



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MATHEUS MOURA DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) NA CAVIDADE ORAL,
OROFARINGE E COLO DO ÚTERO EM MULHERES DE JUAZEIRO DO NORTE,
CEARÁ, 2023**

FORTALEZA

2024

MATHEUS MOURA DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) NA CAVIDADE ORAL,
OROFARINGE E COLO DO ÚTERO EM MULHERES DE JUAZEIRO DO NORTE,
CEARÁ, 2023**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Doenças Infectoparasitárias
Orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Cunha Frota

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Matheus Moura dos.

Prevalência do Papiloma Vírus Humano (HPV) na cavidade oral, orofaringe e colo do útero em mulheres de Juazeiro do Norte, Ceará, 2023. / Matheus Moura dos Santos. – 2023.
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.

1. Neoplasias. 2. Epidemiologia. 3. Carcinogênese. I. Título.

CDD 571.9

MATHEUS MOURA DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) NA CAVIDADE ORAL,
OROFARINGE E COLO DO ÚTERO EM MULHERES DE JUAZEIRO DO NORTE,
CEARÁ, 2023**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Doenças Infecções Parasitárias
Orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Cunha Frota

Aprovada em: 20 / 08 / 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Cristiane Cunha Frota (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Renata Mirian Nunes Eleutério
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Carlos Henrique Morais de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Fátima pela oportunidade de realizar um sonho.

À minha orientadora Dra. Cristiane Frota por todo o apoio, orientação e dedicação que me proporcionou. Agradeço por sempre estar disponível para discutir minhas ideias, oferecer sugestões valiosas e me guiar nas fases mais desafiadoras do projeto. Sinto-me privilegiado por ter tido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação e sou imensamente grato por tudo o que aprendi.

À Soraya pela forma carinhosa e profissional me acolheu no Laboratório de Micobactérias da UFC. Seu conhecimento, paciência e disposição para ensinar foram fundamentais para o meu aprendizado e desenvolvimento técnico. Agradeço por ter dedicado seu tempo para me explicar cada procedimento, responder minhas dúvidas e compartilhar suas valiosas experiências.

Aos colegas alunos de Mestrado, Doutorado e Iniciação Científica do Laboratório de Micobactérias pelo apoio nos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia pela dedicação e empenho em compartilhar seu conhecimento, por inspirarem a curiosidade e por estimularem o pensamento crítico. Um agradecimento especial à Conceição Dornelas, Romélia Pinheiro e José Eleutério, pois são grandes inspirações para mim.

À Valéria, secretária da Pós-graduação em Patologia, pela paciência em tirar minhas inúmeras dúvidas.

Ao apoio de bolsa da Capes que possibilitou suporte para realização da pesquisa.

Aos meus amigos de Juazeiro do Norte por estarem ao meu lado nos momentos de dúvida, por acreditarem no meu potencial e por celebrarem comigo cada conquista, por menor que fosse.

À Felipe Luciano pelo apoio incondicional e pelo incentivo que me proporcionou durante esta jornada desafiadora. Cada palavra de encorajamento, cada gesto de apoio e cada momento de compreensão fizeram toda a diferença para mim.

Aos meus queridos avós, Socorro e Edmar, e a minha mãe Elisangela, por terem sido fundamentais em todos os momentos de minha vida, por todo incentivo e apoio, e exemplos de vida. Sou imensamente grato por todo o sacrifício e esforço que fizeram para que eu pudesse seguir meus sonhos e objetivos.

Dedico esta vitória a vocês!

RESUMO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é mundialmente estudado devido à sua relação com o câncer, principalmente o câncer colo do útero, cuja prevalência é alta em mulheres que residem em países em desenvolvimento como o Brasil. Estudos moleculares sobre cânceres de cavidade oral e orofaringe revelam a presença do DNA do HPV nesses tumores, o que comprova sua participação na carcinogênese oral. Mais de 200 tipos de HPVs já foram identificados e sequenciados geneticamente. Os genótipos do vírus são classificados de acordo com a potencial oncogênico, podendo ser de baixo risco ou alto risco. O principal objetivo deste estudo foi estimar a prevalência da infecção do HPV e de seus genótipos em mulheres do município de Juazeiro do Norte, Ceará. Trata-se de um estudo transversal analítico. O estudo contou com a participação de 166 mulheres que estavam presentes nas clínicas para realizar o seu exame ginecológico preventivo (Papanicolaou). Na ocasião, as informações sobre a pesquisa foram apresentadas para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e coleta das amostras. De cada participante foram coletadas amostras de três sítios anatômicos: mucosa jugal, orofaringe e colo do útero. A detecção e genotipagem do HPV foi por multiplex *nsted* PCR com primers que amplificam a região intergênica e detectam os genótipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 e 59. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R e do Excel. Na pesquisa da orofaringe, 26 participantes apresentaram resultado positivo para E6/E7 (18,0%). O genótipo mais prevalente foi o HPV 16 encontrado em 11,1% das participantes. Outros tipos identificados incluem HPV 33, HPV 52, HPV 56, HPV 58 e HPV 59. Na mucosa jugal, no teste de E6/E7, 27 (18,5%) das participantes foram positivas. O HPV 52 foi o tipo específico mais prevalente, encontrado em 8,9% das participantes, seguido do HPV 16 presente em 7,5%. Outros tipos identificados incluem HPV 58, HPV 33, HPV 56 e HPV 6/11. No teste de E6/E7 do colo do útero, tem-se que 27 (17,8%) das participantes apresentaram resultado positivo. Quanto aos tipos de HPV identificados, o HPV 52 foi o mais prevalente, encontrado em 9,9% das participantes. Outros tipos identificados incluem HPV 16, HPV 58, HPV 33, HPV 56 e HPV 6/11. Ao examinar a presença de HPV no colo do útero em relação à sua detecção na região oral, observamos que 52,8% das participantes que testaram positivo para HPV no colo do útero também tiveram resultado positivo para HPV na região oral. Por outro lado, entre aquelas que testaram negativo para HPV na região oral, 38,9% foram positivos para HPV no colo do útero. Foram comparados os grupos de mulheres que tiveram HPV positivo tanto no colo uterino quanto na mucosa oral ou orofaringe com as variáveis coletadas. Mulheres solteiras apresentaram uma proporção significativamente maior de HPV na mucosa jugal ou orofaringe e no colo uterino (38,6%) em comparação com mulheres casadas (20,4%). A razão de chances (RC) foi de 2,45 (IC 95%: 1,22 – 4,92). A prevalência do HPV, nos sítios anatômicos estudados nas mulheres de Juazeiro do Norte, mostrou-se semelhante ao observado no Brasil e no mundo. Os três genótipos mais frequentes na orofaringe, mucosa jugal e colo uterino das participantes foram os HPVs 16, 52 e 58.

Palavras-chave: Câncer. Epidemiologia. PCR. Vírus oncogênico.

ABSTRACT

The Human Papilloma Virus (HPV) is studied worldwide due to its association with cancer, particularly cervical cancer, which has a high prevalence among women in developing countries such as Brazil. Molecular studies on cancers of the oral cavity and oropharynx reveal the presence of HPV DNA in these tumors, demonstrating its involvement in oral carcinogenesis. More than 200 types of HPV have been identified and genetically sequenced. The virus genotypes are classified according to their oncogenic potential, and can be low-risk or high-risk. The main objective of this study was to estimate the prevalence of HPV infection and its genotypes in women from the municipality of Juazeiro do Norte, Ceará. This is an analytical cross-sectional study. The study involved 166 women who were at the clinics for their preventive gynecological examination (Pap smear). They were informed about the research, asked to sign an informed consent form, and had their samples taken. Samples were collected from three anatomical sites in each participant: jugal mucosa, oropharynx, and cervix. HPV was detected and genotyped using multiplex nested PCR with primers that amplify the intergenic region and detect genotypes 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58, and 59. Statistical analyses were conducted using R software and Excel. In the oropharynx survey, 26 participants tested positive for E6/E7 (18.0%). The most prevalent genotype was HPV 16, found in 11.1% of participants. Other identified types included HPV 33, HPV 52, HPV 56, HPV 58, and HPV 59. In the jugal mucosa, 27 participants (18.5%) tested positive for E6/E7. HPV 52 was the most prevalent specific type, found in 8.9% of participants, followed by HPV 16, present in 7.5%. Other identified types included HPV 58, HPV 33, HPV 56, and HPV 6/11. In the E6/E7 test of the cervix, 27 participants (17.8%) tested positive. Regarding the HPV types identified, HPV 52 was the most prevalent, found in 9.9% of participants. Other identified types included HPV 16, HPV 58, HPV 33, HPV 56, and HPV 6/11. When examining the presence of HPV in the cervix in relation to its detection in the oral region, we found that 52.8% of the participants who tested positive for HPV in the cervix also tested positive for HPV in the oral region. Conversely, among those who tested negative for HPV in the oral region, 38.9% were positive for HPV in the cervix. The groups of women who tested positive for HPV in both the cervix and oral mucosa or oropharynx were compared with the collected variables. Single women had a significantly higher proportion of HPV in the jugal mucosa, oropharynx, and cervix (38.6%) compared to married women (20.4%). The odds ratio (OR) was 2.45 (95% CI: 1.22 - 4.92). The prevalence of HPV in the anatomical sites studied in the women from Juazeiro do Norte was similar to that observed in Brazil and worldwide. The three most frequent genotypes in the oropharynx, jugal mucosa, and cervix of the participants were HPVs 16, 52, and 58.

