

UNIVERSIDADE SANTO AMARO  
Curso de Mestrado em Ciência da Saúde

Thais dos Santos Cavicchio da Silva

**Incidência do Papilomavírus humano, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população ribeirinha do rio Amazonas**

São Paulo

2020

**Incidência do Papilomavírus humano, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população ribeirinha do rio Amazonas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Stricto-Sensu da Universidade Santo Amaro, como requisito parcial para o título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadores:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Colombo de Souza  
Prof. Dr. Marco Antônio Zonta  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Tiemi Shio

São Paulo

2020

Thais dos Santos Cavicchio da Silva

**Incidência do Papilomavírus humano, *Mycoplasma hominis* e  
*Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população  
ribeirinha do rio Amazonas**

53 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Santo  
Amaro, 2020.

Orientador: Profa Dra Patrícia Colombo

Co-Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zonta

Co-Orientador: Profa Dra Marina Tiemi Shio

1. Palavras chaves: Papilomavírus humano, Mycoplasmas e população

Thais dos Santos Cavicchio da Silva

**Incidência do Papilomavírus humano, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população ribeirinha do rio Amazonas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa Dra Patrícia Colombo

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Marco Antônio Zonta

Titulação: PhD

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Da Silva Nali

Titulação: PhD

---

Profa. Dra. Adriana Ferraz Carbonel

Titulação: PhD

Conceito final
----------------

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Simone e Edmilson, por sempre estarem ao meu lado me incentivando, meu marido André e minha filha Catarina por entenderem momentos difíceis e sempre me apoiar.

Agradeço aos orientadores Prof<sup>o</sup> Dr. Marco Antônio Zonta e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Tiemi Shio por compartilhar seus conhecimentos, pela orientação e pela amizade e parceria nestes dois anos.

Agradeço a minha amiga Kelly Souto pela amizade, companheirismo e por todo apoio para concretizar mais essa etapa.

Por fim, agradeço aos professores da Universidade Santo Amaro por todas as aulas, palestras e todo conhecimento passado a nós alunos.

## RESUMO

### **Incidência do Papilomavírus humano, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população ribeirinha do rio Amazonas**

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) continuam sendo um grande problema de saúde pública em todo o mundo, estima-se aproximadamente 357 milhões de novas infecções, entre HPV, clamídia, gonorreia, sífilis e tricomoníase aconteçam anualmente. A prevalência de Papiloma vírus humano (HPV) na população feminina é de cerca de 54,6% e na masculina, de 51,8% no ano de 2018. Os tipos HPV 16, 18, 31 e 45 são os tipos mais prevalentes, sendo responsáveis por aproximadamente 95% dos casos de carcinomas de células escamosas e suas lesões precursoras de alto grau. O *Mycoplasma ssp* é frequentemente isolado no trato genital, bem como as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, normalmente frequente em infecções associadas. A associação entre a infecção pelo HPV e o câncer do colo do útero já é bem estabelecida, embora vários estudos tenham encontrado o envolvimento de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* contribuindo como facilitador de risco de infecção pelo HPV. Dentre as novas tecnologias desenvolvidas para identificação de DNA-Viral, como um dos desdobramentos do seqüenciamento dos genomas, destacasse a técnica de microarrays, ou chips de DNA. A metodologia de microarrays pode ser utilizada para a determinação de perfis de expressão gênica ou para o estudo de genoma funcional. O Objetivo deste trabalho foi verificar a incidência de HPV, *M. Hominis* e *Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população ribeirinha dos afluentes Rio Negro e Madeira no Amazonas. Foram avaliadas 117 amostras e verificamos que 78,63% possuem ensino médio incompleto e a 79,49% são casadas. Ainda 26,49% das voluntárias apresentaram a infecção por HPV e 12% destas mulheres estavam infectadas pelo sorotipo 16. Quando separamos a análise do HPV com o *M.hominis*, observamos uma concordância discreta (66,7%,  $p=0,0137$ ) e o mesmo foi feito co *U. parvum*, observamos uma discordância discreta (56,4%,  $p=0,1744$ ). O câncer cervical está associado aos HPVs de alto risco oncogênico, no entanto outros patógenos cervicais desempenham um papel importante no microambiente imunológico, levando um aumento permissividade o desenvolvimento do câncer cervical, processo mediado pela resposta inflamatória.

Palavras chaves: Papiloma vírus humano, Mycoplasmas spp, população ribeirinha

## ABSTRACT

### **Incidence of human Papillomavirus, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma spp* in cervical samples collected from the riverside population of the Amazon River**

Sexually transmitted infections (STIs) remains to be a major public health issue worldwide, an estimated 357 million new infections, including HPV, chlamydia, gonorrhea, syphilis and trichomoniasis, occur annually. The prevalence of human papillomavirus (HPV) in the female population is about 54.6% and in the male, 51.8% in 2018. HPV types 16, 18, 31 and 45 are the most prevalent types, being responsible for approximately 95% of cases of squamous cell carcinomas and their high-grade precursor lesions. The *Mycoplasma ssp* are frequently isolated in the genital tract, as well as the species *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*, usually frequent in associated infections. The association between HPV infection and cervical cancer is well established, although several studies have found the involvement of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* contributing to the risk of HPV infection. Among the new technologies developed for the identification of Viral DNA, as one of the consequences of genome sequencing, highlight the microarray technique, or DNA chips. The microarray methodology can be used to determine gene expression profiles or to study the functional genome. The objective of this work was to verify the incidence of HPV, *M. Hominis* and *Ureaplasma spp* in cervical samples collected in the riverside population of the affluent Rio Negro and Madeira in Amazonas. 117 samples were evaluated and we found that 78.63% have incomplete high school and 79.49% are married. Still 26.49% of the volunteers had HPV infection and 12% of these women were infected with serotype 16. When we separated the HPV analysis with *M. hominis*, we observed a slight agreement (66.7%,  $p = 0.0137$ ) and the same was done with *U. parvum*, we observed a slight disagreement (56.4%,  $p = 0.1744$ ). Cervical cancer is associated with high oncogenic risk HPVs, however other cervical pathogens play an important role in the immune microenvironment, leading to an increased permissiveness in the development of cervical cancer, a process mediated by the inflammatory response.

Keywords: Human papillomavirus, Mycoplasmas spp, riverside population

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características socioeconômicas da população quanto à idade, escolaridade e estado civil	24
Tabela 2	Características socioeconômicas da população quanto à renda, número de pessoas na mesma residência e profissão	25
Tabela 3	Fatores de risco associados a infecções sexualmente transmissíveis	26
Tabela 4	Quantidade de HPV por paciente	26
Tabela 5	Frequência de cada sorotipo de HPV	27
Tabela 6	Distribuição dos tipos de HPV por paciente	28
Tabela 7	Distribuição da frequência de infecções pelo HPV por faixa etária	29
Tabela 8	Concordância entre a idade da primeira relação sexual e a infecção por HPV	29
Tabela 9	Concordância entre o número de parceiros sexuais e a infecção por HPV	29
Tabela 10	Concordância entre o exame preventivo e a infecção por HPV	30
Tabela 11	Frequência dos patógenos causadores de infecções sexualmente transmissíveis	30
Tabela 12	Concordância entre a infecção por HPV e o <i>Mycoplasma hominis</i>	31
Tabela 13	Concordância entre a infecção por HPV e o <i>Ureaplasma parvum</i>	31

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

IST	Infecção sexualmente transmissível
HPV	Papiloma vírus humano
CML	Citologia em meio líquido
<i>M. hominis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
CCU	Câncer de colo uterino

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do genoma do HPV	13
---	----

## ANEXOS

Anexo I	Questionário Sócio demográfico	43
Anexo II	Aprovação da comissão de ética em pesquisa da UNISA	46
Anexo III	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
Anexo IV	Termo de assentimento para menores de idade	52

## Sumário

1	Introdução.....	13
2	Justificativa .....	19
3	Objetivos.....	20
3.1	Geral .....	20
3.2	Específicos.....	20
4	Metodologia .....	21
4.1	Procedimento de Coleta.....	22
4.2	Extração do DNA Genômico .....	22
4.3	Amplificação do DNA Genômico .....	22
4.4	Microarray .....	23
4.5	Análise Estatística:.....	23
5	Resultados.....	24
6	Discussão .....	33
7	Conclusões .....	38
8	Referências.....	39
	Anexos.....	43

# 1 Introdução

## 1.1. Epidemiologia das infecções sexualmente transmissíveis

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) continuam sendo um grande problema de saúde pública em todo o mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a ocorrência de mais de um milhão de novos casos em esfera mundial. <sup>1</sup>

