypes (7.69%).

**Conclusions:** The high prevalence of genotypes HPV6, 11 and 16 contributes to the discussion on strategies for implementation of an HPV vaccine, thus improving the quality of health care and reducing public spending on treatment.

**Keywords:** Papillomavirus, PCR, genotyping.

## Introduction

With approximately 530.000 new cases per year worldwide, cervical cancer is the second most common cancer among women and is responsible for the death of 274,000 women per year. Its incidence is about two times higher in developing countries when compared to developed countries<sup>1</sup>. According to the National Cancer Institute (NCI), 18.430 new cases are expected to be diagnosed in Brazil in 2011 with an estimated risk of 18 cases per 100.000 women<sup>2</sup>. Human papillomavirus (HPV) is responsible for causing various epithelial lesions, infecting cutaneous and mucosal epithelia, and causing benign lesions from carcinomas<sup>3</sup>. It is already established the role of HPV as the promoting factor for cervical cancer, and it is now known that HPV can also be detected in cancer of the eye, head and neck, pharynx, larynx, skin, breast, finger and nail, lung, liver, stomach, bladder, colon, vagina, vulva, penis and anus<sup>4,5</sup>. Genomic organization of all HPV genotypes is similar, with ORFs in the same DNA strip. The viral genetic material is characterized by a double-stranded circular DNA with approximately 8,000 bp, consisting of eight genes: L1 and L2 encode capsid proteins, while E1, E2, E4, E5, E6 and E7 protein-coding is involved in replication, transcription and transformation. Moreover, there is a non-coding control region (LCR), varying in size among the papillomas, which

contains the sequence of replication origin (ORI) and most of the transcription promoters<sup>6</sup>.

More than 150 HPV genotypes have been identified<sup>7</sup> and about 40 are related to anogenital infections. They can be classified according to risk of malignancy to the genital tract as high-risk (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 and 82) and low risk associated with benign genital and skin warts (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44)<sup>8</sup>.

Cervical cancer is the leading cancer among females in most developing countries, being a common cause of death among middle-aged women. Despite the use of the Pap test in these countries for early detection, there are still significant limitations that lead to errors in the collection, preparation and reading of cytological specimens<sup>9</sup>. The potential for direct detection of HPV in cervical samples was observed through the techniques of DNA amplification, hybrid capture and DNA microarray<sup>10</sup>. These molecular techniques provide an alternative approach to cervical screening and patient treatment. Developed countries began using HPV genotypes research on women over 30 years for cervical cancer screening, in association with cytology positive cases<sup>11</sup>. A reduction in incidence rates and mortality from cervical cancer has been observed in these countries in recent years. This is mainly due to modern screening programs in systematic risk populations<sup>12</sup>. A

reduction in mortality over the next 10 years will be related to the expansion and improvement of diagnosis, screening and treatment of precursor lesions and cancers<sup>13</sup>, especially in populations with higher incidence of this cancer. Therefore, the introduction of new diagnostic approaches, which are more sensitive and specific, based on molecular biology, can provide fast and accurate results. This technique will be deployed in cytopathology laboratories to aid diagnosis confirmation<sup>14</sup>. Genotypic differences are important in an era of HPV vaccination. Current vaccines such as the quadrivalent vaccine offer protection against HPV16, 18, 6 and 11 directly with suggestive evidence of cross-protection against HPV 45 and 31, but no protection against other genotypes<sup>15</sup>. Therefore, in view of the social and economic importance of the topic, this study examined the prevalence of HPV in the female population of Olinda - PE, a touristic city in Brazil Northeast, identifying the different genotypes that may contribute to the precursor lesions in woman in order to contribute to the discussion on the implementation of vaccination programs against HPV in the Unified Health System.

## **Materials and Methods**

Study population and sample collection

A total of 241 women, seen between April and June 2011 were included in the study. Gynecological samples were collected from the uterine ectocervix and endocervix using an Ayre spatula and cervical brush. Both were used for slide preparation and once identified, the slides were immersed in absolute ethyl alcohol for fixation and sent for Pap staining and analysis. Cervical brush containing cell samples were stored and transported in pH 7.0 PBS Buffer (Invitrogen®) at 10°C to prevent cell degradation. The exclusion criteria were: women younger than 18 years and above 60 years, hysterectomized patients, HIV positive and pregnant women, according to CEP/CCS/UFPE No. 275/08.

#### Extraction of DNA samples

Genomic DNA was extracted from cervical cells using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®) following the manufacturer's instructions.  $\beta$ -globin gene was used as the reporter gene to ensure the quality of DNA extraction from biological samples, amplifying a region of 268pb with specific primers (Fw: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' and Rv: 3'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-5'). The amplification was prepared for the final volume of 12.5 $\mu$ L containing: 1 $\mu$ L DNA extracted, 1 $\mu$ L of each primer (10pmoles), 3.25 $\mu$ L ultrapure water and 6.25 $\mu$ L GoTaqGreen of Master Mix (Promega®). The PCR conditions were: initial

denaturation for 10 min at 94°C followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 62°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The final extension step was performed at 72°C for 7 min. Ultrapure water was used as a negative control reaction and DNA extracted from human blood was used as the positive control.

#### Genome amplification and HPV identification

Identification of the presence of HPV in the DNA extracted from samples was PCR was carried out using consensus primers MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAACTGATC-3'/5'-GCMCAGGGCATAAYAATGG-3') that amplify a fragment of 450 bp from L1 gene, beyond the primers GP5+/6+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'/5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') that amplify a fragment of 150 bp from the same gene. The final volume of the reaction was 12.5µL containing: 1µL DNA extracted, 1µL of each primer (10pmoles), 3.25µL ultrapure water and 6.25µL GoTaqGreen of Master Mix. Amplification conditions were performed as follows: (i) 94°C for 3 minutes, (ii) 34 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing for 1 min and extension at 72°C for 1 minute, (iii) final extension at 72°C for 10 min. MY09/11 primers annealed at 55°C, whereas GP5+/6+ annealed at 45°C. The positive control used was pBR322.HPV16

plasmid, while for negative control it was used ultrapure water. Amplicons were visualized in 1% agarose gel electrophoresis containing 5µl ethidium bromide (1mg/ml) under ultraviolet light.

### Cytopathological analysis

Slides were stained for Papanicolaou analysis and results were categorized using the 2001 Bethesda System Nomenclature, as follow: Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy in the material analyzed, including (within normal limits, benign reactive cellular changes and inflammation), atypical squamous or glandular intraepithelial lesions, low grade Squamous (LSIL) or high grade Squamous (HSIL) and squamous cell carcinoma or adenocarcinoma<sup>16</sup>.

### HPV genotyping

The PapilloCheck® HPV-DNA-chip screen was used for the genotyping of HPV present in biological samples from the amplification of a region of 350 pb HPV E1 gene by 24 pairs of type-specific probes, to identify six low-risk HPV genotypes (06, 11, 40, 42, 43, 44/55) and 18 high-risk HPV genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82).

## Statistical analysis

The statistical analysis was performed in GraphPad Prism 5.00 for Mac, GraphPad Software (San Diego, California, USA), including Fischer Test. Values of  $p < 0.001$  were considered statistically significant.