Keywords: Cancer. Epidemiology. Oncogenic virus. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia do HPV, destacando a organização do genoma, as proteínas estruturais do capsídeo e o DNA associado a proteínas histonas.....	4
Figura 2	Prevalência dos tipos de HPV no mundo.....	6
Figura 3	Mecanismo de ação da vacina contra o HPV.....	7
Figura 4	Localização e municípios da Região Metropolitana do Cariri (RMC).....	15
Figura 5	Processo de coleta de dados e amostras biológicas.....	16
Figura 6	Microtubos com amostras coletadas da mucosa jugal e orofaringe.....	17
Figura 7	Kit de extração de DNA de células animais da Invitrogen.....	18
Figura 8	PCR multiplex em Termociclador GenePro (Bioer).....	19
Figura 9	Preparo do mix em capela de fluxo laminar (sala exclusiva para preparo de reação de PCR).....	21
Figura 10	Preparo da corrida eletroforética.....	21
Figura 11	Amplificação de amostras das participantes com os iniciadores GP-E6-3F, GPE7-5B e GP-E7-6B da região intergênica dos genes E6 e E7 do HPV.....	22
Figura 12	Amplificação de amostras com os iniciadores específicos Mix 1 (tipos 16, 18, 31, 45 e 59) do gene E6/E7 do HPV.....	23
Figura 13	Amplificação de amostras com os iniciadores específicos Mix 2 (tipos 6/11, 33, 52, 56 e 58) do gene E6/E7 do HPV.....	24

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Proteínas do HPV.....	4
Quadro 2	Classificação do HPV com relação ao risco oncogênico.....	5
Quadro 3	Composição do mix para a PCR E6 e E7 DO HPV.....	20
Quadro 4	Composição do mix para a PCR de tipagem do HPV.....	23
Tabela 1	Descrição do perfil sociodemográfico das 166 participantes do estudo, Juazeiro do Norte, Ceará.....	26
Tabela 2	Doenças prévias das participantes.....	27
Tabela 3	Uso de bebidas alcoólicas, cigarro e drogas.....	28
Tabela 4	Frequência das variáveis dos métodos contraceptivos e imunização contra HPV.....	29
Tabela 5	Frequência do resultado autodeclarado quando à positividade para HPV.....	30
Tabela 6	Frequência da positividade ao HPV na orofaringe.....	31
Tabela 7	Frequência de positividade ao HPV nas amostras de mucosa jugal.....	33
Tabela 8	Descrição da positividade ao HPV nas amostras de colo uterino.....	35
Tabela 9	Associação da positividade ao HPV na cavidade oral e orofaringe comparando com a imunização.....	38
Tabela 10	Associação da positividade ao HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo do útero.....	40
Tabela 11	Comparação das variáveis sociodemográficas por HPV na mucosa jugal ou orofaringe.....	42
Tabela 12	Doenças prévias das participantes por presença de HPV na região oral.....	43
Tabela 13	Uso de bebidas alcólicas com prevalência de HPV na mucosa jugal ou orofaringe.....	44
Tabela 14	Uso de contraceptivo e exame Papanicolaou por presença HPV na mucosa jugal ou orofaringe.....	45
Tabela 15	Variáveis sociodemográficas por HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino.....	46

Tabela 16	Doenças prévias das participantes por presença de HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino.....	47
Tabela 17	Uso de bebidas alcólicas com prevalência de HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino.....	48
Tabela 18	Uso de contraceptivo e exame Papanicolaou por presença HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCU -	Câncer de colo do útero
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
HPV -	Papilomavírus Humano
INCA -	Instituto Nacional de Câncer
IST -	infecções sexualmente transmissíveis
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
RMC -	Região Metropolitana do Cariri

SUMÁRIO

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS E TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia da infecção pelo HPV no mundo e no Brasil	2
1.2 Características do HPV	3
1.3 Classificação do HPV	5
1.4 Fatores socio-econômico-culturais de risco para HPV	6
1.5 Vacina para HPV	6
1.6 Relação do HPV com o câncer	7
1.6.1 Câncer de colo uterino	7
1.6.2 Câncer de cavidade oral e orofaringe	9
1.7 Detecção Molecular do HPV	10
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivos Específicos	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Tipo e período do estudo	13
4.2 Local do estudo	13
4.3 População do estudo e amostragem	14
4.3.1 Critérios de inclusão	14
4.3.2 Critérios de exclusão	14
4.4 Processo de coleta de dados e amostras biológicas	15
4.4.1 Coleta da mucosa jugal e orofaringe	16
4.4.2 Coleta do colo do útero	16
4.5 Transporte das amostras	17
4.7 Processamento das amostras	17
4.7.1 Extração e quantificação do DNA	17
4.7.2 PCR do controle interno - β -globina humana	18
4.7.3 Detecção do HPV por multiplex nested PCR	18
4.8 Análises estatísticas	24

4.9 Aspectos éticos	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Resultado da pesquisa na orofaringe e mucosa jugal	29
DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS	49
ANEXO I - PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP	57
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	60
APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO	62
APÊNDICE III – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, INVITROGEN)	64

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é mundialmente estudado devido a sua relação com o câncer, principalmente o de colo uterino, mas também está associado a câncer de pênis, vulva, vagina, anus, orofaringe entre outros (PESSOA, 2014). O HPV foi o primeiro vírus oncogênico a ser transmitido de forma experimental de uma pessoa para outra quando, em 1894, Licht se infectou propositalmente com material da verruga de seu irmão, observando o surgimento de uma verruga no local (ROMANOS *et al.*, 2015).

O HPV é um vírus de DNA que tem forte tropismo pelo epitélio das mucosas, podendo ser detectado em mucosas anogenital e bucal. A principal via de transmissão ocorre através do contato sexual desprotegido (MIRGHANI *et al.*, 2015).

Estudos moleculares sobre cânceres de cavidade oral e orofaringe revelaram a presença do DNA do HPV nesses tumores, o que comprova a participação do vírus na carcinogênese oral (PETITO *et al.*, 2017). O câncer de colo do útero (CCU), também relacionado à infecção pelo HPV, é altamente prevalente em mulheres que residem em países em desenvolvimento, como o Brasil (LIMA *et al.*, 2018; INCA, 2022). Quando diagnosticado e tratado precocemente há grandes chances de cura, pois esta neoplasia apresenta longo período até o surgimento de lesões neoplásicas (LIMA *et al.*, 2017).

A exposição ao HPV é algo recorrente e antigamente tinha pouca importância clínica, porém, esse pensamento mudou desde que foi identificado como “vírus tumoral”. O HPV pode ser transmitido de diferentes formas, mas geralmente ocorre por contato sexual: genital-genital, manual-genital, oral-genital, oral-oral ou até mesmo através de secreções contaminadas com a pele. Além disso, o vírus também pode ser transmitido de forma vertical, por via transplacentária ou ainda no momento do parto. (CALCAVECCHIA, 2018; SILVA *et al.*, 2017).

A infecção pelo vírus, na maioria dos casos é assintomática. Sendo assim, a infecção pode ser classificada em: 1 – Latente, quando o vírus está presente, mas a doença não se manifesta e só pode ser diagnóstica por métodos moleculares; 2 – Subclínica, mas existem lesões epiteliais que podem ser identificadas por exames, como o Papanicolaou; e 3 – Clínica, na qual as lesões são identificadas macroscopicamente (TRISTÃO, 2012).

A relação entre o HPV e o câncer levou a avanços tecnológicos com o desenvolvimento de técnicas moleculares. Tais técnicas permitem a identificação direta do vírus, mesmo em pacientes assintomáticos ou sem lesões celulares evidentes à microscopia. Um dos métodos mais utilizados é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica altamente sensível que detecta o vírus, inclusive, em níveis muito baixos de carga viral (SILVA *et al.*, 2015). A PCR consiste na amplificação seletiva de pequenas sequências-alvo do DNA, até um nível grande suficiente para permitir sua identificação. O procedimento é feito após coleta da amostra e extração do DNA. Esta técnica é realizada a partir de três etapas: desnaturação, anelamento e extensão (LAURENTINO *et al.*, 2017).

1.1 Epidemiologia da infecção pelo HPV no mundo e no Brasil

A infecção pelo HPV é considerada a infecção sexualmente transmissível mais diagnosticada no mundo. Acredita-se que a maioria dos indivíduos que se envolvem em atividade sexual será infectado pelo HPV pelo menos uma vez durante a vida. Desde o início da década de 1970 foi observada uma relação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões neoplásicas, especialmente no colo uterino e na orofaringe (SICHERO, 2020).