Estima-se aproximadamente 357 milhões de novas IST, dentre elas a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), clamídia, gonorreia, sífilis e tricomoníase aconteçam anualmente. A prevalência de do Papiloma vírus humano (HPV) na população feminina em todo o mundo é de cerca de (54,6%).<sup>1</sup>

A infecção anogenital pelo HPV está associada ao desenvolvimento de lesões benignas e em alguns casos com evolução maligna, como condiloma acuminado, lesões pré-neoplásicas e neoplasia especialmente no colo uterino, tendo como fatores de risco associados o início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, tabagismo, baixa condição socioeconômica, multiparidade, entre outros, e o vírus de alto risco oncogênico (HR HPV) estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de lesões escamosas de alto grau e o carcinoma de colo uterino. <sup>2</sup>

### 1.1. HPV: característica, estrutura, tipos de vírus e fatores de risco

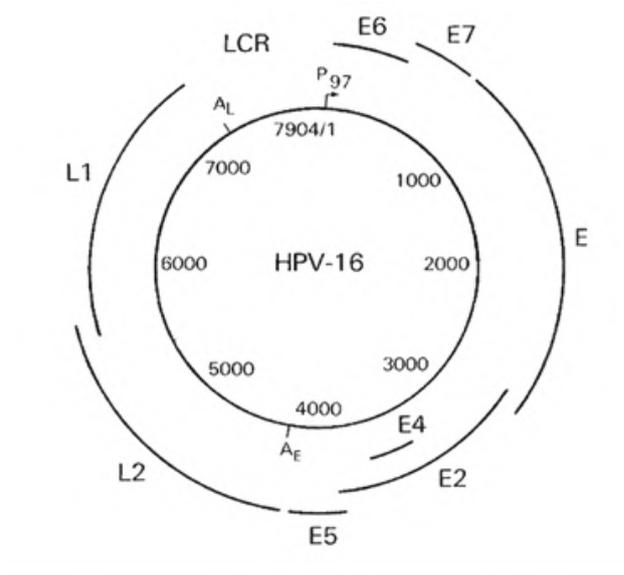
Os HPVs são vírus compostos de dupla fita de DNA circular, inseridos na família Papillomaviridae, com mais de 200 tipos identificados. O gênero Alphapapillomaviridae, com aproximadamente 65 tipos identificados, infectam o sistema anogenital e estão divididos em 2 grupos, quanto ao seu potencial oncogênico. Os categorizados em tipos de baixo risco oncogênico, e associados a lesões benignas como verrugas genitais e condilomas planos e acuminados (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89) e de alto risco oncogênico, associados às lesões cervicais de alto grau e ao câncer cervical (16, 18, 58, 33, 45, 31, 52, 35, 59, 39, 51, 56, 66 e 68).<sup>3</sup>

Os tipos HPV 16, 18, 31 e 45 são os tipos mais prevalentes nos quadros de lesão de alto grau e no câncer de colo uterino, sendo responsáveis por aproximadamente 95% dos casos. <sup>3</sup>

Esses vírus apresentam uma estrutura espacial icosaédrica, não envelopado com cerca de 8.000 pares de base. <sup>4</sup>

Sua estrutura está dividida em duas regiões, uma responsável pela genômica viral e interação com o DNA da célula hospedeira, denominada de região precoce (*Earl*) contendo os genes iniciais, E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e (II) uma região contendo dois genes tardios (*Late*) L1 e L2, responsável pela formação do cápside viral e a resposta antigênica. <sup>5</sup> (figura 1)

Figura 1: Esquema representativo do genoma do HPV



Fonte: (Cruz et al, 2002)

O genoma do HPV possui uma região não codificante, denominada região de controle (LCR), que inclui a maioria dos elementos reguladores envolvidos na replicação e transcrição do DNA viral. <sup>2</sup>

Vários são os fatores identificados com facilitadores da infecção viral, dentre eles, alterações na microbiota cérvico-vaginal com a diminuição de Lactobacilos e aumento da diversidade microbiana facilitam a infecção o acesso e a penetração das partículas virais na mucosa cervical mediado pela expressão de citocinas inflamatórias e de cicatrização de feridas levando ao estresse celular e

mutações genéticas, aumentando o risco da integração do genoma do HPV, podendo estar envolvidas na persistência viral e no desenvolvimento do câncer <sup>6</sup>

### 1.2. *Mycoplasmas ssp*: Características, espécies patogênicas e associação com HPV

O *Mycoplasma ssp* são frequentemente isolados no trato genital, tendo como a espécie mais frequente *Mycoplasma hominis*.<sup>8</sup> São espécies comumente encontradas no trato urinário inferior de homens e mulheres adultos. Outra espécie representativas de *Mycoplasma* genital incluem *M. genitalium*.

O *M. hominis* é uma bactéria de cultura exigente, como não possui parede celular e não pode ser visualizada na coloração de Gram, estando associado a infecções urogenitais, em particular vaginose bacteriana e uretrite não gonocócica.<sup>9</sup>

### 1.2. *Ureaplasma ssp*: Características, espécies patogênicas

O *Ureaplasma ssp* é considerado parte da microbiota genital inferior, com uma taxa de colonização de 40 a 80%. Porém, o microrganismo tem sido implicado em várias condições, como uretrite não gonocócica (NGU), prostatite, cálculos urinários, doenças ginecológicas, infertilidade e doença pulmonar crônica em neonatos. <sup>9</sup>

Estudos sugerem a relação das infecções por esses agentes a problemas durante a gestação, como vaginose bacteriana, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade, parto prematuro, ruptura prematura de membranas e corioamnionite.<sup>8</sup>

Os *Ureaplasmas* evoluíram de bactérias Gram-positivas por evolução degenerativa perderam sua parede celular peptidoglicana, são bactérias esféricas ou coccobacilares com diâmetros entre 0,2-0,3 µm, são biovars, ou seja, uma cepa procariótica variante que difere fisiologicamente ou bioquimicamente de outras cepas em uma espécie particular. Possui 14 sorotipos *Ureaplasma parvum* (UPA, biovar 1, parvo) e *Ureaplasma urealyticum* (UUR, biovar 2). O Biovar 1 inclui os sorotipos 1, 3, 6 e 14, e os 10 sorotipos restantes pertencem ao biovar 2. <sup>9</sup>

A associação entre a infecção pelo HPV no câncer do colo do útero já é bem estabelecida, porém vários estudos tenham encontrado o envolvimento de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* contribuindo como facilitador de risco de infecção pelo HPV. <sup>11</sup>

## 1.2. Diagnóstico molecular das IST

Com o advento de uma nova metodologia introduzida nos anos 90 no Brasil, Citologia em Meio Líquida (CML), aprimorando a preservação celular para realização da metodologia de Papanicolaou, fez com que a sensibilidade do rastreamento das lesões precursoras e do câncer de colo uterino alcança-se 90% de sensibilidade. Essa metodologia, além de permitir a análise morfológica da células, permite a análise do material genômico para a identificação do DNA HPV nas amostras celulares.<sup>4</sup>

A CML tem sido amplamente adotada e está gradualmente substituindo a citologia convencional em programas de controle do câncer do colo do útero em alguns países. A introdução do teste de DNA HPV complementou os programas de rastreamento com a capacidade de identificar aquelas mulheres que tem a infecção viral e potencial para desenvolver o câncer de colo uterino. <sup>12</sup>

A genotipagem para identificação do DNA HPV vem sendo uma ferramenta indispensável nas políticas de rastreamento de lesões e identificação persistente dos vírus de alto risco em todo o mundo. <sup>12</sup>

Ao contrário dos métodos de triagem baseados na citologia, o teste do HPV não se baseia na interpretação morfológica e sim na detecção de DNA do HPV. Nas últimas duas décadas, o teste do HPV tornou-se em vários países a diretriz clínica para rastreamento, triagem e acompanhamento de carcinoma cervical após o tratamento. Os avanços na genética molecular fornecem uma melhor compreensão da história natural da infecção pelo HPV no nível molecular. <sup>13</sup>

Existem plataformas de identificação molecular que permitem a identificação do DNA-HPV, dentre eles a captura híbrida (CH), *southern blot*, hibridização *in situ*, hibridização em fase sólida (*microarrays*) e reação em cadeia pela polimerase (PCR). <sup>14</sup>