## Results

The sample comprised 241 patients, with similar age distribution ranging from 21 to 30% (Table 1). There was a predominance of women with one or two sexual partners (50.22%) and with two children (21.57%). Most women underwent tubal ligation (41.90%) and condom use during intercourse was surprisingly low (14.10%).

Among the cervical DNA subjected to PCR for HPV, 56 samples (23.23%) were described as positive and 185 (76.77%) showed negative results for this technique. Considering the age factor related to the characteristics of the 56 women with a HPV DNA presence in the cervix, the highest percentage of infection was observed in patients between 26 and 35 years (32.20%), but without significant statistical value.

Table 1: Characteristics of age and sex of patients seen between April and June 2011.

Parameter	Number of Patients Total	%	Number of Patients Infected	%
<b>Age group</b>				
18 - 25 yrs	53	21,99%	16	27,11%
26 - 35 yrs	70	29,06%	19	32,20%
36 - 45 yrs	66	27,38%	15	25,44%
46 - 60 yrs	52	21,57%	9	15,25%
<b>Sexual Partners</b>				
1 to 2*	121	50,22%	21	35,59%
3 to 4	64	26,55%	18	30,52%
5 or more	56	23,23%	20	33,89%
<b>Contraception</b>				
Condom	34	14,10%	8	13,55%
Pill	41	17,01%	12	20,33%
Injection*	22	9,12%	13	22,03%
Tubal Ligation	101	41,90%	20	33,89%
None	40	16,59%	6	10,16%
Others	8	3,31%	0	0,00%
<b>Parity</b>				
None	26	10,78%	4	6,77%
One	46	19,08%	17	28,81%
Two	52	21,57%	9	15,25%
Three	47	19,50%	10	16,94%
Four	26	10,78%	6	10,20%
Five or more	44	18,25%	13	22,03%
<b>Smokers</b>				
Yes	59	24,48%	18	30,50%
No	182	75,52%	41	69,50%

P value: <0.001.

According to the type of contraceptive method, 33.89% had underwent tubal ligation, but without statistical significance ( $p > 0.001$ ). Contraceptive injection was the second method most widely used, considered a significant risk factor for HPV infection ( $p = 0.0003$ , OR = 5.432, RR = 2.813), as observed in 22.03% of infected women.

Regarding the number of sexual partners, 35.59% infected women had one or two partners during their lifetime, characterized as a protective factor against viral

infection ( $p = 0.0003$ ; OR = 0.3220, RR = 0.4267). Regarding parity, the highest percentage of positivity for HPV was observed in patients who had only one child (28.81%), followed by five or more children (22.03%), but without significant value.

Assessing consensus primers for HPV positivity, we found a similar pattern in this cross-sectional cohort identification. MY09/11 revealed a positivity of 15.35% while the primer GP5+/6+ showed a slightly higher positivity of 17.01%. However, the correlation of positivity between them was only 39.28%.

Among 56 samples positive for HPV-DNA, 52 showed normal cytology despite 18 different HPV genotypes had been detected, being 57.69% high-risk HPV and 38.48% low-risk HPV, in single or multiple infections. Considering only high-risk genotypes, HPV16, 45, 53 and 56 showed similar rates (7.69%) in the samples tested. HPV18 was not observed in any sample analyzed, as well as genotypes 33, 40, 51, 70 and 82 (Table 2).

Table 2: Distribution of HPV genotypes among the 52 negative samples by Pap smear.

HPV Genotypes	Single Infections	Multiple Infections	Total	Percentage
16	1	3	4	7,69
18	0	0	0	0
45	4	0	4	7,69
31	0	2	2	3,84
33	0	0	0	0
52	1	2	3	5,76
58	1	0	1	1,92
35	1	0	1	1,92
59	0	1	1	1,92
56	2	2	4	7,69
51	0	0	0	0
39	0	1	1	1,92
68	0	2	2	3,84
73	2	0	2	3,84
82	0	0	0	0
53	1	3	4	7,69
66	0	1	1	1,92
70	0	0	0	0
6	7	2	9	17,3
11	5	0	5	9,61
40	0	0	0	0
42	0	1	1	1,92
43	1	1	2	3,84
44/55	1	2	3	5,76
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>23</b>	<b>50</b>	
<b>Multiple Infections</b>			<b>10</b>	<b>19,23</b>

HPV6 was present in 17.30% of the samples tested, while HPV11 showed 9.61% frequency.

We also observed that 19.23% of samples showed multiple infections with two or three viral genotypes, with HPV16 and 53 being the most prevalent (7.69%). Otherwise, the prevalence of negative analysis by Papillocheck® was 30.84%

(Figure 1), a high percentage considering sampling already identified as HPV+ by MY09/11 and GP5+/6+.

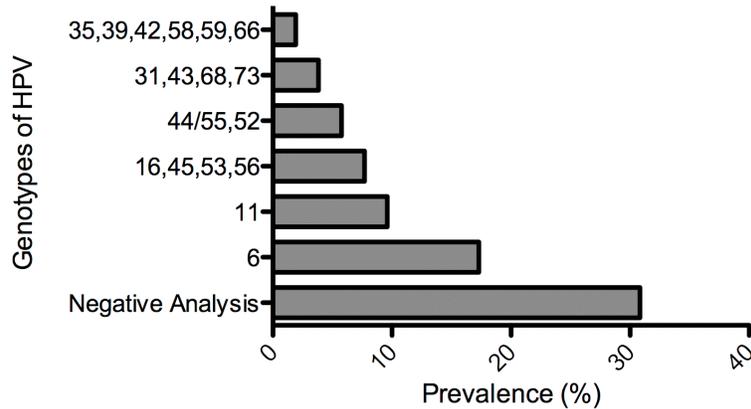


Figure 1: Most prevalent HPV genotypes in women without cervical lesion.

Among the sample of 241 patients, 7 showed varying degrees of cervical injury, 57.14% aged between 18 and 25 and none of them using condom during sexual intercourse. We observed that 57.14% of women had five or more partners throughout their lives.

Four samples were identified as HPV-DNA by PCR, but two HSIL samples and one ASCUS have not been identified as positive by MY09/11 or GP5+/6+. Genotyping of these samples showed HPV16 as the most prevalent in association with high-grade lesions (Table 3).

Table 3: Cervical lesions associated with HPV genotype, age and number of partners.

<b>CYTOLOGY INJURY</b>	<b>GENOTYPES</b>	<b>AGE</b>	<b>PARTNERS</b>
ASCUS	HPV52, 66, 82 Negative	18	5 or more
HSIL	analysis	37	5 or more
HSIL	HPV16	26	5 or more
HSIL	HPV16	23	3 to 4
HSIL	HPV, 52, 56, 68	60	1 to 2
LSIL	HPV6,11	24	3 to 4
LSIL	HPV35	19	5 or more

HPV66 and 82, considered as high-risk, were associated with atypical cells, conferring a risk of progression to cervical injury. HPV6, 11 were associated with low-grade lesions, as expected. However, HPV35 was present in single infection in LSIL, despite being high-risk type. Only one sample with abnormal cytology was found as negative for PCR and microarray, which may be related to the spontaneous development of lesions without viral involvement.

## **Discussion**

The risk factor can contribute in many different ways to HPV infection and cervical cancer development. Women with 26 – 35 years come to be monitored more rigorously, since the regression of HPV infection is less common after 30 years<sup>17</sup>. Prolonged use of oral contraceptives also could increase the risk of developing cervical cancer, since they contain hormones like dexamethasone,

progesterone and estrogen that enhance HPV gene expression<sup>18</sup>. However, a study with 610 women in Recife showed no association between hormonal contraceptive use and HPV infection<sup>19</sup>.