De acordo com estudo realizado por Vinodhini *et al* (2012), a infecção pelo HPV é mais prevalente em países menos desenvolvidos. Diferentes genótipos de alto risco oncogênico podem ser encontrados em lesões pré-malignas e malignas, principalmente os genótipos 16 e 18.

A prevalência do HPV pode variar nas diferentes regiões do mundo. Em uma metanálise realizada em cinco continentes, com 1 milhão de mulheres com citologia normal, as maiores prevalências foram descritas na África Subsaariana (24,0%), Europa Oriental (21,4%) e América Latina (16,1%) (BRUNI *et al.*, 2010). Em um outro estudo de metanálise realizado na América Latina com pacientes apresentando lesão de alto grau no colo uterino, é notado que houve uma prevalência de 46,5% para o HPV-16 e 8,9% para o HPV-18 (CIAPPONI, 2011).

Em um estudo multicêntrico realizado pelo Hospital Moinhos de Vento (Rio Grande do Sul) em parceria com o Ministério da Saúde para determinar a prevalência do HPV em diferentes regiões do Brasil, é observado, para o município de Fortaleza, prevalência de 51,8% de infecção por HPV (POP-BRASIL, 2020).

Um recente estudo brasileiro, realizado em 2020 em jovens não vacinados, detectou a presença de HPV de alto risco em 35,2% dos indivíduos, predominando nas mulheres.

Entretanto, ao analisar indivíduos sexualmente ativos, esse percentual chegou a 53,5% para todos os tipos de HPV, independentemente do sexo (WENDLAND *et al.*, 2020).

Em uma pesquisa exploratória realizada no município de Juazeiro do Norte – CE com mulheres diagnosticadas com HPV, é observado que as participantes possuíam pouco ou nenhum conhecimento sobre a transmissão do vírus. Além disso, o conhecimento sobre tratamento e prevenção foi mostrado equivocado. Entre as mulheres participantes, a maioria possuía baixo nível de escolaridade e idade entre 20 e 42 anos (BARRETO *et al.*, 2016).

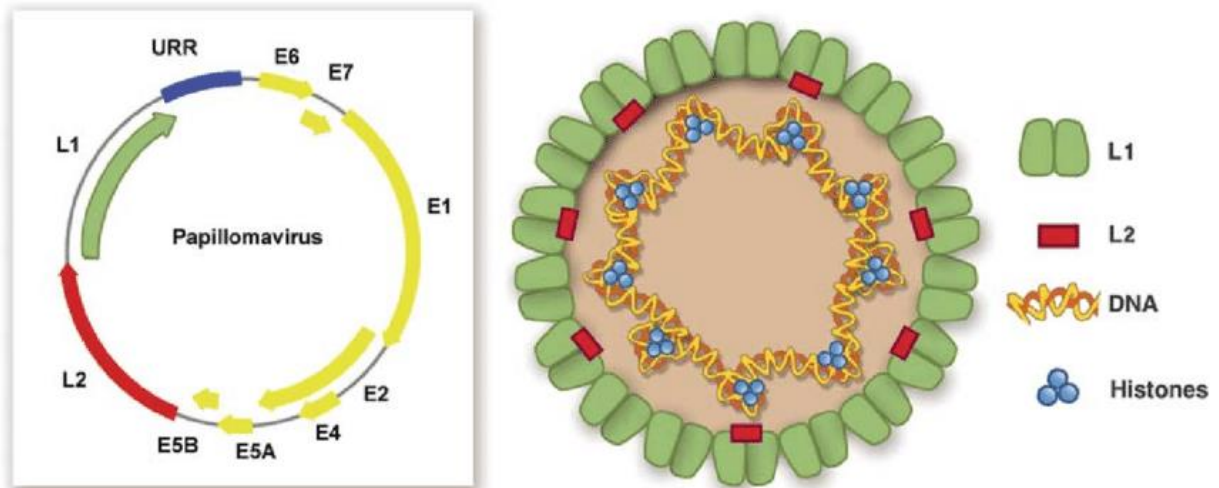
1.2 Características do HPV

O HPV é um vírus de DNA com aproximadamente 55 nm de diâmetro, pertencente à família *Papillomaviridae*, o qual possui potencial oncogênico (CALUMBY, 2020).

Morfologicamente o HPV é não envelopado, com capsídeo icosaédrico formado por 72 capsômeros. O capsídeo contém duas proteínas estruturais, sintetizadas pelo próprio genoma viral: a proteína maior (L1), que representa 80% da proteína viral total e a proteína menor (L2). Seu material genético é formado por um DNA circular de fita dupla associado a proteínas histonas, sendo responsável por codificar as proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas não estruturais, conforme evidenciado na figura 1 (ROOS, 2020).

O genoma do HPV possui aproximadamente 8000 pares de bases e nele são encontradas três regiões específicas: 1 – Região de Controle Longa (LCR, do inglês *Long Control Region*, ou URR, do inglês *Upstream Regulatory Region*), a qual não codifica, estando envolvida apenas na regulação da replicação e transcrição do DNA, 2 – Região Inicial (do inglês, *Early*), a qual contém genes que são transcritos inicialmente e dão origem às proteínas não estruturais que atuam nos processos de replicação, transcrição e alterações celulares (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), 3 – Região Tardia (do inglês, *Late*), na qual encontram-se os genes transcritos tardiamente após os da região E, pois originam as proteínas L1 e L2 que compõem a estrutura do capsídeo viral (figura 1) (AGUIRRE, 2018). O Quadro 1 a seguir destaca as funções das proteínas do HPV.

Figura 1 – Morfologia do HPV, destacando a organização do genoma, as proteínas estruturais do capsídeo e o DNA associado a proteínas histonas.



Fonte: Mohammed; Chaudhri; Bakshi; Akhtar (2016).

Quadro 1 – Proteínas do HPV.

Proteínas	Função
L1	Proteína principal do capsídeo (80%).
L2	Proteína do capsídeo (20%).
E1	Atua na replicação do DNA viral.
E2	Regula a transcrição.
E4	Altera o meio intracelular na célula hospedeira.
E5, E6 e E7	Estimula a proliferação e transformação celular.

Fonte: Elaborado pelo autor (de acordo com Neto e colaboradores, 2020, p. 160).

A proteína E6 liga-se, sequestra e degrada a p53, uma importante proteína supressora tumoral. A E7 liga-se e sequestra a proteína do retinoblastoma, pRb, também supressora tumoral, facilitando assim a liberação do fator de transcrição E2F permitindo a célula infectada prosseguir no ciclo celular e se dividir por mitose e indefinidamente (OLIVEIRA *et al.*, 2003; WENTZENSEN; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2007; MUNGER; JONES, 2015; ELAGALI *et al.*, 2021).

Durante o ciclo de vida viral, o HPV se replica extracromossomicamente, mas eventualmente se integra ao genoma do hospedeiro na região E1 e E2, onde mecanismos de hipermetilação podem interromper o gene E2, que tem a função de regular negativamente os oncogenes E6 e E7, promovendo a superexpressão de E6 e E7 e conseqüentemente, a capacidade de progredir para o câncer. As alterações causadas pela integração do vírus podem causar instabilidade genômica devido à interrupção do ciclo celular (ESTEVIÃO *et al.*, 2019).

1.3 Classificação do HPV

Mais de 200 tipos de HPVs já foram identificados e sequenciados geneticamente. Os diversos genótipos são classificados de acordo com a capacidade oncogênica, sendo eles de baixo risco oncogênico e de alto risco oncogênico. De acordo com a Organização Mundial de Saúde em documento publicado em associação com a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) em 2019, 14 tipos de HPVs são citados como sendo de alto risco oncogênico: HPV 16, 18, 31, -33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82; já os HPVs 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 são mencionados como sendo de baixo risco oncogênico. Há também genótipos que são considerados inespecífico/indeterminado e são citados na tabela a seguir (Quadro 2).

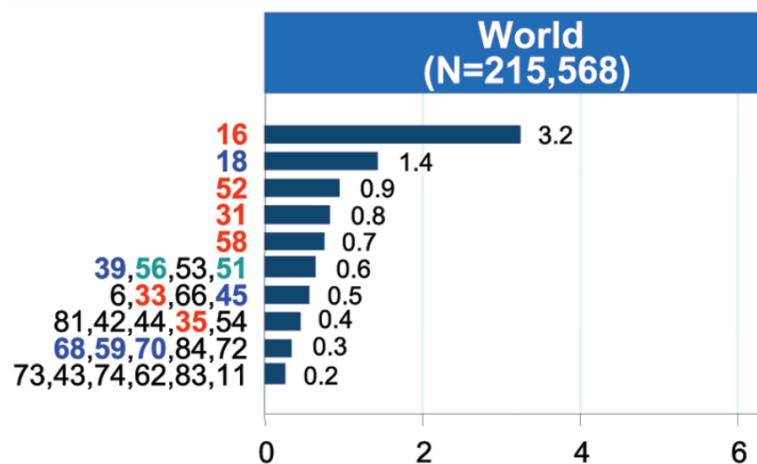
Quadro 2 – Classificação do HPV com relação ao risco oncogênico.