Os métodos mais utilizados têm como princípio as reações em cadeia pela polimerase (PCR) e a produção de híbridos capazes de identificar sondas complementares aos vírus alvo. Desde o surgimento da captura híbrida, essas metodologias vêm se aprimorando e se tornando mais sensíveis na identificação do agente causal, não só de grupos virais como dos tipos isoladamente, permitindo assim, uma melhor caracterização da infecção e uma maior segurança para estabelecer o prognóstico da paciente.<sup>5</sup>

As novas tecnologias desenvolvidas para identificação de DNA-Viral, como um dos desdobramentos do sequenciamento dos genomas, entre elas, destacasse a técnica de *microarrays*, ou chips de DNA. A metodologia de *microarrays* pode ser utilizada para a determinação de perfis de expressão gênica ou para o estudo de genoma funcional.<sup>15</sup>

O princípio da técnica baseia-se na capacidade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucléicos e no fato das sondas de *array* apresentarem sequências similares às dos genes de interesse a serem identificados, e complementares às do RNAm ou às do cDNA (DNA complementar).<sup>15</sup>

Os arranjos (ou chips) de DNA carregam milhões de seguimentos de DNA distribuídos sobre uma superfície sólida. O pré-requisito essencial para qualquer tipo de arranjos de DNA é a presença de uma sequência própria em cada componente dos chips, possuindo uma posição individual.<sup>16</sup>

Cada sequência presente nos arranjos é denominada de ponto ou spot, contendo uma pequena quantidade de DNA imobilizado, nomeado de sonda. Cada uma destas sondas tem ligação apenas a sua sequência complementar de nucleotídeos, por meio do processo de hibridização.<sup>16</sup>

O EUROArray HPV Test<sup>TM</sup> é uma técnica de *microarray* para identificação do mRNA dos genes E6 e E7 presente no genoma HPV, por meio de marcação com fluorescente. Após uma etapa inicial de amplificação viral, o material genômico é hibridizado e o produto obtido é identificado por um scanner, a partir de um software EUROArrayScan, capaz de detectar 30 tipos do DNA-HPV.<sup>17</sup>

Os testes de detecção do DNA-HPV associados ao rastreamento citológico são úteis na identificação de lesões e acompanhamento de mulheres com risco de desenvolver essa neoplasia, permitindo assim o acompanhamento das

pacientes acometidas pela infecção viral e o prognóstico em casos de mulheres com lesões pré - neoplásicas e neoplásicas. <sup>18</sup>

Um programa de triagem organizado, baseado em testes de biologia molecular utilizando o DNA do HPV, requer uma infraestrutura de saúde que possa acomodar o processamento laboratorial e a necessidade de pelo menos duas visitas em um episódio de triagem. <sup>2</sup>

Na região da Amazônia existem inúmeras comunidades ribeirinhas, onde a população esta distribuída em uma vasta e complexa hidrovía característica de Bioma Amazônia. Um conjunto de ecossistemas interconectados pela Floresta Amazônica e Bacia Amazônica, a mais densa do planeta, abriga inúmeras mulheres, que, em sua maioria, carecem de atenção primária e saúde pública, saneamento e educação dificultando assim, programas de rastreamento e acompanhamento de mulheres nos padrões tradicionais. <sup>19</sup>

Um modelo de rastreamento molecular permitirá a identificação HR\_HPV em localidades de difícil acesso, a Amazônia brasileira, é um dos locais de dificuldade de rastreamento de câncer cervical. Em virtude do difícil acesso a essas comunidades, geralmente feito apenas por pequenas embarcações.

No estado do Pará, localizado na Amazônia Oriental Brasileira, o perfil é semelhante e pouco se sabe sobre a infecção por HPV, CCU e exames de rastreamento nessa população. <sup>20</sup>

A criação de indicadores que possam contribuir para o desenvolvimento de ações de saúde para essas comunidades é essencial para a prevenção da infecção pelo HPV.

## 2 Justificativa

A infecção pelo Papilomavírus humano é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais frequente no mundo, assim como os agentes sexualmente transmissíveis.

Os fatores de riscos associados com a infecção pelo HPV descritos são o início precoce da atividade sexual, o número de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, outras infecções virais, multiparidade, o tabagismo, a baixa renda, a baixa escolaridade e a idade

A população ribeirinha destas regiões amazônicas possui uma estrutura sócia demográfica muito dependente de trabalhos humanitários para ter acesso a programas de saúde pública, dessa forma, existem poucas informações sobre as condições prevalentes e relevantes da saúde da mulher.

O diagnóstico, por meio de programas estruturados e ações comunitárias auxiliam no delineamento de políticas de prevenção e tratamento mais sólidos, permitindo melhor atendimento e condições de saúde destas mulheres sem nenhum tipo de recurso local.

### 3 Objetivo

#### 3.1 Geral

Verificar a frequência de HPV, *M. Hominis* e *Ureaplasma spp* em amostras cervicais coletadas na população ribeirinha dos afluentes Rio Negro e Madeira no Amazonas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os tipos de HPV presentes nas amostras cervicais.
- Avaliar a associação das infecções com outros fatores de riscos para ocorrência de infecção por HPV.

## 4 Metodologia

As mulheres foram submetidas a uma anamnese prévia (Questionário – ANEXO I) para a obtenção de dados sócio epidemiológico. Este trabalho é uma vertente do estudo epidemiológico sobre condições relativas à saúde da mulher em população ribeirinha do Amazonas atendida pelo programa humanitário assistencial “Doutores das Águas”, sendo parte dos resultados do grupo de pesquisas: Papilomavírus humano e doenças sexualmente transmissíveis em múltiplos sítios corpóreos, de responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio Zonta, devidamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade Santo Amaro – SP (Plataforma Brasil – CAAE: 61414216.4.0000.0081.) (ANEXO II)

A coleta de material foi realizada após a leitura e assinatura do consentimento livre esclarecido (TCLE) (ANEXO III). As mulheres menores de idade assinaram o TCLE após a apresentação do termo de assentimento devidamente assinado pelos pais ou responsáveis (ANEXO IV).

O risco foi mínimo para a paciente, podendo apenas haver um desconforto no ato da coleta dos exames, quando introduzido o espelho e a escova vaginal e um constrangimento durante a aplicação do questionário sócio epidemiológico.

Em benefício, as mulheres receberam os laudos com os resultados dos exames dos locais coletados e em caso de algum tipo de alteração foram encaminhadas ao agente de saúde local, responsável pelo programa o qual fez o encaminhamento da mesma para o tratamento.

Os procedimentos foram realizados por profissionais habilitados, e supervisionados pelo Prof. Dr. Marco Antônio Zonta. A equipe do núcleo médico do programa foi responsável pelo agendamento e recrutamento das mulheres, acompanhamento dos procedimentos de coleta e organização do local durante as atividades, supervisionada pelo pesquisador principal.

Os resultados dos exames citológicos e moleculares foram entregues na forma de laudo no prazo de 30 dias úteis e 8 meses respectivamente após a coleta e envio do material. As medidas clínicas foram administradas baseadas

nas alterações citológicas expressas no exame citológico.

#### 4.1 Procedimento de Coleta

As mulheres foram convidadas a participar do programa com ou sem sintomatologia, mas não podiam estar gestantes e/ou menstruadas. Após a orientação verbal e preparo das pacientes, a coleta cérvico-vaginal, com o posicionamento em mesa ginecológica e dilatação do canal vaginal com o espécule vaginal descartável.

A coleta do material foi realizada das regiões ectocervical (ectocérvice e vagina) e endocervical com a escova de cerdas plásticas e o material celular obtido foi conservado em frasco CellPreserv™ para posterior análise citológica e molecular (Zonta et al; 2001).

Os procedimentos citológicos e moleculares foram realizados no laboratório de pesquisa e citodiagnóstico da Universidade Santo Amaro.

#### 4.2 Extração do DNA Genômico

A extração DNA genômico das amostras cervicais foram realizadas como kit PureLink™ Microbiome (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 5 ml das amostras mantidas em Cellpreserv™ foram centrifugadas, lavadas em tampão salina duas vezes e lisadas. O DNA coletado por coluna de extração e eluído com o tampão de eluição do kit. A concentração e purificação do DNA foi determinado por nanodrop (Thermo).

#### 4.3 Amplificação do DNA Genômico

A amplificação do DNA genômico foi feita pelo kit (Euroimmun), que disponibiliza o mix para PCR, contendo a enzima taq polimerase, magnésio, nucleotídeos, primer e molde do DNA desejado. As amostras foram colocadas no termo

ciclador. Os produtos da PCR resultantes são marcados com um corante fluorescente, o que permite que eles sejam detectados posteriormente pelo *microarray*.