Women with the highest number of sexual partners did not display a high HPV infection rate in our study, despite a risk factor of invasive cervical cancer<sup>20</sup>. However, the sexual behavior of the partner may interfere with the demonstration of this association<sup>21</sup>. Despite no significance for pregnancy had been found in our study, history of seven or more pregnancy terms represents a 3.8 times greater risk of squamous cell cancer, according to a multicenter case-control study with cervical carcinoma in four continents<sup>22</sup>.

The positive values founded with the molecular method are similar to the national prevalence, which is around the world 10% - 15%<sup>23</sup>. However, research for HPV infection may involve several parameters, being most evident according to the methodology employed. The sensitivity and specificity of the PCR method may vary depending on the primers, the size of the amplicon, the condition of the reaction and the spectrum of HPV infection types<sup>24</sup>. The type of sample can also influence the efficiency of the PCR amplification.

A study conducted with 452 Albanian women using primers GP5+/6+ and MY09/11 to found 15% HPV-DNA<sup>25</sup>. However, a study conducted in Estonia with

845 women from 18 to 35 years, found 38% positivity using MY09/11<sup>26</sup>. GP5+/6+ primers were able to detect HPV-DNA in 99.7% of cervical lesion NIC3<sup>27</sup>. In squamous cell carcinoma from lip, MY09/11 and GP5+/6+ detected around 45.5% HPV, with no statistical difference between the two primers used<sup>28</sup>.

In South Africa, 159 women from Pretoria with normal cytology showed a higher prevalence of HPV16, being the most commonly genotype found<sup>29</sup>. In Spain, 496 women from Barcelona showed 68% prevalence using LIPA-HPV Genotyping, which allows the identification of 26 HPV genotypes<sup>30</sup>. In a population of 99 Thai women with invasive cervical cancer, found a higher prevalence of HPV16 (80.2%), followed by genotypes 52 (10.4%) and 18 (68.3%)<sup>31</sup>.

The frequency of different HPV genotypes can vary according to geographic distribution, mainly in country with continental dimensions. HPV16 was the high-risk genotype most frequent in all samples analyzed, but HPV18, described as the second most prevalent genotype in the country and the world<sup>23</sup>, was not found in any sample in our study. Otherwise, our study was the first to evidence HPV45, 53 and 56 with high frequency in normal cervical samples in Brazil. In Recife, it was already found high prevalence of HPV16, varying from 47.2% to 78% according to the study, followed by genotypes 31 and 33 in a population attended at reference center<sup>19,32,33</sup>. In Natal, analysis with HSIL samples revealed HPV16 (60.5%) as the

most prevalent, followed by 18 (10.5%) and 58 (7.4%)<sup>34</sup>. In 214 young women from Rio de Janeiro described the prevalence of HPV16 (6.2%), followed by HPV31 (4.1%) and HPV66 (3.7%)<sup>35</sup>. In samples of 104 women from Minas Gerais had previously reported a higher prevalence of HPV6 and 16 (47.1%) followed by HPV11 (19.5%)<sup>36</sup>. Another study with 98 women from southern Brazil also found HPV16 (9.2%) as most prevalent followed by HPV18 (3.1%), but HPV6 and 11 could not be identified in the samples<sup>37</sup>. These data demonstrate that HPV16 is, indeed, the most frequent genotype in Brazil, as observed worldwide. However, genotype 18 cannot be considered the second most common throughout Brazil, despite being in this position on worldwide prevalence scale. Therefore, these evidences should be considered together to provide a profile of infection in a given country.

The occurrence of HPV45, 53 and 56 was observed in some studies in North America and Asia, with HPV53 (1.1%) in the second position and HPV56 (0.8%) as fifth most prevalent, respectively<sup>38</sup>. HPV53 was the fourth most prevalent genotype (10.2%) in a study of 1.5 million women with LSIL, worldwide. In the same study HPV 56 was the fifth most prevalent genotype (9.5%)<sup>39</sup>.

The possibility of multiple infections in the samples is another factor that influences the efficiency of HPV infection. The value of 19.23% multiple infections with two or three HPV types is lower than other studies, probably due to the nature

of the samples, once we observed in normal cytology patients. Multiple infection rate was observed at 49.7% among 213 Italian women, comprising between two and five types of HPV, with HPV16 and 53 being the most prevalent (7.69%)<sup>40</sup>.

In a study of 57 women from Indonesia, HPV18 was the most prevalent (31.81%) when associated with multiple injuries, followed by HPV16 (27.27%). In this study, no relationship was found between HPV53 and multiple infections<sup>41</sup>. Otherwise, the most frequent association between multiple infections were HPV16 with 53 (11 patients) in 496 women with HSIL from Barcelona<sup>30</sup>.

When a high-risk HPV is found as a single agent or in combination with one or more low-risk HPV, it is assumed to be the cause of cellular changes. However, when more than one type of high-risk HPV is found in the same specimen, it is not possible to conclude which of the types is responsible for cell transformations<sup>42</sup>.

Current vaccines, such as quadrivalent offers protection against HPV16, 18, 6 and 11 directly, with evidence suggestive of cross protection against HPV31e 45, but no protection against other genotypes<sup>15</sup>.

The negative results found in PapilloCheck® analysis with HPV+ samples can portray viral genotypes that are not recognized by the DNA-based chip. Primers GP5+/6+ show low efficiency for HPV53 and HPV61<sup>43</sup>, as well as MY09/11 displays a low sensitivity for HPV35, 51, 68 and 45<sup>44,45</sup>. On the other hand, they are able to

recognize HPV13, 30, 32, 34 and 61, which are outside the range of sensitivity of Papillocheck®<sup>43</sup>. These findings indicating the necessity of further studies in this HPV infected region, once it could change the infection profile of HPV in cervical smears.

These findings may have strong effects on clinical and epidemiological studies for HPV, influencing the false negative samples without apparent injury. Therefore, the use of genotyping tests can be more advantageous to predict the efficiency of HPV vaccine according to the circulating virus genotype. Therefore, genotypes prevalent in one region may have little or no involvement in cervical infections of other locations, mainly because it could influence the effectiveness of a HPV vaccine.

## **Conclusions**

The high prevalence of oncogenic genotypes HPV16, 45, 53 and 56 in addition to low-risk HPV6 and 11 shows that the distribution profile of HPV in Brazil may not be the same in all regions, or even in all public health centers in a given state. Further studies may encourage the expanded production of a vaccine with the aim of reducing the incidence of cervical cancer and thus improving the quality of health care, while simultaneously reducing public spending on treatment.

## **Acknowledgments**

City Hall Olinda for partnership, and FACEPE and CNPq for financial support.

## **References**

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2008b. Lyon: 2008b. Acesso em: 10 set. 2010.
2. Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.
3. Hausen ZH. Papillomaviruses and câncer: from basic studies to clinical application. Nature Publishing Group 2002; 342-350.
4. Hausen ZH. Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account. Virology 2009; 384(2): 260-265.
5. Beltrão, MFS. Estudo Clínico e Genético do papilomavírus humano sorotipo 16. 2011.
6. Esquenazi D, Filho IB, Carvalho MGC, Barros FS. A freqüência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. Jornal Brasileiro de otorrinolaringologia 2010; 76 (1): 78-84.