Risco Oncogênico	Tipo Viral
Alto risco	16, 18, 31, -33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82.
Baixo risco	6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81
Inespecífico/indeterminado	30, 34, 53, 57, 62, 64, 67 e 69.

Fonte: Elaborado pelo autor (a partir de REIS *et al.*, 2010).

Conforme relatado por Bruni *et al.* (2010) em seu estudo de metanálise, os tipos de HPVs mais prevalentes no mundo são os de alto risco oncogênico, com destaque para os tipos 16 e o 18 (figura 2).

Figura 2 – Prevalência dos tipos de HPVs no mundo.



Fonte: Bruni *et al.* (2010)

Dessa forma, apesar de existir mais de 200 tipos de HPV, os tipos 16 e 18, de alto risco oncogênico, são os mais notificados e, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são responsáveis por cerca de 70% dos cânceres cervicais e cerca de 90% de outros tipos de cânceres relacionados ao HPV.

1.4 Fatores socio-econômico-culturais de risco para HPV

Entre os fatores de risco para HPV, são descritas as baixas condições socioeconômicas e culturais, entre elas: nível de escolaridade, renda familiar, número de residentes, tipo de habitação, estado civil, comportamento sexual, tabagismo ativo e passivo, higiene íntima inadequada, uso prolongado de contraceptivos orais, multiparidade, carências nutricionais (VINODHINI, 2011).

Outro fator considerável é o estresse psicológico. Estudos realizados na Croácia têm relacionado o estresse psicológico com recorrência de infecções com o HPV, sendo justificado pela redução na resposta Th1 durante o estado do estresse (CVITANOVIĆ *et al.*, 2020 e 2021).

CALPONI e colaboradores (2020) afirmam que a prevalência do HPV e de seus genótipos difere de acordo com a região geográfica e estão relacionadas com a desigualdade socioeconômica, com a densidade populacional e até mesmo com acesso aos serviços de saúde.

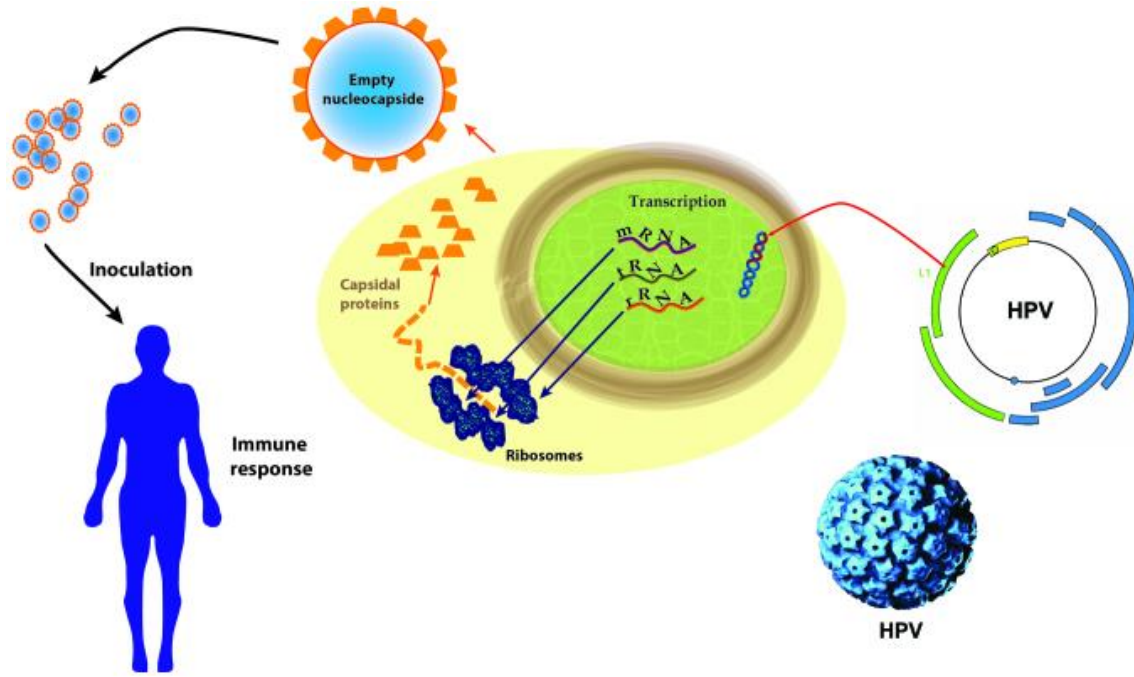
1.5 Vacina para HPV

O método profilático considerado mais eficaz é a vacinação contra o HPV. Três tipos de vacinas já foram desenvolvidos para prevenir a infecção. A vacina quadrivalente (Gardasil®) foi liberada para comercialização em 2006 e oferece proteção para os tipos 6, 11, 16 e 18; a vacina bivalente (Cervarix®) protege contra os tipos 16 e 18 e foi disponibilizada em 2009; já a vacina nonavalente (Gardasil®) foi disponibilizada em 2014 e oferece proteção para os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (MARKOWITZ, *et al.*, 2007; CDC, 2010; PETROSKY *et al.*, 2015).

As vacinas preventivas contra o HPV são desenvolvidas através da técnica de DNA recombinante e são compostas por partículas que se assemelham à estrutura do capsídeo viral, porém não contêm material genético (figura 03). Apesar de não serem infecciosas, essas partículas têm a capacidade de promover uma resposta imunológica protetora no hospedeiro através da produção de anticorpos neutralizantes que atuam contra a proteína L1 do capsídeo.

Essa resposta é mais intensa do que aquela gerada pela infecção natural (CARTER; DING; ROSE, 2011).

Figura 3 – Mecanismo de ação da vacina contra o HPV.



Fonte: BODA, *et al.*, 2018.

1.6 Relação do HPV com o câncer

O HPV chama a atenção devido ao seu potencial oncogênico, sendo capaz de integrar seu DNA ao da célula e promover a proliferação e alterações malignas. O HPV é capaz de promover o desenvolvimento de neoplasias em células do colo do útero e da orofaringe, e estudos recente têm sugerido, fortemente, essa associação com as neoplasias epidermóides de boca (MULLER; TILAKARATNE, 2022; PALLIS *et al.*, 2013; PRIGGE *et al.*, 2017).

Diante disso, é de extrema importância conhecer a biologia desse vírus, bem como realizar pesquisas que forneçam dados para promover o avanço terapêutico. Ainda mais, qualquer esforço populacional que venha a reduzir os casos de infecção, lesões e cânceres também é de suma importância (AMARAL, 2015).

1.6.1 Câncer de colo uterino

O tumor mais discutido relacionado ao HPV é o de colo uterino e continua sendo uma das principais causas de morte por câncer em mulheres em muitos países menos desenvolvidos (SIEGEL, *et al.*, 2014).

O câncer de colo do útero representa, em todo o mundo, um grave problema de saúde pública, atingindo principalmente mulheres de baixo nível socioeconômico e de vida sexual ativa (GONZALES *et al.* 2021). Estudos epidemiológicos indicam que é o quarto tipo de câncer que mais afeta a população feminina em todo o mundo e, segundo o INCA (INCA, 2021), é o terceiro mais frequente entre as mulheres no Brasil, ficando atrás do câncer de mama e do câncer colorretal.

Na maioria das mulheres, a infecção por HPVs de baixo e alto risco oncogênico se resolve de dois a cinco anos, sem que haja manifestações ou sequelas. Contudo, as lesões persistentes originadas por HPVs de alto risco estão associadas ao câncer (KOLIOPOULOS, *et al.*, 2017).

A infecção por HPVs de alto risco pode resultar em alterações no epitélio cervical, contribuindo com o aparecimento de lesões pré-malignas, com progressão para lesões malignas e mais tardiamente, câncer e invasão. A persistência da infecção é um importante fator que leva a invasão neoplásica (SCHIFFMAN *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2015). Esse processo é lento e pode levar cerca de 10 anos ou mais para ocorrer (SASLOW *et al.*, 2012). Para que a infecção persista, é necessário imunotolerância local no ambiente, favorecendo a evasão viral e a supressão das respostas imunes inatas e adaptativas (FERNANDES *et al.*, 2015; WILSON *et al.*, 2013).

O HPV 16 tem sido relacionado a cerca de 50% dos casos de câncer cervical em todo o mundo, na sequência vem o HPV 18, sendo o segundo mais detectado nesses tumores. Diante disso, os HPVs 16 e 18 são os principais tipos detectados em amostras colhidas de câncer de colo uterino, estando também associados a câncer de vulva, vagina e anus (PETRY, 2014).

Estudos recentes indicam que os homens são reservatórios para a transmissão do HPV para as mulheres, devido à ausência de sinais e sintomas, o que contribui para a persistência da infecção, favorecendo o desenvolvimento de cânceres associados ao HPV (RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, 2018).