#### 4.4 *Microrray*

Para detecção do HPV nas amostras, foi utilizado o kit EUROArray HPV Test que é baseado na detecção dos oncogenes virais E6 / E7, o que permite maior sensibilidade devido ao uso de sistemas de primer e sondas específicos de subtipo, permitindo a detecção e tipagem de 30 sorotipos de HPV genitais: 18 HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) e 12 HPV de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89).

Para detecção do *M. hominis* e Ureaplasmas, foi utilizado o kit EUROArray STI – 11, que permite a detecção simultânea de 11 patógenos sexualmente transmissíveis em uma reação de amplificação de material genético e identificação por sondas marcadas com fluorescência para *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), HSV-1 e -2, *Haemophilus ducreyi* (HD), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Treponema pallidum* (TP), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Ureaplasma parvum* (UP), *Ureaplasma urealyticum* (UU).

#### 4.5 Análise Estatística:

Para a análise da frequência das variáveis foi utilizado o Teste G de Cochran. As associações entre as variáveis foram avaliadas pelo Teste do Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher, bem como o teste de concordância e discordância para estudar possíveis associações entre variáveis estudadas. Fixam-se em 0,05 ou 5% o nível de significância.

## 5 Resultados

Foram analisadas amostras celulares de 123 mulheres, voluntárias atendidas no programa Dr. Das Águas nas regiões dos afluentes do Rio Negro e Madeira no Amazonas. Das 123 amostras coletas, foram excluídas 5 devido à escassez de material genômico e 1 amostra excluída por dados incompletos no questionário TCLE, sendo utilizadas para esse estudo 117 amostras (95,12%).

As mulheres voluntárias apresentaram as seguintes características socioeconômicas (Tabela 1): idade mediana de 31 anos (min: 14 e max: 80), com a escolaridade inferior ao ensino médio incompleto (78,63%) e a maioria são casadas (79,49%). Ainda dentro das características socioeconômicas da população, foi analisado a renda, profissão e número de pessoas que vivem na mesma residência com as voluntárias. Podemos observar (Tabela 2) que a maioria (86,32%) vive com um salário mínimo, são agricultoras (33,33%) ou do lar (26,50%) e moram com até cinco pessoas dentro da mesma residência (52,14%)

Tabela 1: Características socioeconômicas da população quanto à idade, escolaridade e estado civil

Variáveis	categorias	n	%
Idade	14 a 19	18	15,38
	20 a 29	32	27,35
	30 a 39	33	28,21
	40 a 49	21	17,95
	50 a 59	6	5,13
	60 a 80	7	5,98
	Escolaridade	Analfabeta	22
Fundamental		28	23,93
Médio incompleto		42	35,90
Médio completo		8	6,84
Superior		11	9,40
NI		6	5,13
Estado civil		n	%
	casada	93	79,49
	solteira	19	16,24
	viúva	2	1,71
	divorciada	3	2,56

NI: Não informado

Tabela 2: Características socioeconômicas da população quanto à renda, número de pessoas na mesma residência e profissão

Variáveis	categorias	n	%
<b>Renda</b>			
	< 1 Sal	101	86,32
	2 Sal	11	9,40
	≥ 3 sal	5	4,27
<b># pessoas em casa</b>			
	02 a 5	61	52,14
	6 a10	48	41,03
	11 a15	5	4,27
	≥ 16	3	2,56
<b>Profissão</b>			
	Agricultora	39	33,33
	Do lar	31	26,50
	Estudante	15	12,82
	Pescadora	13	11,11
	Professora	9	7,69
	Agente de s	2	1,71
	Funcionária	2	1,71
	outros	6	5,13
<b>total</b>		<b>117</b>	<b>100,00</b>

Dentro da análise dos fatores de risco associados as ISTs (Tabela 3), como a idade da primeira relação sexual, quantidade de parceiros, uso de preservativo e exames preventivos anteriores, podemos observar que a idade média da primeira relação sexual (66,67%) ocorreu entre 11 a 15 anos de idade, as voluntárias possuem 1 parceiro sexual (56,41%), não utilizam preservativos (86,32%) e não realizam exames preventivos (52,99%).

Tabela 3: Fatores de risco associados às infecções sexualmente transmissíveis

Variáveis	categorias	n	%
Idade 1 <sup>o</sup> coito			
	7 a 10	2	1,71
	11 a 15	78	66,67
	16 a 20	33	28,21
	21 a 27	4	3,42
# de parceiros			
	1	66	56,41
	2 a 5	37	31,62
	6 a 10	7	5,98
	≥ 11	7	5,98
Uso preservativo			
	SIM	16	13,68
	NÃO	101	86,32
Exame Preventivo			
	SIM	55	47,01
	NÃO	62	52,99
total		117	100,00

Observamos a frequência de HPV presentes nas amostras das voluntarias (Tabela 4), ou seja, a quantidade de HPV por paciente. A maioria das voluntarias (73,50%) não possuíam a presença de nenhum tipo de HPV, já 17,09% tiveram um tipo, 6,84% chegaram a ter 2 tipos e 2,56% mais que 3 tipos, uma paciente chegou a apresentar sete tipos de vírus.

Tabela 4: Quantidade de genótipo por paciente

# HPV	n	%
0	86	73,50
1	20	17,09
2	8	6,84
≥ 3	3	2,56
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>100,00</b>

Dentre as amostras que mostraram positivas para a presença de HPV (Tabela 5),

os mais frequentes foram os HPV do tipo 16 (12%) e do tipo 31 (10%) ambos HPV de alto risco oncogênico.

Tabela 5: Frequência de cada sorotipo de HPV

Tipos de HPV	n	%
16	6	12,00
31	5	10,00
53	4	8,00
45	4	8,00
66	3	6,00
52	3	6,00
43	2	4,00
44	2	4,00
54	2	4,00
39	2	4,00
58	2	4,00
18	2	4,00
33	2	4,00
61	2	4,00
59	2	4,00
72	1	2,00
51	1	2,00
35	1	2,00
42	1	2,00
56	1	2,00
6	1	2,00
81	1	2,00
<b>total</b>	<b>50</b>	<b>100,00</b>

As pacientes que apresentaram a infecção pelo HPV, foram distribuídos a frequência de cada HPV por paciente (Tabela 6)

Tabela 6: Distribuição dos tipos de HPV por paciente

<b>Tipos de HPV</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
HPV 16	4	12,90
HPV 61	3	9,68
HPV 45	2	6,45
HPV 66	2	6,45
HPV 16 e 44	1	3,23
HPV 16, 18, 33, 45, 59	1	3,23
HPV 18, 31, 45, 58, 59, 42, 43	1	3,23
HPV 31	1	3,23
HPV 31, 53	1	3,23
HPV 31, 54	1	3,23
HPV 33	1	3,23
HPV 35	1	3,23
HPV 39	1	3,23
HPV 43, 53, 72	1	3,23
HPV 44	1	3,23
HPV 51, 39	1	3,23
HPV 52, 58	1	3,23
HPV 52,72	1	3,23
HPV 53	1	3,23
HPV 53, 54	1	3,23
HPV 56, 66	1	3,23
HPV 6	1	3,23
HPV 81	1	3,23
HPV 52	1	3,23
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,00</b>

Separamos a distribuição do HPV por faixa etária das voluntárias e aplicamos o teste de Qui - quadrado com partição (Tabela 7) e pudemos observar que as pacientes mais jovens possuíam com mais frequência a infecção pelo HPV.

Tabela 7: Distribuição da frequência de infecções pelo HPV por faixa etária

Idade	Infecção		Total
	Sim	Não	
10 a 19	10	8	18
20 a 29	6	26	32
30 a 39	6	27	31
40 a 49	4	17	21
50 a 59	2	4	6
60 a 80	3	4	7
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>86</b>	<b>117</b>

Teste do Qui-quadrado  $X^2$  calculado = 11.666  $p=0.039^*$

Lin : Col	Qui-Quadrado	GL	(p)
Partição 1	2 : 2	8.0129	1 0.0046
Partição 2	3 : 2	1.9490	1 0.1627
Partição 3	4 : 2	0.4787	1 0.4890
Partição 4	5 : 2	0.2023	1 0.6529
Partição 5	6 : 2	1.0234	1 0.3117

Geral Tabela 11.6663 5 0.0397

Um fator de risco para infecção do HPV é a idade da primeira relação sexual. Como se pode observar na Tabela 8, este fator de risco não foi determinante para a infecção por HPV, visto que a maioria das mulheres ( $n = 57$ ) não apresentou a infecção pelo HPV mesmo com início precoce da atividade sexual (7 a 15 anos de idade).