7. Bravo IG, de Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 2010; 18(10): 432-8.
8. Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods* 2009; 156: 77-83.
9. Gontijo RC, Derchin SFM, Martins CR, Sarian LOZ, Bragança JF, Zeferino LC. Avaliação de métodos alternativos à citologia no rastreamento de lesões cervicais: detecção de DNA-HPV e inspeção visual. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia* 2004; 26 (4): 269-275.
10. Albrecht V, Chevallier A, Magnone V, Barbry P, Vandebos F, Bongain A. Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA microarrays. *J Virol Methods* 2006;137:236-44.
11. Baseman JG, Kulasingam SL, Harris TG, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C. Evaluation of primary cervical cancer screening with an oncogenic human papillomavirus DNA test and cervical cytologic findings among women who attended family planning clinics in the United States. *Am J ObstetGynecol.* 2008;199(1):26.e1-8.
12. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer: burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; n.31, p.3-13.

13. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. World CancerReport 2002.Acessoem: 10 set. 2010.
14. Carmo EFS, Fiorini A.Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. Revista de saúde e biologia 2007; v. 2, n. 1 p. 29-31.
15. Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16,and 18)L1 virus like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic non vaccine HPV type singenerally HPV- naïve women aged 16–26 years. J Infec tDis 2009;199:926–35.
16. Solomon D, Nayar R. Sistema Bethesda para CitopatologiaCervicovaginal: definições, critérios e notas explicativas. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 192p.
17. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer GynecolOncol2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
18. Albring L, Brentano JE, Vargas VRA. O câncer do colo do útero, o papilomavírus humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas. Guarani: estudo de revisão. Revista Brasileira Análises Clínicas 2006; v. 38(2): 87-90.
19. Mendonça VG, Guimarães MJB, Lima Filho JL, Mendonça CG, Martins DBG, Crovella S, Alencar LCA. Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem

viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. Rev Bras Ginecol Obstet 2010; 32(10):476-85

20. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (ICESCC). Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. Int J Cancer 2007;120(4):885-91.

21. Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Clifford GM. Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(2):326-33.

22. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002;359(9312):1093-101.

23. World Health Organization. Information Centre on HPV and Cervical Cancer Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil. Fact Sheet 2010.

24. Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human Papillomavirus types

6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *British Journal of Cancer* 2006;95: 1459 – 1466.

25. Filipi K, Tedeschini A, Paolini F, Celicu S, Morici S, Kota M, Bucaj E, De Marco F. Genital Human Papillomavirus Infection and Genotype Prevalence Among Albanian Women: A Cross-Sectional Study *Journal of Medical Virology* 2010; 82:1192–1196.

26. Uusküla A, Kals M, Kosenkranius L, MCnutt LA, Dehovitz J. Population-based type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in Estonia. *BMC Infectious Diseases* 2010;10: 63.

27. Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, Charoensri N. Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand *International Journal of Infectious Diseases* 2009; 13, 212-219

28. Demathe A, Bernabé DG, Garcia JF, Nunes CM, Miyahara GI. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermóide de lábio. *Jornal Brasileiro de patologia médica* 2010; v. 46 n.02 p. 85-90.

29. Said HM, Ahmed K, Burnett R, Allanc BR, Williamson AL, Hoosen AA. HPV genotypes in women with squamous intraepithelial lesions and normal cervixes

participating in a community-based microbicide study in Pretoria, South Africa. *Journal of Clinical Virology* 2009;44; 318–321.

30. Selva L, Gonzalez-Bosquet E, Rodriguez-Plata MT, Esteva C, Suño M, Muñoz-Almagro C. Detection of human papillomavirus infection in women attending a colposcopy clinic. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; 64: 416–421.

31. S Siriaunkgul, S Suwivat, J Settakorn, S Khunamornpong, K Tungsinmunkong, A Boonthum, V Chaisuksunt, S Lekawanvijit, J Srisomboon, PS Thorner. HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand - Adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. *Gynecologic Oncology*, Volume 108, Issue 3, March 2008, Pages 555-560.

32. Baldez da Silva MFPT, Chagas BS, Guimarães V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL, Stocco RC, Crovella S, Freitas AC, Beçak W. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res* 2009; 8 (4): 1437-1443.

33. Guimaraes V, Guimaraes R, Brandão L, Baldez da Silva MFPT, Milanese M, Segat L, Castelletti H, Brunaska D, Lima Filho JL, de Freitas AC, Arraes LC, Rocha C, Crovella S. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-

risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Human Immunology* 2008;69, 273–278.

34. Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MGF, Fernandes TAAM, Azevedo PRM, Sobrinho JS, Prado JCM, 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.

35. Oliveira LHS, Ferreira MDPL, Augusto EF, Melgaço FG, Santos LS, Cavalcanti SMB, Rosa MLG. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic Young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil .*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* jan-fev, 2010;43(1):4-8.

36. Zimmermann JB, de Melo VH, Reis LL, de Matos LG, Couto BCS, Alves MJM. A multiplicidade do Papilomavírus humano na cérvix uterina de pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana e sua interação na neoplasia intra-epitelial cervical. *HU Revista, Juiz de Fora* 2208; v. 34, n. 3, p. 161-166.

37. Entiauspe LG, Teixeira LO, Mendoza-Sassi RA, Gonçalves CV, Gonçalves P, de Martinez AMB. Papilomavírus humano: prevalência e genótipos encontrados em mulheres HIV positivas e negativas, em um centro de referência no extremo Sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* mai-jun, 2010;43(3):260-263.

38. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. HPV Centre. 2009.
39. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human Papillomavirus Genotype distribution in low-grade cervical lesions. Comparison by Geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1157 – 1164.
40. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Vallonciniand B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Research* 2007;v.125, Issue 2, p:176-182.
41. Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S, Peters LAW, Fleuren GJ. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecologic Oncology* 2004;93;49–53.
42. Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS* 2009; 117: 108–14.
43. Husman AMR, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology* 1995; 76, 1057 1062.

44. Depuydt CE, Boulet GAV, Horvath CAJ, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007;Vol 11, No 4, pp. 881-891.
45. Burk RD, Ho GYF, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual practices and partner selection are the predominant risk factors for genital HPV infection in young women. *J Infect Dis* 1996;174: 679–689.

## 6. Conclusões e Perspectivas

Os dados apresentados neste trabalho dão uma indicação do estado do HPV em uma área com uma alta incidência de câncer cervical. Foi encontrada uma alta prevalência dos genótipos HPV16, 52, 6 e 11. Este achado favorece a inserção de futuros programas de prevenção, como por exemplo a implementação de uma vacina, já disponível, que inclui quatro genótipos virais (HPV16, 18, 6 e 11), melhorando assim, a qualidade da assistência à saúde, além de reduzir os gastos públicos com tratamentos.

Os métodos de genotipagem podem ser utilizados para o rastreamento do câncer cervical e para a identificação dos genótipos presentes em infecções persistentes, bem como para o monitoramento da eficácia de vacinas contra o HPV.

O Brasil é um país de dimensões continentais, dotado de uma população geneticamente diversificada. Para uma visão mais detalhada da prevalência dos inúmeros genótipos do HPV, principalmente os potencialmente carcinogênicos, pesquisas futuras devem incluir mais áreas de abrangência e uma maior quantidade de participantes.