O exame citopatológico do colo uterino, ou simplesmente Papanicolaou, é um procedimento simples de ser realizado e, na maioria dos casos, não provoca dor durante sua realização. O objetivo desse exame é rastrear alterações nas células do colo uterino a fim de identificar de forma precoce a lesão pré-invasora (CARTAXO, 2018). O nome vem de seu

idealizador, o médico grego Georgios Nicholas Papanicolaou (1883-1962), considerado o pai da citopatologia.

A não realização do Papanicolaou é uma prática comum entre as mulheres, de acordo com Sena, Souza e Gradella (2018), os principais motivos que levam a não realização são vergonha e a dificuldade para marcação de consulta. É sabido, inclusive, que muitas mulheres desconhecem a importância do método na prevenção do câncer de colo do útero. Ações sociais educativas são de extrema importância para provocar mudanças no comportamento dessas mulheres.

A histopatologia é o exame considerado padrão-ouro para o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. O exame é realizado com amostras de tecidos retiradas de uma região onde se há suspeita de lesão ou malignidade e é baseada na observação da morfologia do tecido e das células. É um procedimento de grande importância, pois é nele que se baseiam as decisões terapêuticas, além de possibilitar a identificação de alterações citopáticas causadas pelo HPV (SOUZA, 2016).

1.6.2 Câncer de cavidade oral e orofaringe

Por outro lado, o câncer na região oral engloba uma variedade de neoplasias de causas multifatoriais que podem acometer tanto a mucosa jugal como a orofaringe. O câncer de cavidade oral e orofaringe está entre os dez mais comuns no mundo e os vírus oncogênicos, como os HPVs de alto risco, são um dos fatores de risco para o seu desenvolvimento (VANSHIKA *et al.*, 2021). Outros fatores de risco consideráveis para o surgimento de tumores nesses sítios anatômicos são o tabagismo, o alcoolismo, hábitos de higiene bucal, irritação crônica dos tecidos orais, alimentação e fatores ocupacionais (XAVIER *et al.*, 2020).

O tabagismo, o etilismo e a infecção pelo HPV são os fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento de tumores na cavidade oral e orofaringe (KREIMER *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 2009). A prática do tabagismo em conjunto com o etilismo, eleva esse risco (ZHAO *et al.*, 2009). Entretanto, com o desenvolvimento de campanhas sociais contra o tabagismo e o consumo abusivo de álcool no Brasil e no mundo, o número de casos de câncer oral associado a infecção pelo HPV vem ganhando destaque (D'SOUZA *et al.*, 2014).

Muitas lesões benignas que afetam a região oral, como o papiloma escamoso oral, estão associadas a HPVs de baixo risco, principalmente os tipos 6 e 11, que possuem baixo poder de transformação maligna. No entanto, ainda está longe o estabelecimento preciso do real papel

do HPV em lesões proliferativas e pré-neoplásicas no câncer oral, pois há significativa divergência de resultados apresentados (FERRARO *et al.*, 2011)

O mecanismo de transmissão do HPV para a cavidade oral não é bem esclarecido. Acredita-se que a prática do sexo orogenital é uma forma importante de contágio. Outra via discutida é através da inoculação a partir de lesões cutâneas para outro indivíduo ou autoinoculação (ESQUENAZI *et al.*, 2010).

O exame físico oral é de extrema importância para o diagnóstico do câncer de cavidade oral e orofaringe. As lesões cancerígenas na boca e na orofaringe geralmente são assintomáticas nos estágios iniciais e normalmente, o paciente não apresenta queixas, o que torna o exame físico essencial para identificação das alterações (INCA, 2022). Recomenda-se a realização da biópsia em casos de suspeita de malignidade, lesão persistente há duas semanas ou mais, sem etiologia definida, necessidade de confirmação de hipótese diagnóstica, lesão que não responde à conduta clínica rotineira, entre outros (HUPP; ELLIS III; NEVILLE *et al.*, 2016; PRADO; SALIM, 2018).

1.7 Detecção Molecular do HPV

Os testes moleculares são capazes de detectar os vírus até mesmo em pacientes assintomáticos e podem auxiliar de forma eficaz no combate do câncer. Trata-se de métodos sensíveis, específicos e precisos no diagnóstico e os mais utilizados para detecção do HPV são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Captura Híbrida (CAVALCANTE, 2017).

A PCR é uma forma eficaz de diagnosticar precocemente o câncer uterino, por exemplo. É uma técnica molecular que permite identificar a presença do vírus em amostras colhidas do epitélio cervical ou de outro local de interesse. Com essa técnica, é possível amplificar sequências específicas do DNA viral, ainda na fase latente, antes mesmo do surgimento de lesões que podem ser visualizadas per exames não moleculares. Dessa forma, esse teste mostra-se altamente sensível e permite identificar a infecção com o vírus quiescente (OLIVEIRA, 2017).

Portanto, a sensibilidade e especificidade da PCR, seja isoladamente ou em conjunto com as técnicas não moleculares, possibilita a detecção precoce de possíveis alterações que possam levar ao câncer, influenciando positivamente nos resultados e contribuindo de forma significativa na qualidade de vida das pacientes (SOUZA, 2016).

A captura híbrida é uma técnica que detecta a carga viral, refletido no número de células presente na amostra, entretanto, essa técnica não é capaz de identificar o tipo viral específico

presente. Por determinar exclusivamente a carga viral com base na quantidade de células, a captura híbrida depende de boas condições de coleta da amostra. Essa técnica se baseia na hibridização do DNA viral com o uso de sondas específicas (SILVA *et al.*, 2015).

Os híbridos formados durante o teste são detectados através de reação enzima-substrato e a leitura é feita por quimioluminescência, onde a intensidade da luz é proporcional à carga do DNA viral e é medida por um quimioluminômetro (RAMOS, 2013).

Portanto, compreender a diversidade genotípica do HPV é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento. O aumento da conscientização e o incentivo à vacinação são ferramentas-chave na luta contra a disseminação desse vírus, com potencial de salvar milhões de vidas e reduzir o impacto social e econômico das infecções relacionadas ao HPV.

2 JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos no Brasil são realizados em unidades de referência localizados nas capitais das unidades federativas. Estudos que avaliam a prevalência de genótipos do HPV no colo do útero, cavidade oral e orofaringe em cidades do interior do Brasil são raros. No PubMed encontramos apenas três publicações de estudos conduzidos em cidades do interior do Brasil: duas publicações em Campos dos Goitacazes, Rio de Janeiro (KURY *et al.*, 2022; KURY *et al.*, 2021) e outra em Canoas, Rio Grande do Sul (SOSSAUER *et al.*, 2014). Portanto, não há estudos de prevalência da infecção por HPV publicados na Região Metropolitana do Cariri (RMC), situada no interior do Ceará. Dessa forma, torna-se importante estudar a prevalência desse vírus nessa população que vive longe dos grandes centros urbanos.

Em estudo descritivo realizado na cidade de Juazeiro do Norte, Ceará, no grande centro da Região do Cariri, por Lima *et al.* (2020), mostrou que há uma deficiência de conhecimento em relação ao HPV.

Existe carência de informações da prevalência do HPV em diferentes regiões geográficas do Brasil e da prevalência em outros sítios anatômicos além do colo do útero, assim como de estudos que pesquisem na mesma população em diferentes regiões anatômicas (COLPANI *et al.*, 2020).

Identificar os genótipos do HPV mais recorrentes na região e o perfil epidemiológico da população afetada mostra-se uma estratégia eficaz para a criação de campanhas educacionais, com o intuito de qualificar o conhecimento e demonstrar a importância da prevenção e da vacinação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estimar a prevalência e identificar fatores associados a infecção por genótipos do HPV na mucosa jugal, orofaringe e colo uterino de mulheres no município de Juazeiro do Norte, Ceará.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever os dados demográficos, laboratoriais e comportamentais das participantes associadas com a infecção pelo HPV.
- Determinar a prevalência e os tipos de HPV na mucosa jugal, orofaringe e colo uterino das participantes.
- Estimar a prevalência do HPV nas participantes relacionando com as variáveis sociodemográficas, clínicas e aos hábitos de vida.
- Caracterizar a relação entre o HPV identificado na mucosa jugal e orofaringe e os genótipos identificados no colo uterino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo e período do estudo

Trata-se de um estudo de caráter transversal analítico, que visa estabelecer o perfil da infecção por 11 tipos de HPVs (6/11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 e 59) na mucosa jugal, orofaringe e colo uterino. As coletas ocorreram durante um período de doze meses entre os anos de 2022 e 2023.