Tabela 8: Concordância entre idade da primeira relação sexual e infecção por HPV

Idade/1ª relação sexual	Infecção por HPV		Total
	Sim	Não	
7 a 15	23	57	88
≥ 16	8	29	37
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>86</b>	<b>117</b>

Teste do Qui-quadrado  $X^2$  calculado = 0.660  $p=0.5571$

Outro fator de risco para infecção por HPV é a quantidade de parceiros sexuais. A Tabela 9 mostra que não houve uma correlação significativa entre o número de parceiro e a presença do HPV, mesmo analisando a partição do qui-quadrado.

Tabela 9: Concordância entre número de parceiros sexuais e infecção por HPV

Quantidade de parceiros	Infecção por HPV		Total
	Sim	Não	
1	16	50	66
2 a 5	10	27	37
6 a 10	1	6	7
≥ 11	4	3	7
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>86</b>	<b>117</b>

Teste do Qui-quadrado  $X^2$  calculado = 4.089  $p=0.2520$

	Lin	Col	Qui-Quadrado	GL	(p)
Partição 1	2	2	0.0944	1	0.7587
Partição 2	3	2	0.4041	1	0.5250
Partição 3	4	2	3.5907	1	0.0581

O exame preventivo pode auxiliar no diagnóstico precoce de HPV. A maioria das mulheres não fazia o exame preventivo (73,50%), mesmo assim não foi encontrada uma concordância entre a não realização de exames preventivos com a infecção por HPV (45,3%,  $p=0,0669$ ), com a discordância significativa de 54,7% ( $p=0,0040$ ) (Tabela 10).

Tabela 10: Concordância entre o exame preventivo e a infecção por HPV

Realização de Exame Preventivo	Infecção por HPV		Total
	Sim	Não	
Sim	11	20	31
Não	44	42	86
Total	55	62	117

Teste Kappa Kw= 0,12      z= 1,50      p=0,0669 (NS)  
 McNemar X<sup>2</sup>= 8,27      p=0,0040      Significante  
 % de concordância= 0,4530 ou 45,3%      % de discordância=0,5470 ou 54,7

Analisando a frequência das infecções sexualmente transmissíveis (Tabela 11). O *U. parvum* (37,79%) e *M. hominis* (27,27%) foram significativamente mais frequentes que as demais infecções.

Tabela 11: Frequência dos patógenos causadores de IST

IST	n	%
-	29	16,86
UP	65	37,79
MH	38	22,09
UU	13	7,56
TV	11	6,40
HD	4	2,33
MG	4	2,33
CT	3	1,74
HS2	3	1,74
TP	2	1,16
Total	172	100,00

UP – *Ureaplasma parvum*  
 MH – *Mycoplasma hominis*  
 UU – *Ureaplasma Urealyticum*  
 TV – *Trichomonas vaginalis*  
 HD – *Haemophilus ducreyi*  
 MG – *Mycoplasma genitalium*  
 CT – *Chlamydia trachomatis*  
 HS2 – *Herpes vírus tipo 2*  
 TP – *Treponema pallidum*

Quando separamos a análise do HPV com o *M.hominis* (Tabela 12), observa-se uma concordância discreta (66,7%, p=0,0137) e discordância (33,3%, p=0,0137).

Tabela 12: Concordância entre a infecção por HPV e a tipagem MH

Tipagem MH	Infecção por HPV		Total
	Sim	Não	
Sim	15	23	38
Não	16	63	79
Total	31	86	117

Teste Kappa

Kw= 0,20    z= 2,21    p= 0,0137    Significante

McNemar

X<sup>2</sup>= 0,92    p=0,3367 (NS)

% de concordância= 0,6667 ou 66,7%    % de discordância= 0,3333 ou 33,3%

A mesma análise foi feita para verificar a concordância entre a infecção por HPV com o *U. parvum* (Tabela 13) e observa-se uma discordância discreta (56,4%, p=0,1744).

Tabela 13: Concordância entre a infecção por HPV e a tipagem UP

Tipagem UP	Infecção por HPV		Total
	Sim	Não	
Sim	15	50	65
Não	16	36	52
Total	31	86	117

Teste Kappa

Kw= 0,07    z= 0,94    p=0,1744 (NS)

McNemar

X<sup>2</sup>= 16,50    p=0,0001    Significante

% de concordância= 0,4359 ou 43,6%    % de discordância= 0,5641 ou 56,4%

## 6 Discussão

A infecção pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum no mundo, assim como os demais agentes sexualmente transmissíveis, associadas a fatores de risco como o início da atividade sexual precoce e ao número elevado de parceiros sexuais. O estado do Amazonas, no norte do Brasil, é uma área com alta incidência de câncer cervical. <sup>1</sup>

Estudos evidenciam a prevalência de lesões cervicais e infecções por HPV em populações urbanas, estando essa região desprovida de conhecimento e acompanhamento dos casos de neoplasia de colo uterino associados a essa infecção. <sup>2</sup>

Consequentemente, o conhecimento sobre essas condições em mulheres que vivem em comunidades isolada e remotas ainda é muito escasso. Essas comunidades se caracterizam por um baixo nível de escolaridade, com quase metade das mulheres sem saber ler ou escrever ou com apenas o ensino fundamental completo.

As diferenças nas frequências relatadas de anormalidades cervicais e / ou infecções por HPV, e agentes sexualmente transmissíveis, enfatizam a importância de avaliar as heterogeneidades regionais e populacionais para desenvolver programas adequados de prevenção de doenças. Portanto, a detecção direta e a tipagem do HPV usando técnicas moleculares são, hoje, metodologias de rastreamento de câncer cervical de rotina. <sup>13</sup>

Além do HPV, existem outros fatores de risco que predisõem ao desenvolvimento e progressão da displasia cervical, como múltiplos parceiros sexuais, sexarca precoce, infecção por HIV, ISTs, multiparidade, tabagismo e uso de anticoncepcionais orais. Neste estudo identificamos oito casos de lesões intraepiteliais cervicais sem HPV presente ou provavelmente algum tipo de HPV que não está contemplado no método utilizado, visto que as lesões de colo uterino estão diretamente associadas a essa infecção em mais de 95% dos casos. <sup>21</sup>

Estudos evidenciam que o HPV 16 é o tipo viral mais frequente em todo o

mundo, corroborando com uma análise multicêntrica de mulheres jovens do Brasil, Canadá e EUA que evidenciaram o HPV 16 como o genótipo mais prevalente.<sup>23,24</sup> Nosso estudo evidenciou 12% de prevalência de HPV 16 na população ribeirinha, sendo também o tipo viral mais frequente na região.

Alguns estudos evidenciaram a infecção por HPV em mulheres na região norte do Brasil dentre eles, um estudo transversal realizado por Duarte *et al.*(2017) <sup>2</sup> os quais analisaram amostras de 353 mulheres ribeirinhas do estado do Pará, identificando 16,4% de presença do DNA HPV, e sendo que 2,3% apresentaram maior frequência o HPV do tipo 16. <sup>2</sup>

Em outro estudo transversal realizado por Pinto *et al.*(2011)<sup>25</sup> em amostras coletadas de 444 mulheres das áreas urbana e rural da Amazônia Ocidental, identificaram 14,6% de DNA HPV nas amostras e não tipificou o HPV.

Outro estudo transversal realizado por Coser *et al.*(2015)<sup>21</sup> em amostras cervicais de 664 mulheres de treze aldeias indígenas diferentes, observaram a prevalência de 39,5% de DNA HPV sendo o HPV do tipo 16 o mais frequente nas amostras 9,5% dos casos.

Quando comparamos os fatores de risco para infecção do HPV como idade, início precoce da atividade sexual, número de parceiros e exame preventivo anterior, neste estudo os resultados não foram significativos.

Um estudo realizado por Pinto *et al.*(2011) associaram os principais fatores de risco a infecção genital por HPV por faixa etária o qual o HPV mostrou-se mais prevalente, em mulheres entre 13 a 25 anos. Com relação ao número de parceiros sexuais na vida, a maior prevalência ocorreu em mulheres que tiveram 3 ou mais. Com relação ao uso de preservativos regularmente houve uma maior frequência de infecção por HPV em mulheres que não usaram ou usam aleatoriamente (54,4%). Com relação ao estado civil das mulheres analisadas, observou-se uma maior prevalência nas mulheres casadas ou com união estável (52,6%).