# 7. Informações Complementares

Trabalho aceito para o XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia e de La Sociedad Latinoamericana de Patologia.



Promoção e Realização



Sociedade Brasileira de Patologia

Sociedad Latinoamericana de Patologia

São Paulo, 15 de AGOSTO de 2011.

Dr(a). MAREK HENRYQUE FERREIRA EKERT

**Ref:**

**Autores:**

Ekert,MHF; Nunes,MJG; Silva,KMP; Camaroti,JRSL; Peres,AL; Pontes-Filho,NT; Bruneska,D; Lima-Filho,JL

**Caro(a) Colega,**

A Comissão Científica do **XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia** e do **XXVIII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patologia** têm o prazer de comunicar que o trabalho:

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DO TESTE MOLECULAR PARA HPV FRENTE AO EXAME CITOPATOLÓGICO CONVENCIONAL NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**

Foi selecionado para apresentação na forma de **PÔSTER**.

Cada pôster deverá estar dentro do tamanho 0,90 x 1,20 e ter nas duas extremidades suporte de madeira ou tubo de plástico rígido. Na parte superior deverá ter um cordão preso ao suporte, para que o pôster possa ser dependurado. Não será possível afixar pôster com fita crepe ou alfinetes.

Em breve você receberá informações sobre dia e horário de fixação e apresentação de seu trabalho.

Gostaríamos de agradecer pela sua valiosa contribuição e motivação para enriquecer o nosso Congresso.

Atenciosamente,

Dr. Henrique de Oliveira Costa  
Presidente  
XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia

Dr. Fernando Augusto Soares  
Presidente  
XXVIII Congreso de la Sociedad  
Latinoamericana de Patologia

## 8. Anexos

### 8.1 Código dos nucleotídeos que apresentam ambiguidade – IUPAC

Y = T ou C (pirimidina)

R = G ou A (purina)

M = A ou C (amino)

K = G ou T (keto)

S = G ou C (interação forte: 3 pontes de H)

W = A ou T (interação fraca: 2 pontes de H)

B = G ou T ou C (não é A)

V = G ou C ou A (não é T, não é U)

D = G ou A ou T (não é C)

H = A ou C ou T (não é G)

N = G ou A ou T ou C (nucleotídeo desconhecido)

## 8.2 Questionário padronizado para obtenção de informações sócio-demográficas, comportamentais, nutricionais e reprodutivas das pacientes.

		Cod. Pronex	
<b>1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO</b>		<b>DATA:</b>	
Local de coleta	Grupo do participante (preenchimento posterior)		
Número do prontuário	<input type="checkbox"/> controle	<input type="checkbox"/> caso	
<b>2. INFORMAÇÕES PESSOAIS</b>			
Nome			
Data de nascimento	Idade	Sexo: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	
Endereço Atual			
Bairro	Cidade		
Município	UF	CEP:	
Zona <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/> Rural	Tempo de residência atual:		
Telefone			
Proximidades: <input type="checkbox"/> mineradora <input type="checkbox"/> arte c/ pedra sabão <input type="checkbox"/> fábricas/indústrias <input type="checkbox"/> outros			
Residência anterior:			
Bairro:	Cidade:	UF:	
Zona:	Tempo de residência:		
Proximidades: <input type="checkbox"/> mineradora <input type="checkbox"/> arte c/ pedra sabão <input type="checkbox"/> fábricas/indústrias <input type="checkbox"/> outros _____			
<b>3. SITUAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA</b>			
Etnia <input type="checkbox"/> branca <input type="checkbox"/> parda <input type="checkbox"/> preta <input type="checkbox"/> amarela <input type="checkbox"/> indígena			
Situação conjugal: <input type="checkbox"/> solteira <input type="checkbox"/> casada <input type="checkbox"/> viúva <input type="checkbox"/> separada <input type="checkbox"/> união consensual (estável)			
Qual a sua escolaridade: <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> NS/Recusa			
<input type="checkbox"/> Fund. menor incompleto <input type="checkbox"/> Fund. menor completo			
<input type="checkbox"/> Fund. maior incompleto <input type="checkbox"/> Fund. Maior completo			
<input type="checkbox"/> Médio incompleto <input type="checkbox"/> Médio completo			
<input type="checkbox"/> Superior incompleto <input type="checkbox"/> Superior completo			
Profissão: _____ Tempo: _____ CBO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Sua principal ocupação? _____ Tempo: _____ CBO <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
(Por Exemplo: Motorista de ônibus, mecânico de automóveis, Office boy, auxiliar de pesquisa, veterinária, etc.)			
Onde a Sra. trabalha? _____			
(Ex: Oficina de automóveis, escritório de contabilidade, veterinária, restaurante, etc.) COD <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Qual foi a ocupação que a Sra. teve por mais tempo? _____			
(Por exemplo: Auxiliar de escritório, arquiteta, enfermeira, bombeiro hidráulico, etc.) COD <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
-----			
A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho, em que ficava em contato com produtos químicos?			
<input type="checkbox"/> não			
<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> NS/NR			
Que tipos de Produtos Químicos?			
<input type="checkbox"/> Tintas	<input type="checkbox"/> Combustíveis/lubrificantes	<input type="checkbox"/> preservativos de madeira	
<input type="checkbox"/> Solvente	<input type="checkbox"/> inseticidas, pesticidas e herbicidas	<input type="checkbox"/> Corantes e pigmentos	
<input type="checkbox"/> Resinas	<input type="checkbox"/> ácidos e cáusticos fortes	<input type="checkbox"/> produto para fabricação de plásticos	
<input type="checkbox"/> produto para fabricação de borracha	<input type="checkbox"/> NS/NR		
<input type="checkbox"/> Outros produtos químicos _____ (especifique)	COD <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> (cód. Posterior)		

**A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com metais pesados, como cromo, cádmio, níquel ou outros?**  
 não  sim  NS/NR

**Que tipo de metais pesados?**  
 Cromo  Cádmio  Níquel  Mercúrio  Chumbo  NS/NR  
 Outros metais pesados \_\_\_\_\_ (especifique) COD  (cód. Posterior)

**A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com algum tipo de radiação?**  
 Não  Sim  NS/NR

**Que tipo de radiação?**  
 Solar  Raio X e outras radiações ionizantes  NS/NR  
 Outras radiações \_\_\_\_\_ (especifique) COD  (cód. Posterior)

**Contando com salário, pensão, aluguel, bico, etc., em que faixa de renda a Sra. se encaixa:**  
 Não tenho renda  Menos de 1 S.M.  De 1 a menos de 2 S.M.  
 De 2 a menos de 3 S.M.  De 3 a menos de 5 S.M.  De 5 a menos de 10 S.M.  
 De 10 a menos de 20 S.M.  De 20 a menos de 30 S.M.  De 30 a menos de 40 S.M.  
 De 40 a menos de 50 S.M.  50 S.M ou mais  NS/Recusa

**3.8 N° de pessoas no domicílio :**

**4. HISTÓRIA SEXUAL E REPRODUTIVA**

**Relações Sexuais**  sim  não (pular para 5)

**Idade da primeira relação sexual** \_\_\_\_\_ **Número de parceiros** \_\_\_\_\_

**A Sra. está grávida ou amamentando?**  Sim, estou grávida  Não, não estou grávida/amamentando  
 Sim, estou amamentando  NS/NR