4.2 Local do estudo

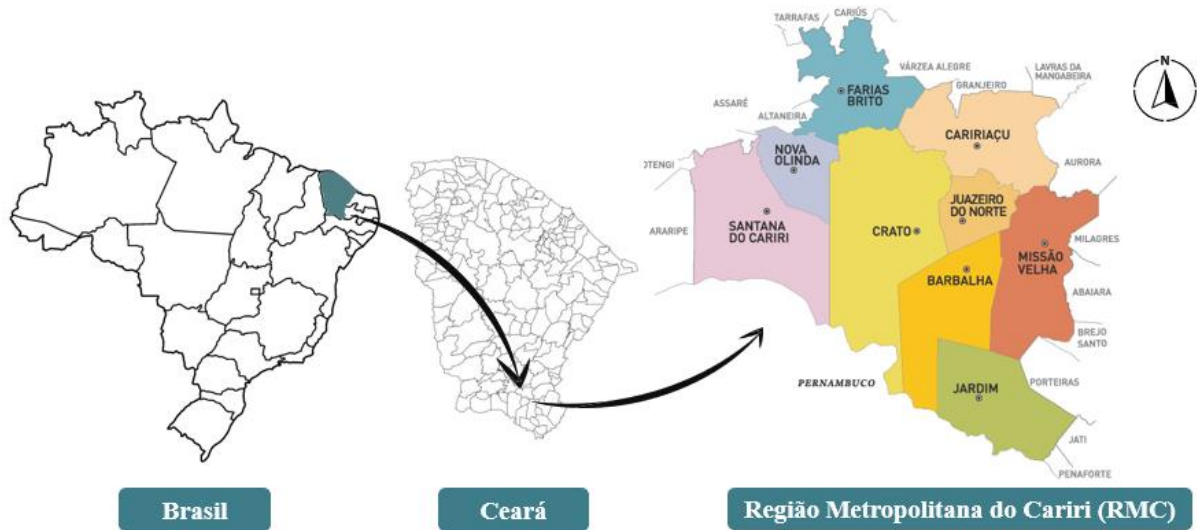
A coleta do material biológico foi realizada no município de Juazeiro do Norte, Ceará, nas instituições descritas abaixo:

- Centro de Diagnóstico BioLab
- Vidanalise Centro de Diagnóstico

BioLab e Vidanalise são clínicas particulares localizadas em Juazeiro do Norte, cidade mais habitada do interior do Ceará, sendo a principal da Região Metropolitana do Cariri (RMC). As clínicas recebem diariamente mulheres de toda a Região do Cariri para realizar exames laboratoriais, consultas médicas e o exame preventivo do câncer de colo do útero.

Juazeiro do Norte, segundo dados do IBGE (2022), possui área territorial de 258,788 km² e um total de 286.120 habitantes. A RMC está a cerca de 500 km da capital Fortaleza e atualmente, é composta por nove municípios: Juazeiro do Norte, Crato, Barbalha, Jardim, Missão Velha, Caririaçu, Farias Brito, Nova Olinda e Santana do Cariri, conforme a figura 4. A RMC possui uma área total de 5.456,01 km² (IBGE, 2010). Os testes para análise molecular dos materiais foram realizados no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, Ceará.

Figura 4 – Localização e municípios da Região Metropolitana do Cariri (RMC).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.3 População do estudo e amostragem

As participantes do estudo foram mulheres que buscaram realizar seu exame preventivo nas clínicas do estudo, onde, na oportunidade, foi apresentada a pesquisa para posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e coleta das amostras.

O estudo contou com 166 participantes, através de uma amostragem não probabilística por conveniência. De cada participante foram coletadas amostras de três sítios anatômicos: mucosa jugal, orofaringe e colo do útero.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram convidadas a participar do estudo, mulheres com idade igual ou superior a 18 anos que estavam presentes nas clínicas do estudo e que fossem realizar seu exame preventivo naquele momento. Todas as mulheres incluídas nesse estudo assinaram o TCLE.

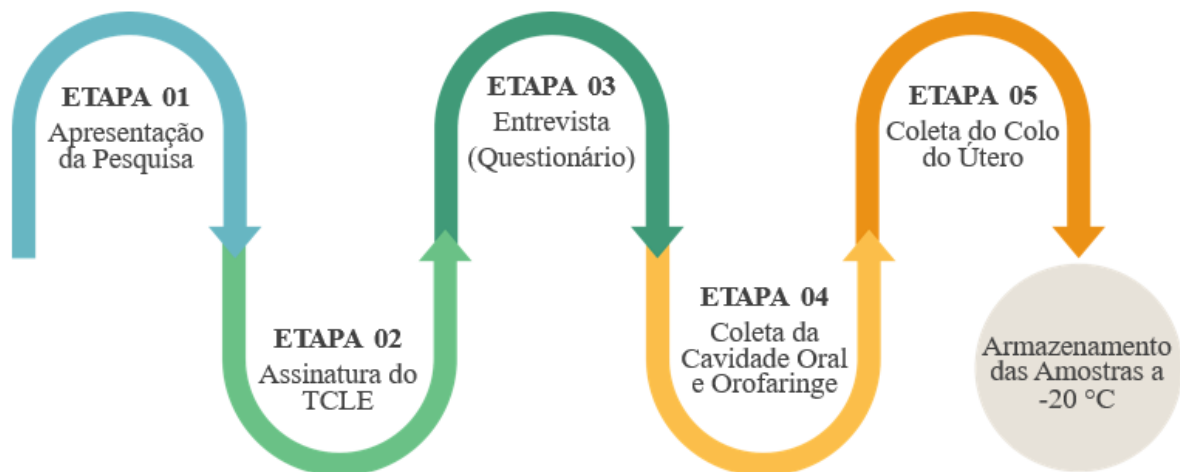
4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as participantes que se negaram a fornecer as informações necessárias para preenchimento do questionário e que tivessem realizado tratamento prévio de câncer (quimioterapia e/ou radioterapia). As participantes com amplificação negativa ao gene da β -globina humana foram excluídas das análises bivariadas.

4.4 Processo de coleta de dados e amostras biológicas

O processo de coleta dos dados e das amostras biológicas ocorreu a partir do fluxograma a seguir.

Figura 5 – Fluxograma do processo de coleta de dados e amostras biológicas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Etapa 01 – Apresentação da Pesquisa: Seguindo as normas éticas, todo o processo da pesquisa foi apresentado as participantes, incluindo seus riscos e benefícios.

Etapa 02 – Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): Um momento foi reservado para a leitura minuciosa e assinatura do termo pelas participantes.

Etapa 03 – Entrevista: Após assinatura do Termo, um questionário foi aplicado com as participantes para coleta de informações sociodemográficas, laboratoriais e sobre os hábitos de vida. O questionário encontra-se no Apêndice II.

Etapa 04 – Coleta da Mucosa Jugal e Orofaringe: A coleta da mucosa jugal foi realizada utilizando escova citológica, enquanto a coleta da orofaringe foi realizada utilizando swab. O processo de coleta está descrito detalhadamente a seguir.

Etapa 05 – Coleta de Colo do Útero: A coleta da amostra de colo uterino foi realizada utilizando escova endocervical. O processo de coleta está descrito detalhadamente a seguir.

4.4.1 Coleta da mucosa jugal e orofaringe

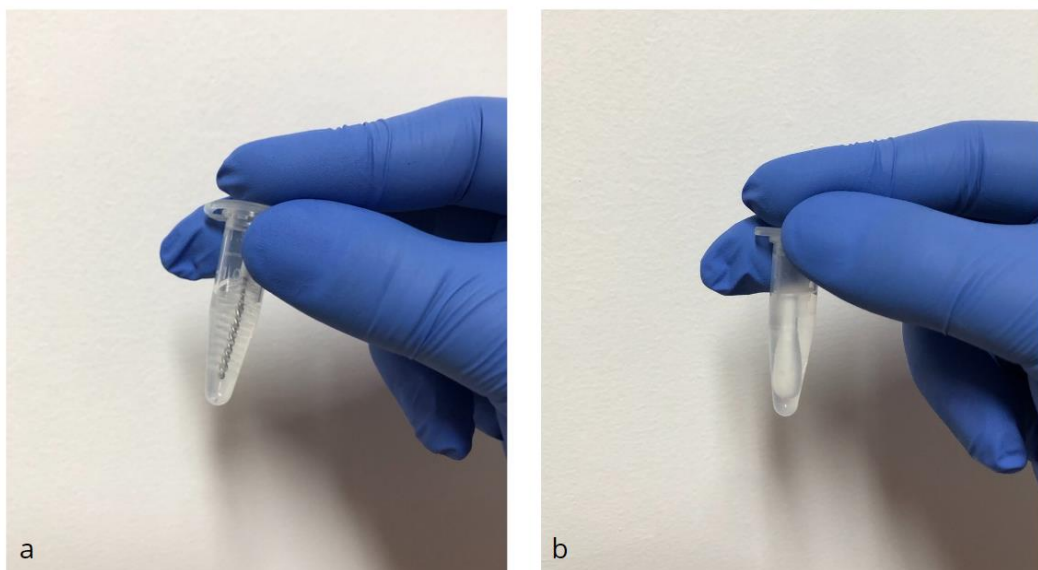
Para coletar as células da mucosa jugal localizada na cavidade oral, foram utilizadas escovas citológicas estéreis da marca KOLPLAST[®]. As cerdas foram friccionadas na mucosa jugal direita e esquerda em movimentos de cima para baixo. Para atender o protocolo de coleta, as escovas foram imersas em 0,5 ml de solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 e em seguida os microtubos foram armazenados a -20°C, conforme mostra a figura 6a.