No presente estudo, a idade média da primeira relação sexual nas mulheres mostrou-se inferior aos demais estudos, ocorrendo em entre 11 a 15 anos de idade (66,67%), o número de parceiros sexuais também se mostrou

inferior ao estudo de Pinto *et al.* (2011), sendo que o número de voluntárias que se relacionara apenas um parceiro foi maior (56,41%). Comparando o uso de preservativo regular entre as mulheres, observamos uma frequência significativa (86,32%) de voluntárias que não utilizam.

Quando analisamos a frequência de realização de exame preventivo, no estudo de Duarte *et al.* (2017), grande parte das voluntárias (70%) não tinham realizado exame preventivo anterior, comparado ao presente estudo este fator não mostrou concordância.

A utilização do método de microarray para identificação do DNA HPV, trata-se de um método avançado e inovador na detecção da infecção viral associada a outros agentes bacterianos e fúngicos, sendo que a maioria dos estudos mostram técnicas convencionais de hibridação de tecidos e de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Um estudo transversal de Feriyawati *et al.*(2019) <sup>11</sup> analisaram a co-infecção do HPV com *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, utilizando o PCR para obter o DNA HPV e os demais patógenos utilizando técnicas isoladas na identificação desses patógenos, aumentando o tempo de execução dos processos.

A identificação de microrganismos presentes na mucosa urogenital de mulheres pode estar associada ao mecanismo de infecção do Papilomavirus humano, servindo como possível facilitador na fisiopatologia da infecção viral como preditor no aparecimento do câncer de colo uterino.

No estudo realizado por Leli *et al.*(2017)<sup>7</sup>, avaliaram a prevalência de colonização cervical por *U. parvum* , *U. urealyticum* , *M. hominis* e *M. genitalium* em uma população de pacientes em idade fértil, por meio de um teste molecular, e verificaram uma prevalências de 32,5% para *U. parvum* e 1% para *M.hominis*. No estudo foi utilizado o RT-PCR. Comparando com o presente estudo, 37,79% das mulheres apresentaram o *U. parvum* e 22,09% apresentaram *M.hominis*.

Quando comparamos a prevalência de pacientes com infecção de HPV associada ao *U. parvum* observa-se uma discordância (56,4%) de pacientes que não tinham HPV e tinham a infecção pelo *U. parvum*.

O *M. hominis* está associado a infecções urogenitais, em particular vaginose bacteriana e uretrite não gonocócica, podendo estar associado a infecções extragenitais, como febre pós-parto ou pós-aborto, infecções pós-cesárea ou após uma histerectomia, bem como doença inflamatória pélvica.<sup>10</sup> O *M. hominis* não é um microrganismo isolado em culturas convencionais, havendo necessidade de identificar o agente por técnicas de biologia molecular.

O câncer cervical está associado aos HPVs de alto risco oncogênico, no entanto outros patógenos cervicais desempenham um papel importante no microambiente imunológico, levando um aumento permissividade para a replicação ou desenvolvimento do câncer cervical, processo esse mediado pela expressão de citocinas inflamatórias e de cicatrização de feridas, como IL1, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , levando ao estresse celular e mutações genéticas, aumentando o risco da integração do genoma episossomal do HPV. A infecção por *Mycoplasma* permite a interação direta com o HPV durante a co-infecção de uma única célula e a interação indireta por meio de respostas de citocinas.<sup>26</sup>

Nosso estudo evidenciou uma concordância discreta (66,7%) entre o *M. hominis* e HPV, utilizando o *microarray*. No estudo de Feriyawati *et al.* (2019), utilizando métodos moleculares, não houve concordância entre a infecção concomitante pelo HPV e o *M. hominis* ( $p=0,547$ ).<sup>11</sup>

Em outro estudo, realizado por Biernat-Sudolska *et al.* (2011) avaliando 387 amostras cervicais de mulheres, verificaram a ocorrência da infecção por HPV em 40% das mulheres e destas 24% voluntárias apresentavam o *Mycoplasma*. Nas amostras cervicais oriundas das voluntárias, 35 apresentavam HPV e *U.parvum*, e apenas uma voluntária apresentava *M. hominis* e HPV, sendo demonstrado uma maior prevalência do *U.parvum* diferente do presente estudo.

No estudo de coorte recente realizado por Klein *et al.* (2020), foram coletadas amostras cervicais de 1060 mulheres, cerca de 489 (46,13%) identificaram pelo menos um tipo de HPV. Entre essas voluntárias, 42,9% também tinham *M. hominis* e 51,4% das voluntárias tinham *Ureaplasma* spp. O método utilizado neste estudo foi o PCR multiplex.

Outro estudo realizado por Kero *et al.* (2017)<sup>27</sup>, estudaram 1242 amostras

das quais 76,6% apresentaram-se positivas para o DNA HPV e 12,2% também tinham vaginose bacteriana, diferente deste estudo não dividiram a tipagem do HPV.

## 6 Conclusões

- A população ribeirinha faz parte do grupo de populações não rastreadas nos programas de controle de câncer do colo uterino, nosso estudo verificou a necessidade de um programa de rastreamento, visto a alta incidência de infecção pelo HPV e de agentes sexualmente transmissíveis, sendo o HPV 16 o mais prevalente.
- A identificação de ISTs associadas ao vírus é uma importante ferramenta no combate ao desenvolvimento do câncer cervical, visto que os processos inflamatórios decorrentes da ação dos agentes microbianos aumentam a permissividade viral. O *Ureaplasma parvum* e o *Mycoplasma hominis* foram os agentes sexualmente transmissíveis mais prevalentes.
- As técnicas de biologia molecular são as ferramentas mais indicadas para o rastreamento dos agentes infecciosos. A utilização de uma metodologia que compila a identificação de um maior número de agentes responsáveis pelas ISTs aumenta a sensibilidade e a especificidade no rastreamento, facilitado as políticas de rastreamento público.

## 7 Referências

1. Ministério da Saúde. Doenças de condições crônicas e infecções sexualmente transmissíveis. Acesso em: 20 de março de 2020. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>
2. Duarte D, Vieira R, Brito E, Pinheiro M, Monteiro J, Valente M, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Screening among Riverside Women of the Brazilian Amazon. *Rev Bras Ginecol e Obs / RBGO Gynecol Obstet.* 2017;39(07):350–7.
3. Vink MA, Bogaards JA, Meijer CJLM, Berkhof J. Primary human papillomavirus DNA screening for cervical cancer prevention: Can the screening interval be safely extended? *Int J Cancer.* 2015;137(2):420–7.
4. Zonta MA, Monteiro J, Santos Jr G, Pignatari ACC. Infecção oral pelo HPV em mulheres com lesão escamosa de colo uterino no sistema prisional da cidade de São Paulo, Brasil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;78(2):66–72.
5. Costa MOLP, Heráclio SA, Coelho AVC, Acioly VL, Souza PRE, Correia MTS. Comparison of conventional Papanicolaou cytology samples with liquid-based cervical cytology samples from women in Pernambuco, Brazil. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015;48(9):831–8.
6. Pyne MT, Law C, Hillyard DR, Schlaberg R. Testing and genotyping of high-risk human papillomavirus by the cobas HPV test and the Hybrid Capture 2 high-risk HPV dna test using cervical and vaginal samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1720–3.
7. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, et al. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>

8. Feriyawati L, Anggraini DR, Nasution TA. Co-infection of human papillomavirus with mycoplasma hominis/ureaplasma urealyticum among female sex workers in Medan, Indonesia. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(20):3425–8.
9. Il Ji Y. Co-infections with human papillomavirus and mycoplasma/ureaplasma spp. in women with abnormal cervical cytology. *Res Rep Gynaecol Obs* [Internet]. 2017;1(1):1–3. Available at: <http://www.alliedacademies.org/articles/coinfections-with-human-papillomavirus-and-mycoplasmaureaplasma-spp-inwomen-with-abnormal-cervical-cytology.pdf>
10. Journal I, Microbiology M. 19/8/2015 Ureaplasma: Current perspectives :**P Kokkayil, B Dhawan**, *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2015;(2):1–14.
11. Leli C, Mencacci A, Latino MA, Clerici P, Rassu M, Perito S, et al. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2018;51(2):220–5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.05.004>
12. Guindalini C, Tufik S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica - Aplicação no estudo de fenótipos complexos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007;29(4):370–4.
13. Iacobellis M, Violante C, Notaracchille G, Simone A, Scarfi R, Giuffrè G. Clinical validation of REALQUALITY RQ-HPV Screen according to the international guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for cervical screening. *Virology*. 2018;15(1):1–5.
14. Tainá L, Martins F, Duarte De Sena Fraga C, Santos Andrade M, Da KJ,