**Número de gestações** \_\_\_\_\_ **Idade da primeira gestação** \_\_\_\_\_

**Idade que nasceu o primeiro filho** \_\_\_\_\_ **Número de abortos** \_\_\_\_\_

**Número de partos** \_\_\_\_\_ **Normal** \_\_\_\_\_ **Cesária** \_\_\_\_\_

**5. HISTÓRICO CLÍNICO**

**Qual é a sua altura?** .  m  NS/NR

**Qual é o seu peso?**  Kg  NS/NR

**Com que frequência vai ao ginecologista?**  
 mensal  trimestral  semestral  anual  nunca  NS/NR

**Quando fez o último exame preventivo?**  
 menos de 1 ano  1 ano  mais de 1 ano  indeterminado  nunca  NS/NR

**A Sra já fez exame de Papanicolau?**  não  sim  NS/NR

**Qual foi o resultado?**  negativo  positivo  NS/NR

**Qual o seu método contraceptivo atual?**  não uso (pular para próximo)  NS/Recusa

ligadura de trompa  injeção  coito interrompido  DIU  outro  
 implante  tabelinha  camisinha feminina  pílula  
 espermaticida  preservativo  método do muco  diafragma  
 anel vaginal  adesivo  vasectomia do parceiro  pílula do dia seguinte

**Quanto tempo de uso?**  menos de 1 ano  mais de 1 ano  NS/NR

**A Sra. está na menopausa?**  não  sim  NS/NR

**A Sra. utiliza medicação para menopausa?**  não  sim  NS/NR

**Qual o tipo?**  hormonal  químico  NS/NR

**Algum mal estar?**  não  tontura  fraqueza  náuseas  sonolência  
 coceira, Onde? \_\_\_\_\_  
 dor, onde? \_\_\_\_\_



**A Sra. continua em tratamento para este câncer?**  não  sim

**Por que a Sra. não está se tratando atualmente?**  
 Tratamento foi concluído  Abandonei  NS/NR  
 Outro \_\_\_\_\_ (especifique)

**A Sra. já fez algum tratamento radiológico pélvico?**  não  sim  NS/NR

**A Sra. já apresentou algum dos problemas abaixo?**  Não  NS/NR  
 infecção por HPV  corrimento  prurido  ardência  
 Clamídia  candidíase  gonorréia  sífilis  
 Outros \_\_\_\_\_ (especifique)

**Algum médico já lhe disse que a Sra. tem ou teve algumas das seguintes doenças?**  não

<input type="checkbox"/> Doença da coluna ou costas	<input type="checkbox"/> Artrite/Reumatismo (não infeccioso/Gota)
<input type="checkbox"/> Tendinite/LER (Lesão de esforço repetitivo)	<input type="checkbox"/> Ataque do coração
<input type="checkbox"/> Angina ou doença das coronárias	<input type="checkbox"/> Insuficiência cardíaca
<input type="checkbox"/> Derrame <input type="checkbox"/> Dengue	<input type="checkbox"/> Depressão <input type="checkbox"/> Enfisema
<input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Cirrose do fígado	<input type="checkbox"/> Hepatite <input type="checkbox"/> Tuberculose
<input type="checkbox"/> Malária <input type="checkbox"/> Hanseníase	<input type="checkbox"/> AIDS/SIDA <input type="checkbox"/> Outra _____

---

**6. HISTÓRICO FAMILIAR**

**Algum parente com doença crônica ?**  não  NS/NR  
 sim  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Qual doença? \_\_\_\_\_  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Qual doença? \_\_\_\_\_

**Algum parente com câncer ?**  não  NS/NR  
 sim  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Qual tipo? \_\_\_\_\_  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Qual doença? \_\_\_\_\_

---

**7. TABAGISMO**

**Fuma?**  não  
 fumava mas parei (*pular o próximo bloco*)  
 sim

**Há quanto tempo fuma?**  anos  meses  NS/NR  
**Qual tipo de cigarro?**  
 de palha  com filtro  sem filtro  charuto  cachimbo  indiano

**Quantidade por dia?**  
 1 a 3  4 a 6  7 a 10  mais de 10  Maço  outro Qual? \_\_\_\_\_

**Quanto tempo depois de acordar a Sra. fuma o primeiro cigarro?**  
 Nos primeiros 5 minutos  De 6 minutos a 30 minutos  
 De 31 minutos a 60 minutos  Após 60 minutos

**A Sra. já parou de fumar por pelo menos 1 dia, porque estava tentando seriamente parar de vez?**  
 não  sim

**Quando foi a última vez que a Sra. tentou parar de fumar?**  
 Durante o último mês  Mais de um mês até 6 meses atrás  
 Mais de 6 meses até 12 meses atrás  Há mais de 12 meses

**Alguma vez a Sra. já experimentou ou tentou fumar cigarros, mesmo uma ou duas tragadas?**  
 não  sim  
**A Sra. fica em contato com a fumaça do cigarro de outras pessoas em sua casa, trabalho ou escola?**  
 não  sim

**Há quanto tempo a Sra. parou de fumar?**  
 anos  meses  NS/NR  
**Quando a Sra. fumava, quantos cigarros a Sra. fumava, em média, por dia?**  
 Cigarros por dia  Maços por dia  NS/NR/Variável

**A Sra. parou de fumar porque tinha algum problema de saúde que foi causado ou que piorou por causa do cigarro?**  
 não  sim

**Para parar de fumar a Sra. :**  
 Recebeu algum tipo de tratamento com profissionais de saúde ou usou algum tipo de medicamento  
 Parou por conta própria

**Qual foi o tipo de tratamento ou medicamento que a Sra. recebeu?**  
 Recebeu orientações em consulta com médico ou enfermeiro ou psicólogo  
 Participou de grupos para ajudar o fumante a parar  
 Fez tratamento com laser ou acupuntura  
 Usou adesivos ou chiclete de nicotina  
 Usou outros tipos de medicamentos? \_\_\_\_\_  
 Outros \_\_\_\_\_

---

**8. HISTÓRICO ALIMENTAR**

**Consome Bebidas alcoólicas?**  não  
 não agora, mas já consumiu (*pular para próximo bloco*)  
 sim

**Qual o tipo ?**  
 Aguardente  Cerveja  Vinho  whisky  licor  
 outros \_\_\_\_\_  NS/NR

**Com que idade que iniciou?** \_\_\_\_\_  
**Com que frequência costuma beber?**  
 diariamente  semanalmente  mensalmente  raramente

**Qual a quantidade de copos/dia?**  
 1 a 2  3 a 4  5 a 6  mais de sete  outros \_\_\_\_\_

**Com que idade que parou de beber?** \_\_\_\_\_  
**Por quantos anos bebeu?** \_\_\_\_\_  
**Passou por algum tratamento para parar de beber?**  
 não  sim  NS/NR

---

**8.3 - Cozimento**

**Ingere broto de samambaia?**  não  
 sim  NS/NR

**A quantos anos ingere?** \_\_\_\_\_  
**Qual a forma de preparo?**  cru  cozido  outros \_\_\_\_\_  
**Qual o numero de água desprezadas?** \_\_\_\_\_  
**Qual a quantidade de porções que ingere por vez ?**  
 1 a 2 colheres  3 a 4 colheres  
 Vezes por \_\_\_\_\_  
 Dia  Semana  Mês  Rara/Nunca