Para coletar as células da orofaringe, foram utilizados swabs estéreis da marca KOLPLAST[®]. Os swabs foram friccionados contra as paredes laterais da orofaringe em movimentos rotacionais, evitando tocar nas tonsilas e úvula. Os swabs também foram imersos em 0,5 ml de solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 e armazenados em -20°C, conforme mostra a figura 6b.

4.4.2 Coleta do colo do útero

A coleta do colo uterino foi realizada utilizando escova cervical estéril da marca KOLPLAST[®]. As escovas foram imersas em 0,5 ml de solução tampão Tris-EDTA pH 8,0 e em seguida os microtubos foram armazenados a -20°C.

Figura 6 (6a e 6b) – Microtubos com amostras coletadas da mucosa jugal e orofaringe.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.5 Transporte das amostras

As amostras foram transportadas de Juazeiro do Norte a Fortaleza em caixa térmica contendo gelo reciclável. Todas as amostras recebidas pelo Laboratório de Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram registradas em uma planilha no aplicativo Excel. As amostras biológicas foram mantidas congeladas a -20°C até o momento do processamento.

4.7 Processamento das amostras

4.7.1 Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA dos raspados da mucosa jugal, orofaringe e do colo do útero, foi empregado o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) (figura 7), seguindo o protocolo (apêndice III) estabelecido pelo fabricante para extração de DNA de células humanas. Antes da extração, as amostras foram descongeladas naturalmente à temperatura ambiente.

Figura 7 – Kit para extração de DNA de células animais da Invitrogen.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A quantificação do DNA foi realizada em nanoespectrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific-Massachusetts, EUA), sendo cada microtubo identificado com sua respectiva concentração de DNA. As amostras de DNA foram mantidas congeladas -20°C , até a realização da PCR.

4.7.2 PCR do controle interno - β -globina humana

Todas as amostras foram analisadas quanto a presença de células humanas, utilizando o padrão de amplificação do gene de proteína β -globina. Foram empregados os iniciadores do gene da β -globina PC04 e GH20 gerando produto de 268 pb conforme protocolo descrito por Sotlar *et al.* (2004), mostrando o gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1 \times de produtos de amplificação da região L1 do HPV e do controle interno do gene β -globina (268 pb). As amostras β -globina DNA positivas foram submetidas à amplificação e tipagem do HPV, em reações de multiplex nested PCR. As PCRs foram realizadas em Termociclador GenePro (Bioer), conforme mostra a figura 8 (a-b).

Figura 8 (8a e 8b) – PCR multiplex em Termociclador GenePro (Bioer),



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.7.3 Detecção do HPV por multiplex nested PCR

A detecção do HPV foi realizada a partir do DNA purificado, por meio da técnica descrita por Sotlar *et al.* (2004), utilizando um conjunto de iniciadores que amplificam a região intergênica das proteínas E6 e E7 do HPV, com produto variável de 572 a 679 pb. A variação de peso molecular do produto de amplificação da PCR E6 e E7 ocorre devido às variações na sequência intergênica entre os tipos de HPV.

Para a reação de multiplex foi preparado um mix dos iniciadores GP-E6-3F, GPE7-5B e GP-E7-6B na concentração final de 50 pmol. O quadro 3 apresenta os componentes que foram usados para a preparação do mix.

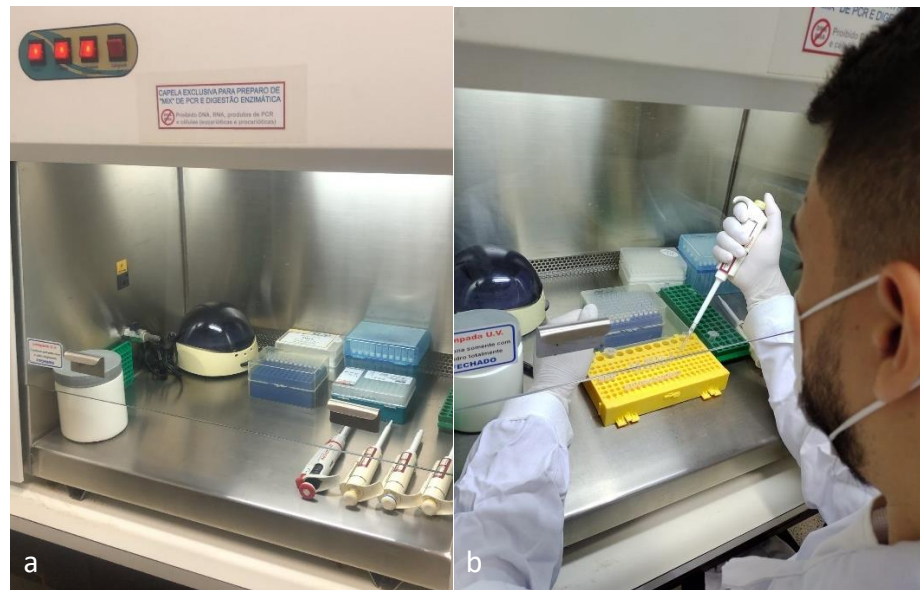
Quadro 3 – Composição do mix para a PCR E6 e E7 DO HPV.

PCR E6/E7	Volume (µL)	M1 (x22)	M2 (x3)
Go Taq Green Master Mix M712C PROMEGA	12,5	275	37,5
Primer mix GP-E6-3F/5B/6B, 50 pmol, final 0.1-1.0 µM (0,5 pmol) (07/11/23)	0,25	5,5	0,75
Amostra DNA paciente, usar 200 ng total ou Controle positivo: 100 ng/µL	2 C. Positivo	10 (220)	2 (6)
Nuclease free water	10,25	49,5	30,75
Volume calculado	25	550	75
Volume nos microtubos		15	23

Fonte: Sotlar *et al.* (2004),

O preparo do mix foi realizado em câmara de fluxo laminar em sala isolada (figura 9 a-b). Foi realizada a alíquotagem do mix em frascos de 0,2 mL. As respectivas quantidades de DNA de cada amostra foram adicionadas posteriormente em área reservada. Os microtubos contendo o mix e o DNA foram transferidos para o Termociclador GenePro (Bioer) para a amplificação do DNA. A amplificação ocorreu nas seguintes condições – desnaturação inicial a 94 °C por 4min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 40 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os resultados das PCRs da região intergênica E6 e E7 foram considerados como positivo ou negativo.

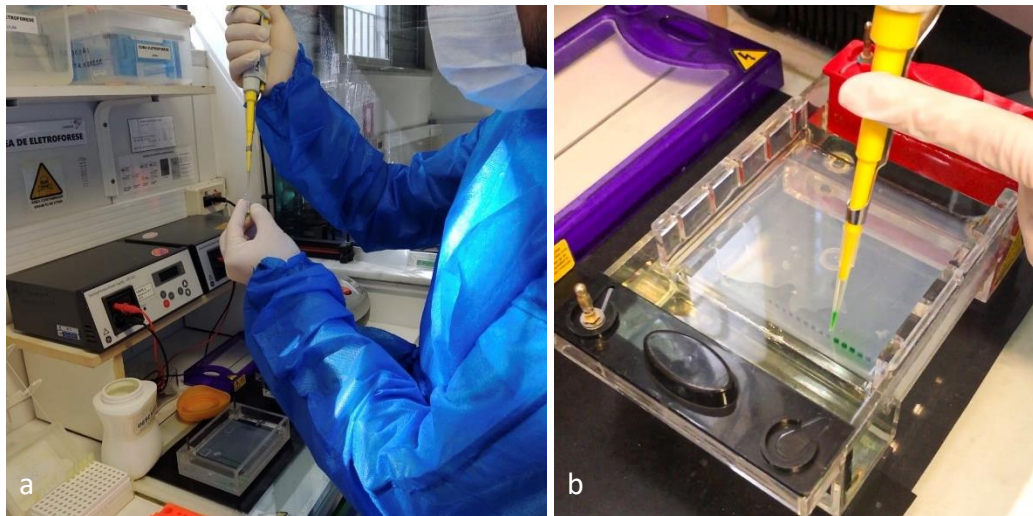
Figura 9 (9a e 9b) – Preparo do mix em capela de fluxo laminar (sala exclusiva para preparo de reação de PCR).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