- Santos S, et al. Caracterização De Mulheres Com Lesão Pré-Maligna Ou Maligna No Exame Papanicolaou Characterization of Women With Pre-Malignant or Malignant Injury in the Papsmear Exam Caracterización De Mujeres Con Lesión Pre Maligna O Maligna En El Examen Papanicolaou A. Rev enferm UFPE line. 2017;11(9):3360.
15. Teixeira C, Teixeira J, Oliveira E, Machado H, Zeferino L. Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Cervix Sample in an 11.3-year Follow-Up after Vaccination against HPV 16/18. Rev Bras Ginecol e Obs / RBGO Gynecol Obstet. 2017;39(08):408–14.
  16. Rosa GJ de M, Rocha LB da, Furlan LR. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. Rev Bras Zootec. 2007;36(suppl):186–209.
  17. Hpv E. Edinburgh Research Explorer Validation of EUROArray HPV test using the VALGENT framework. 2018;
  18. Santos MV dos, Alves VH, Pereira AV, Rodrigues DP, Marchiori GRS, Guerra JVV. The physical health of women deprived of their freedom in a prison in the state of Rio de Janeiro. Esc Anna Nery - Rev Enferm. 2017;21(2):1–7.
  19. Silva H. A saúde humana e a Amazônia no século XXI: reflexões sobre os objetivos do milênio. Novos Cad NAEA. 2006;9(1):77–94.
  20. Fraxe TJP. Populações Ribeirinhas e Exército: conflito de propriedade e direitos fundamentais em tensão na Amazônia Brasileira – solução à luz do princípio da ponderação Introdução O s Direitos fundamentais em tensão no caso das comunidades existentes dentro do cam.
  21. Coser J, Boeira T da R, Simon D, Kazantzi Fonseca AS, Ikuta N, Lunge VR. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. Genet Mol Res. 2013;12(4):4276–85.

22. da Pinto DS, Fuzii HT, Quaresma JAS. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da amazônia oriental Brasileira. *Cad Saude Publica*. 2011;27(4):769–78.
23. Posse T, Prieto M, Cipolla L, Kaufman S. *Mycoplasma hominis* bacteremia. An underestimated etiological agent. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2018;50(1):45–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.009>
24. Klein C, Samwel K, Kahesa C, Mwaiselage J, West JT, Wood C, et al. *Mycoplasma* co-infection is associated with cervical cancer risk. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1–13.
25. Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with persistence of female genital human papillomavirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(11):2215–9.

**ANEXO I – Questionário Sócio demográfico****Ficha de Anamnese****Número:****Iniciais:****Data da entrevista** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**Data da colheita exames:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**Idade?** |\_\_|\_\_| anos**Escolaridade (em anos de estudo completos):** \_\_\_\_\_**Qual é seu estado marital?**

1. Solteira
2. Casada/Vive junto maritalmente
3. Separada /Divorciada
4. Viúva

**Profissão:** \_\_\_\_\_**Renda familiar:**

1. Até 1 salário mínimo
2. De 1 a 3 SM
3. De 3,1 a 5 SM
4. Mais de 5 SM

**Número de pessoas que habitam em sua casa?** \_\_\_\_\_**USO DE CIGARROS E DROGAS****Você fuma?** 1. Sim 2. Não**Quantos cigarros?**

1. Irregularmente, de tempo em tempo
2. Menos de 5 cigarros por dia
3. De 5 à 20 cigarros por dia
4. Mais de 20 cigarros por dia (mais de um maço)

**Se não, você já fumou?**

1. Sim, 1 ou 2 vezes
2. Sim, regularmente
3. Não, nunca

**Durante a semana que passou, você bebeu alguma bebida alcóolica (cerveja, vinho, aperitivos, etc)?**

1. Não
2. Uma vez
3. Várias vezes
4. Ficou bêbada

**Você utiliza algum medicamento do tipo?**

1. Para dormir
2. Para ansiedade e stress
3. Antidepressivos
4. Excitantes
5. Não

**Se sim, qual?** \_\_\_\_\_

**Você já utilizou algum outro tipo de droga?**

1. Não
2. Cola, éter
3. Cocaína
4. Crack
5. Remédios
6. Outras \_\_\_\_\_

**Você já utilizou droga injetável?**

1. Sim
2. Não
3. NR

**INFORMAÇÃO CONTRACEPTIVA****Você utiliza algum método contraceptivo?**

1. Pílula
2. Preservativo
3. DIU
4. Muco cervical/billings
5. Temperatura
6. Tabela
7. Diafragma
8. Pílula do dia seguinte
9. Preservativo feminino
10. Não

**Você e seu parceiro utilizam preservativos?**

1. Sim
2. Não

**Se sim, com que frequência vocês fazem uso do preservativo?**

1. Sempre
2. Às vezes
3. Raramente
4. Nunca

**HISTÓRIA SEXUAL E REPRODUTIVA**

**Qual era sua idade quando você teve a primeira relação sexual?**

|\_|\_| anos

**Qual era a idade de seu parceiro/a?**

|\_|\_| anos

**Você tem ou já teve relação sexual anal?**

1. Sim
2. Não
3. NR

**Você já teve relação sexual com outra mulher?**

1. Sim
2. Não
3. NR

**Em média, quantas relações você tem (ou tinha) por semana?**

|\_|\_|\_|

**Quantos parceiros sexuais masculinos você já teve na vida?**

|\_|\_|\_|

**Quantos parceiros sexuais masculinos você teve nos últimos 12 meses?**

|\_|\_|\_|

**Você já recebeu dinheiro para ter relações sexuais?**

1. Sim
2. Não
3. NS

**Já lhe aconteceu de ser forçada a ter relação sexual contra sua vontade?**

1. Sim
2. Não
3. NR

**Se sim, com que idade?**

|\_|\_|

**Isto se repetiu?**

1. Sim
2. Não
3. NR

**Se sim, quantas vezes?**

|\_|\_|\_|

**Quem foi a pessoa?**

1. Alguém de sua família, um adulto

2. Alguém de sua família, um jovem
3. Um conhecido
4. Um desconhecido
5. Várias pessoas

**Você já engravidou?**

1. Nunca
2. Uma vez
3. Várias vezes

**Se sim, qual era sua idade na primeira gravidez?**

|\_|\_| anos

**Número:** filhos ( ) Abortos espontâneos ( ) Abortos provocados ( )

**Você está grávida?**

1. sim
2. Não

**SAÚDE, DST E AIDS****Qual foi a última vez que você fez exame ginecológico (preventivo)?**

\_\_\_\_\_

**Você sabe dizer se você já teve alguma doença transmitida sexualmente?**

1. Sim
2. Não

**Se sim, qual?** \_\_\_\_\_

**Como você descobriu essa doença/infecção:**

1. Seu parceiro lhe disse que estava infectado
2. Você apresentou sintomas que a levaram procurar um serviço de saúde.
3. Durante uma consulta de rotina ou por outro motivo

**Na ocasião dessa doença você procurou:**

1. Ninguém
2. Um médico/ Unidade do PSF
3. Uma farmácia
4. Serviço de DST

**Você avisou a seu parceiro que você tinha uma DST?**

1. Sim
2. Não

**Após o diagnóstico da DST você utilizou mais frequentemente o preservativo?**

1. Sim

2. Não

**Após o diagnóstico da DST você reduziu sua atividade sexual?**

1. Sim
2. Não

**Você saberia dizer se seu parceiro:**

1. Tem outras parceiras
2. Usa drogas
3. Já esteve preso
4. História de DST
5. É HIV positivo
6. Outras \_\_\_\_\_

**Você tem algum dos seguintes sintomas?**

1. Dor pélvica
2. Sangramentos genitais frequentes
3. Coceiras na vagina
4. Corrimentos
5. Adenopatia inguinal (ínguas na virilha)
6. Ardência ao urinar
7. Ferida genital
8. Outras: \_\_\_\_\_

**Observações:**

## ANEXO II – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da UNISA

**- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE CONDIÇÕES REALATIVAS À SAÚDE DA MULHER EM POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO AMAZONAS ATENDIDA PELO PROGRAMA HUMANITÁRIO ASSISTENCIAL “DOUTORES DAS ÁGUAS”  
**Pesquisador Responsável:** Marco Zonta  
**Área Temática:**  
**Versão:** 1  
**CAAE:** 61414216.4.0000.0081  
**Submetido em:** 26/10/2016  
**Instituição Proponente:** Universidade de Santo Amaro - UNISA  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_804164

**- DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA**

- ↳ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1
  - ↳ Projeto Original (PO) - Versão 1
    - ↳ Documentos do Projeto
      - ↳ Comprovante de Recepção - Submissão 1
      - ↳ Cronograma - Submissão 1
      - ↳ Declaração de Pesquisadores - Submissão 1
      - ↳ Folha de Rosto - Submissão 1
      - ↳ Informações Básicas do Projeto - Submissão 1
      - ↳ Outros - Submissão 1
      - ↳ Projeto Detalhado / Brochura Investigação
      - ↳ TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa
    - ↳ Apreciação 1 - Universidade de Santo Amaro
  - ↳ Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações

**- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO**

Apreciação <sup>⚙</sup>	Pesquisador Responsável <sup>⚙</sup>	Versão <sup>⚙</sup>	Submissão <sup>⚙</sup>	Modificação <sup>⚙</sup>	Situação <sup>⚙</sup>	Exclusiva do Centro Coord. <sup>⚙</sup>	Ações
PO	Marco Zonta	1	26/10/2016	03/11/2016	Aprovado	Não	   

### **ANEXO III– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **CEP: Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Santo Amaro (UNISA)**

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Prof. Dr. Marco Antônio Zonta, pesquisador convidado Universidade Federal de São Paulo, disciplina de Infectologia e Prof. Dr. Carlos R. V. Kiffer, pesquisador professor da disciplina de infectologia da Universidade Federal de São Paulo, e pró-reitor de pós-graduação da Universidade Santo Amaro objetivando firmar acordo escrito mediante o qual, o voluntário da pesquisa autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

#### **1.Título do Trabalho:**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE CONDIÇÕES RELATIVAS À SAÚDE DAS MULHERES RIBEIRINHAS DOS AFLUENTES DO RIO AMAZONAS**

#### **2.Objetivo(s):**

Verificar a prevalência de lesões precursoras do câncer do colo uterino e infecção pelo Papiloma vírus humano e agentes sexualmente transmissíveis nas mulheres da população ribeirinha de afluentes dos Rios Negro e Madeira atendidas pelo programa humanitário Doutores das Águas.

#### **3.Justificativa:**

A população ribeirinha destas regiões amazônicas possui estrutura sócio demográfica muito dependente da condição de liderança e de trabalho femininas. Segundo observações do Programa, é comum haver mulheres liderando as comunidades ribeirinhas, uma vez que muitos homens emigram das respectivas comunidades em busca de melhores condições de sustento. Por outro lado,

também é crescente a preocupação do Programa com a quantidade de mulheres atendidas com queixas relativas ao aparelho genital e de gravidez em faixas etárias mais baixas. Sabendo que existem poucas informações estruturadas sobre condições prevalentes e relevantes relativas especificamente à saúde da mulher, entende-se que o atual projeto ajudará a mapear as condições infecciosas mais prevalentes em população feminina desta região, auxiliando no delineamento de políticas de prevenção e tratamento futuras de forma mais sólida e permitindo melhor atendimento e condições de saúde a estas mulheres.

#### **4. Método:**

Estou realizando um estudo para determinar o risco de infecção por Papiloma vírus humano e doenças sexualmente transmissíveis na população feminina que habita a região ribeirinha dos afluentes do rio Amazonas. Os procedimentos para este trabalho serão uma entrevista, preenchimento de questionários epidemiológicos elaborados e compostos por questões relativas a práticas sexuais e outros fatores de risco associados a transmissão sexual e coleta do material cervical. A anamnese e a coleta do material serão realizadas pelos profissionais envolvidos no projeto sob a supervisão do Prof. Dr. Marco Antônio Zonta. A coleta do material (raspado da região cervical) será realizada por profissionais treinados e supervisionados pelo Prof. Dr. Marco Antônio Zonta. Este material será submetido a avaliação citopatológica e molecular para a identificação das possíveis lesões presentes nas células do colo uterino e possíveis agentes biológicos associados.

#### **5. Risco Mínimo e benefícios:**

O risco será mínimo para você, podendo apenas haver um desconforto no ato da coleta dos exames, quando introduzido o espécuro e a escova vaginal. Em benefício, você receberá os laudos com os resultados dos exames dos locais coletados e em caso de algum tipo de alteração, você será encaminhada ao agente de saúde responsável pelo programa o qual te encaminhará para acompanhamento e tratamento.

#### **6. Informações:**

Todos os resultados dos exames citológicos serão entregues aos responsáveis pelo Projeto Doutores da Águas, os quais, em caso de exame positivo para lesões celulares e/ou infecção por HPV, você receberá tratamento e acompanhamento médico.

**7. Métodos Alternativos (se existirem):**

Não aplicável.

**8. Retirada do Consentimento e orientação de despesas:**

Em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma a Sra. tem toda a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo. Neste caso a Sra. poderá continuar seu tratamento na Instituição sem problemas (quando for o caso). A Sra. não receberá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo. Da mesma forma, a Sra. não terá nenhuma despesa pessoal em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Durante o período de sua participação, se houver qualquer despesa adicional de sua parte em relação a condução ou alimentação, a Sra. será reembolsada.

**9. Aspecto Legal:**

Elaborados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atendendo à Resolução n.º 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF.

**10. Garantia do Sigilo:**

Todos os dados pessoais serão analisados em conjunto com as de outros voluntários, sendo mantidos sobre sigilo absoluto, sendo a identidade e localização dos participantes preservados e arquivados sob a responsabilidade do pesquisador principal. Os resultados epidemiológicos e populacionais serão publicados em revistas científicas.

**11. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa:**

Não se aplica.

## **12. Local da Pesquisa:**

Coleta de Material: População ribeirinha dos afluentes do rio Amazonas.

Análise Citológica: LabPap – Laboratório de Pesquisa da Universidade de Santo Amaro/Laboratório IN CITO – Citologia Diagnóstica Ltda.

Análise Molecular: Laboratório de Pesquisa da Universidade de Santo Amaro /Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - LEMC/UNIFESP.

Análise Estatística – Disciplina de Epidemiologia da Universidade Federal de São Paulo.

**13. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Orientador e Alunos) para Contato:** Prof. Dr. Marco Antônio Zonta (Tel: 55112281-9460/5511985886059).

## **14. Endereço do Comitê de Ética da Unifesp**

Rua Botucatu, 572, 1º andar – Conjunto 14 -CEP: 04023-061 – São Paulo/SP  
tel: (11) 5571-1062 fax: (11) 5539-7162.

## **15. Consentimento Pós-Infomação:**

Eu, \_\_\_\_\_, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo - **ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE CONDIÇÕES RELATIVAS À SAÚDE DAS MULHERES RIBEIRINHAS DOS AFLUENTES DO RIO AMAZONAS**

Eu discuti com o Dr. Marco Antônio Zonta sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes



## Anexo IV – Termo de Assentimento para menores de idade

### TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada: **ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE CONDIÇÕES REALATIVAS À SAÚDE DA MULHER EM POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO AMAZONAS ATENDIDA PELO PROGRAMA HUMANITÁRIO ASSISTENCIAL “DOUTORES DAS ÁGUAS**. Seus pais ou responsáveis permitiram que você participe.

A pesquisa tem como objetivo principal verificar a prevalência de lesões precursoras do câncer do colo uterino e infecção pelo Papiloma vírus humano e agentes sexualmente transmissíveis nas mulheres da população ribeirinha de afluentes dos Rios Negro e Madeira atendidas pelo programa humanitário Doutores das Águas.

As adolescentes que irão participar desta pesquisa têm de 14 a 17 anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita nos povoados da região ribeirinha dos afluentes do rio Amazonas, onde as adolescentes se submeterão a uma coleta de exame de citologia cervico vaginal, o qual se fará um raspado do colo do útero com uma escova de cerdas plásticas, material este descartável e seu uso é considerado (a) seguro (a), mas é possível ocorrer risco mínimo de desconforto na hora da introdução do espécúlo vaginal.

Mas há coisas boas que podem acontecer como como o exame preventivo do câncer do colo do útero e pesquisa de agentes que podem causar doenças sexualmente transmissíveis.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Eu escrevi os telefones na parte de cima deste texto.

---

Assinatura do menor

---

Assinatura do (a) responsável

---

Assinatura do pesquisador (A)