---

**Usa Fogão a Lenha?**  não  
 sim  já usei

**Tem Fogão a Lenha em casa?**  não  
 sim

**A quanto tempo?** \_\_\_\_\_  
**Você cozinha neste fogão?**  sim  não **A quanto tempo?** \_\_\_\_\_  
**Você costuma queimar madeira para outro fim:**  sim  não

---

**8.4 Alimentos**

**A Sra. come frango?**  Não  
 Sim

**Com que frequência a Sra. come frango?**  
 Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Quando a Sra. come frango, o que normalmente faz, com a pele:**

Sempre retira a pele antes de comer  Na maioria das vezes retira  
 Algumas vezes retira  Quase nunca retira  
 Nunca retira  Não come carne que tenha muita gordura  
 NS/NR

**A Sra. come carne vermelha?**  Não  
 Sim

**Com que frequência a Sra. come carne?**

Vezes por dia   Vezes por semana   Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Quando a Sra. come carne vermelha, o que normalmente faz, com a gordura visível:**

Sempre retira  Na maioria das vezes retira  
 Algumas vezes retira  Quase nunca retira  
 Nunca retira  Não come carne que tenha muita gordura  
 NS/NR

**Com que frequência a Sra. come:**

**Alimentos na brasa (ex: churrasco)?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Bife ou carne cozida?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Hambúrguer ou carne moída?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Lingüiça ou salsicha (exceto de frango)?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Peixe?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Carne de porco?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Queijo ou requeijão?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Manteiga ou margarina?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Biscoitos?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Bolos e tortas?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Batata frita?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Carnes ou peixes conservados no sal (ex: bacalhau, charque, pé de porco)?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Enlatados ou conserva (ex: milho, ervilha, palmito, azeitona, salsicha, extrato ou massa de tomate)?**

Vezes por dia  Vezes por semana  Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente  NS/NR

**Frios (ex: presunto, mortadela, salame, apresuntado)?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Leite e derivados (ex: achocolatado, iogurtes, vitaminas)?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Frutas e sucos de frutas preparados a partir da fruta, polpa ou concentrado?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Batata cozida, batata-doce, batata-baroa, aipim, cará, inhame?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Outros legumes (ex: abobrinha, beterraba, chuchu, cenoura, quiabo, vagem)?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Hortalças (ex: agrião, alface, brócolis, chicória, couve, couve-flor, espinafre, repolho)?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Feijões (ex: preto, mulatinho, fradinho, roxo), lentilha, ervilha seca ou grão de bico?**  
 Vezes por dia     Vezes por semana     Vezes por mês  
 Menos que uma vez por mês/raramente     NS/NR

**Sem contar saladas, com que frequência a Sra. costuma colocar sal no prato de comida?**  
 Nunca coloca sal no prato de comida  
 Provo e coloco se estiver sem sal  
 Coloco quase sempre mesmo sem provar

---

**9. ATIVIDADE FÍSICA**

**Em quantos dias de uma semana comum a Sra. caminha por pelo menos 10 minutos seguidos?**  
(ex: em casa, no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer ou como forma de exercício)  
 Dia(s) na semana     Nenhum     NS/NR

**A Sra. faz atividades MODERADAS, por pelo menos 10 minutos seguidos, no trabalho, por lazer, por esporte, como forma de exercício, como parte das suas atividades dentro de casa, no quintal ou qualquer outra atividade que aumente moderadamente a sua respiração ou batimentos do coração?**  
(ex: pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa ou no quintal, como varrer, aspirar, cuidar do jardim ou trabalhos como soldar, operar máquinas, empilhar caixas)  
 não     sim     NS/NR

**Em quantos dias de uma semana comum, a Sra. faz essas atividades MODERADAS, por pelo menos 10 minutos seguidos?**  
 Dia(s) na semana     NS/NR

AO QUESTIONADOR

**ESTADO DE ATENÇÃO DO ENTREVISTADO**  
 bastante disperso     disperso     atento     bastante atento     outros

**COMPREENSÃO DO ENTREVISTADO**  
 não compreende     compreende com dificuldade     compreende

\_\_\_\_\_  
Entrevistador

### 8.3 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 403/2008 - CEP/CCS

Recife, 18 de Dezembro de 2008

Registro do SISNEP FR – 215803

CAAE – 0267.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 275/08

**Título: "Análise do Perfil Epidemiológico de Infecções Causadas pelo Papilomavírus Humano em Mulheres Atendidas pelo Programa Saúde da Família na Cidade de Olinda-PE"**

Pesquisador Responsável: Danyelly Brunaska Gondim Martins

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 18 de dezembro de 2008.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

José Angelo Rizzo  
Vice-Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A  
Dra. Danyelly Brunaska Gondim Martins  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

## 8.4 Instruções para autores

### 8.4.1 *International Journal of Infectious Diseases*

International Journal of Infectious Diseases - Elsevier <http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.print/701730/g...>

**ELSEVIER**

[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/701730/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/701730/authorinstructions)

**International Journal of Infectious Diseases**

Official Publication of the International Society for Infectious Diseases

**Guide for Authors**

If you have any problem submitting your paper online please contact Annette Fowler at [IJID@elsevier.com](mailto:IJID@elsevier.com)

The *International Journal of Infectious Diseases* (IJID) is published monthly by the International Society for Infectious Diseases. *IJID*

**Please noted as of January 2010 the International Journal of Infectious Diseases will be published online only:**

**Original articles** on infectious disease topics of broad interest. We particularly welcome papers that discuss epidemiological aspects of international health, clinical reports, clinical trials and reports of laboratory investigations. Original articles should not exceed 5000 words in length.

**Reviews** on topics of importance to readers in diverse geographic areas. These should be comprehensive and fully referenced. Maximum length 6000 words.

**Perspectives** are papers that advance a hypothesis or represent an opinion relating to a topic of current interest or importance. They should be fully referenced, and should not exceed 2000 words in length.

**Correspondence** relating to papers recently published in the Journal, or containing brief reports of unusual or preliminary findings. Maximum length 400 words, one table or figure and a maximum of 10 references.

**Case Reports** must be carefully documented and must be of importance because they illustrate or describe unusual features or have important therapeutic implications. Maximum length 1200 words, no more than a page and a half in length and a maximum of 1 table or figure. Case reports do not require a structured abstract and should include no more than 5 references.

**Medical Imagery:** We would like to invite submission of high-quality, interesting and instructive images (such as clinical and other photographs, figures or diagrams, photomicrographs, or diagnostic imaging) suitable for the general readership of IJID. These should include no more than 200 words of explanatory text, and under 5 references. It is necessary to have appropriate permissions from subjects for an identifiable clinical image to be published.

**Manuscript Submission**

Manuscripts should be submitted online at: <http://ees.elsevier.com/ijid>

*Covering letter:* Manuscripts must be accompanied by a covering letter signed by ALL the authors stating that the current "Instructions to Authors" have been read, thereby indicating compliance with those instructions and acceptance of the conditions posed. The letter should state that the authors have seen and agreed to the submitted version of the paper, that all who have been acknowledged as contributors or as providers of personal communications have agreed to their inclusion, that the material is original and that it has been neither published elsewhere nor submitted for publication simultaneously. In addition the letter should state that if accepted, the paper will not be published

1 de 7 28/08/2011 13:16

elsewhere in the same form, in English or in any other language, without written consent of the copyright holder.

A scanned image of the signed covering letter should be submitted via the online submission system. If this is not possible the letter should be posted or faxed to the Editorial Office.

It is strongly advised for Authors to suggest three non-conflicted peer reviewers with expertise as much for content as for methodology of their submission, with contact details including email address. This will significantly help the editorial office in facilitating timely external peer review.

**Conflict of Interest:** manuscripts cannot be published until we have received a signed Conflict of Interest Declaration form. You may obtain a Conflict of Interest Declaration document to be completed from the link below or upon request from the IJID Editorial Office [IJID@elsevier.com](mailto:IJID@elsevier.com). You are strongly advised to provide the declaration at the time you first submit your paper. A scanned image of the signed declaration should be submitted via the online submission system. If this is not possible the declaration should be posted or faxed to the Editorial Office.

**Conflict of Interest Declaration (pdf format)** [To read the PDF file you must have Adobe Acrobat Reader installed on your system. [Download a free copy of Adobe Acrobat Reader.](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html) ☞ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>]

Upon acceptance for publication, manuscripts will become the permanent property of the International Society for Infectious Diseases and may not be published elsewhere without the permission of the Society.

### **Manuscript format**

**General:** The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility.

When preparing tables, preferably use a table grid and use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. Do not import the figures into the text file but instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. Each figure must be submitted separately as requested at the file upload stage of submission. For further information on the preparation of electronic illustrations, please refer to the "Tables and Figures" section.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spellchecker' function of your wordprocessor.

The entire manuscript, including the abstract, acknowledgements, references, tables, figures, and legends, must be double spaced, with a margin of at least 2.5 cm. On assignment to an editor, each manuscript will be assigned a number, which will be provided to the author. The author should refer to this number in all ensuing correspondence. All manuscripts (including correspondence) will be subject to peer review. A rapid response to the authors will be more feasible if the manuscript is prepared as stipulated in the Instructions to Authors. Expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se* should not be in italics.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at ☞ <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

**Numbers and measurements:** Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

**Title Page:** The title page must include each author's full name and academic affiliations. The author to whom correspondence concerning the manuscript and to whom requests for reprints should be directed must be designated, as well as the corresponding address, telephone, fax, and e-mail. Manuscripts that were presented as part of a meeting must include the title, location, and date of the meeting on the title page. **Abstract:** A structured abstract of 150 to 200 words must be provided as part of each manuscript, except correspondence. The abstract should consist of four paragraphs, labelled with the following headings: objectives, design or methods, results, conclusions, or alternative headings appropriate to the format of the paper. The abstract should not refer to footnotes or references.

**Keywords:** Immediately after the abstract, provide a maximum of six keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be used.

**Acknowledgements:** Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

**References:** Indicate references by superscript numbers in the text.

Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979. Reference to a chapter in an edited book:
3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than six authors the first six should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-934) (see also <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>) References to personal communications and to unpublished material must be incorporated, in parentheses, at the appropriate place in the text. References to congress abstracts should be cited in the reference section if they have been published previously in an official book of abstracts from the congress; otherwise they should be incorporated in the text. The author is responsible for the accuracy and completeness of the references.

**Citing and listing of web references:** Such article citations should include the DOI (digital object identifier).

For example:

Boutayeb A, Twizell EH, Achouayb K, Chetouani A. A mathematical model for the burden of diabetes and its complications. *Biomed Eng Online* 2004;3:20. doi:10.1186/1475-925X-3-20. The DOI is a persistent identifier, which remains with the article even after it is published in print. See <http://www.doi.org> for details.

If the reference does not have a DOI, the full URL should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

**Style:** For stylistic questions, authors are referred to the Chicago Manual of Style, 14th Edition, 1993, published by the University of Chicago Press.

**Abbreviations:** Abbreviations in the text are discouraged. If a term appears repeatedly, however, an abbreviation may be introduced parenthetically at the initial mention of the term and used thereafter in place of the term. Abbreviations of conventional or SI units of measurement may be used without introduction.

**References to drugs:** The generic name of a drug should be used as a general rule; however, the full name or the commercial name of the drug, as well as the name and location of the supplier, may be given in addition if appropriate.

**Tables and Figures:** Data reported either in a table or in a figure should be illustrative of information reported in the text, but should not be redundant with the text. Each table must be presented at the end of the manuscript on a separate page and numbered in order of appearance in the text. The title of the table must appear after the number. Each table must include appropriate headings. Footnotes, when necessary, must be identified by letters. Units of measurement must be clearly indicated.

Figures should not be imported into the manuscript text file but submitted separately as requested at the file upload stage of submission. A short detailed legend should be provided for each figure. All legends must be collected together on a separate page following the body of the manuscript.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Photomicrographs should include a micron bar or other appropriate scale marking.

**Bacterial nomenclature:** Microbes should be referred to by their scientific names according to the binomial system used in the latest edition of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (The Williams and Wilkins Co.). When first mentioned, the name should be in full and written in italics. Thereafter, the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. Aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning(s) unclear the names of organisms should be given in full. Only those names included in the Approved Lists of Bacterial Names (*Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420) and/or which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since January 1980 are acceptable. If there is a good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, it should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning its use made in the text (e.g. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556).

**Symbols for units of measurement must accord with the Système International (SI):** However, blood pressure should be expressed in mmHg and haemoglobin as g/dl.

**GenBank/DNA sequence linking:** Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For *each and every* accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

**Example:** "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228** ), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048** ), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117** )".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

**Supplementary material submission.** Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/copyright>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author by email, confirming receipt of the manuscript, together with a form facilitating the transfer of copyright. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: Tel. (+1) 215 238 7869; Fax (+1) 215 238 2239; e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

**Ethical Consideration.** Work on human beings that is submitted to *International Journal of Infectious Diseases* should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent which should be documented in your paper. Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, Elsevier must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to Elsevier on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If such consent has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

**Randomised Controlled Trials.** All randomised controlled trials submitted for publication in *International Journal of Infectious Diseases* should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org/?0=1001> for more information. *International Journal of Infectious Diseases* has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this

purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

**Conflicts of Interest.** At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

**Authorship.** All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

**Acknowledgement.** All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

**Role of the Funding Source.** All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

**Proofs.** One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the author. A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies> **Sponsored Articles**

*International Journal of Infectious Diseases* now offers authors the option to sponsor non-subscriber access to individual articles. The access sponsorship contribution fee per article is \$3,000. This contribution is necessary to offset publishing costs - from managing article submission and peer review, to typesetting, tagging and indexing of articles, hosting articles on dedicated servers, supporting sales and marketing costs to ensure global dissemination via ScienceDirect, and permanently preserving the published journal article. The sponsorship fee excludes taxes and other potential author fees such as color charges which are additional.

- Authors can specify that they would like to select this option after receiving notification that their article has been accepted for publication, but not before. This eliminates a potential conflict of interest by ensuring that the journal does not have a financial incentive to accept an article for publication.
- Authors who have had their article accepted and who wish to sponsor their article to make it available to non-subscribers should complete and submit the [sponsored article order form](#).

© Copyright 2011 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