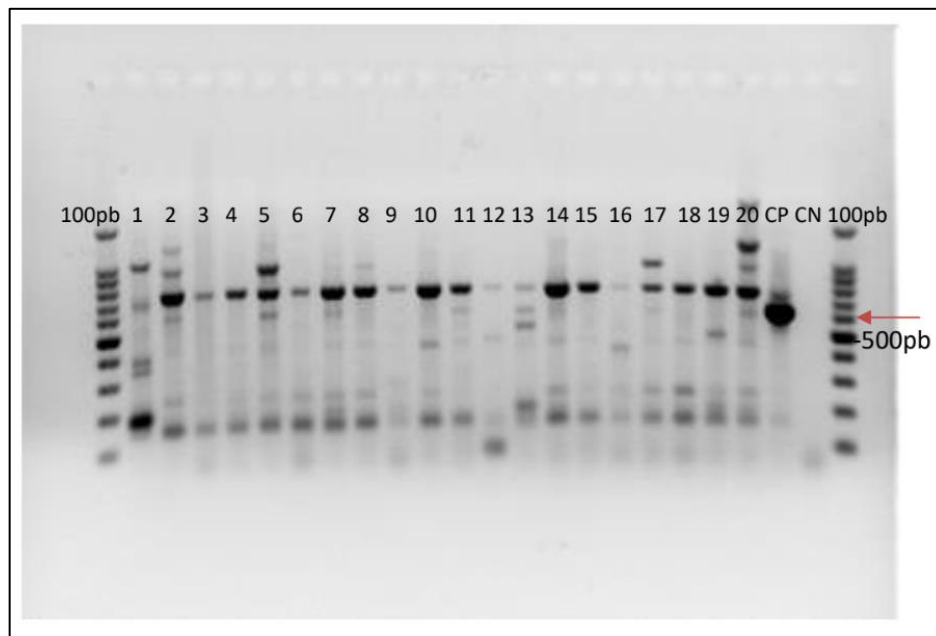
Para a corrida eletroforética foi empregado 10 μL do produto de amplificação em gel de agarose a 1,5% contendo 2,5 μL de solução de brometo de etídio 10 mg/mL. Foi adicionado 5 μL de marcador de 100 pb (Sinapse Inc.) para análise do produto de amplificação de E6 e E7 (figura 10). Por fim, após as corridas eletroforéticas, os géis de agarose foram revelados em transiluminador UV a 302 nm com ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®) e os produtos foram analisados por comparação de seus pesos moleculares (Sotlar *et al.*2004). Um exemplo de produto da região intergênica de E6/E7 é evidenciado na figura 11.

Figura 10 (10a e 10b) – Preparo da corrida eletroforética.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 11 – Amplificação de amostras das participantes com os iniciadores GP-E6-3F, GPE7-5B e GP-E7-6B da região intergênica dos genes E6 e E7 do HPV.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A reação subsequente de tipagem foi realizada a partir de dois mixes, contendo iniciadores para HPV de baixo e alto risco oncogênico. O mix HPV I continha iniciadores para os tipos 16, 18, 31, 45 e 59, enquanto o mix HPV II abrange os tipos 6/11, 33, 52, 56 e 58.

Em cada reação foi empregado, como controle positivo de amplificação, DNA de HPV de amostra de condiloma vulvar positiva para o HPV e, como controle negativo, utilizou-se água livre de nuclease substituindo o DNA.

Os produtos da PCR E6 e E7 foram empregados para a tipagem do HPV. Foram preparados dois mixes de iniciadores, HPV I e II, na concentração de 2 pmol cada. O mix HPV I apresentou produtos de amplificação que variavam de 151 a 457 pb, enquanto o mix HPV II variava de 181 a 398 pb, de acordo com Sotlar et al. (2004). Os resultados da tipagem do HPV foram apresentados como negativo ou o tipo específico de HPV.

As reações de amplificações ocorreram no Termociclador Bioer de acordo com as orientações previamente publicadas (Sotlar et al.2004), com desnaturação inicial a 94 °C por 4min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 4 minutos. O quadro 4 descreve os componentes dos mixes de tipagem do HPV.

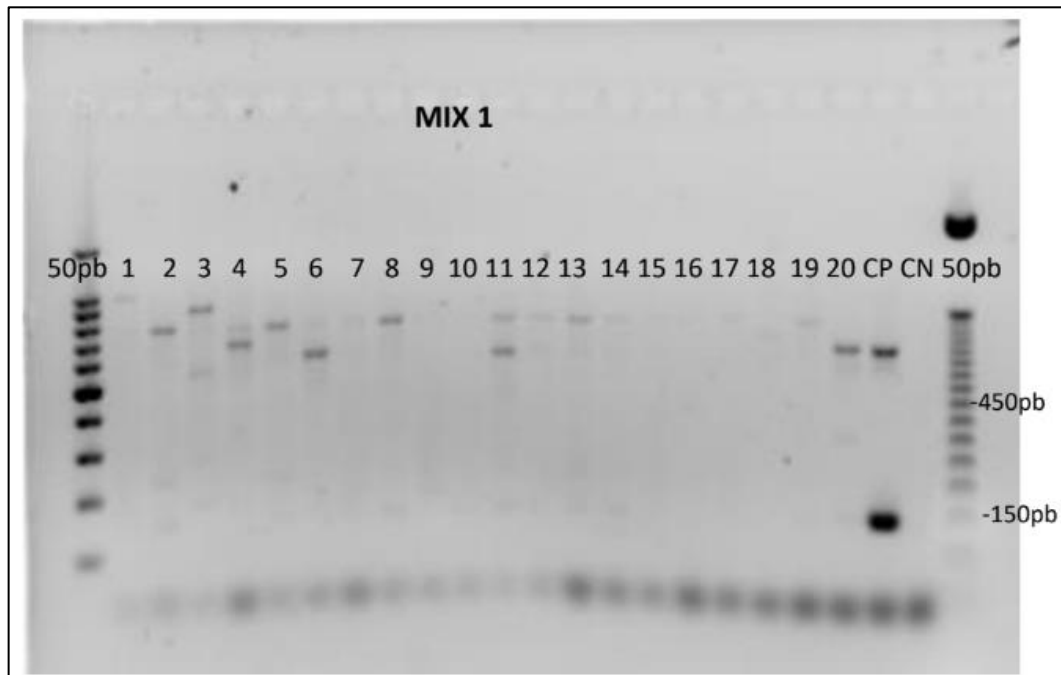
Quadro 4 – Composição do mix para a PCR de tipagem do HPV.

Mix HPV tipagem	Volume (µL)	Mix (x24)
Go Taq Green Master Mix M712C PROMEGA	12,5	300
Mix HPV I ou II (25 pmol)	0,5	12
2µL do produto E6/E7	2,0	48
Nuclease free water	10,0	240
Volume Final	25	600
Volume nos microtubos		23

Fonte: Sotlar et al. (2004),

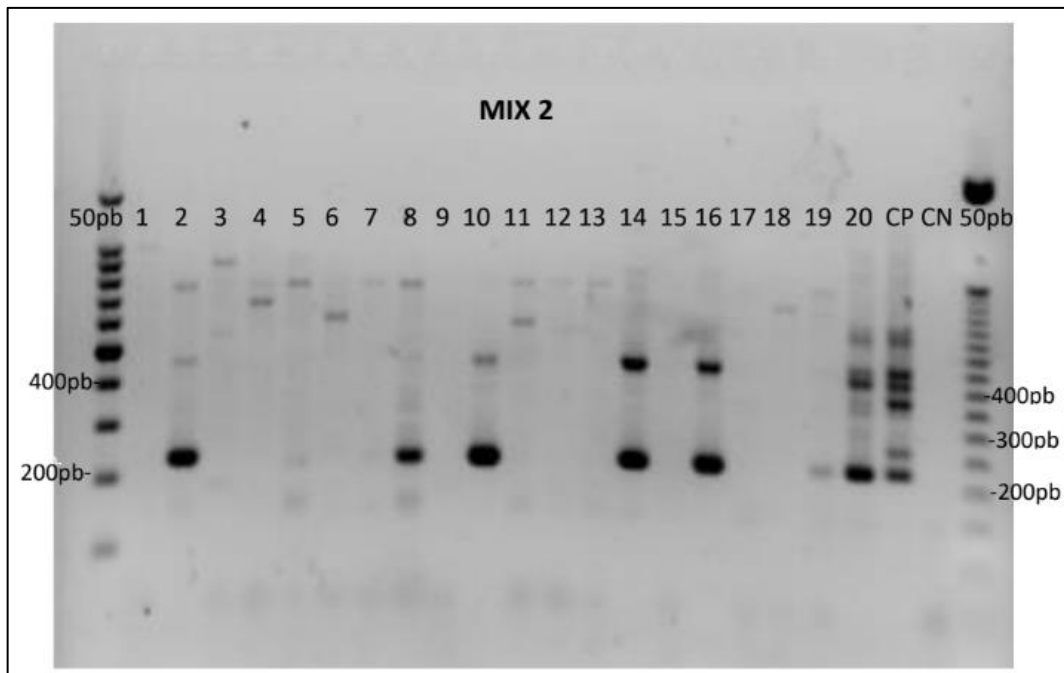
Após as corridas eletroforéticas, os géis de agarose foram revelados em transiluminador UV a 302 nm com ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®) e os produtos nos géis foram analisados por comparação de seus pesos moleculares. Os produtos respectivos para cada tipo de HPV possuem os seguintes comprimentos (Sotlar *et al.*, 2004) – HPV 16 (457pb), HPV 18 (322 pb), HPV 31 (263 pb), HPV 59 (215 pb) e HPV 45 (151 pb), HPV 33 (398pb), HPV 6/11 (334 pb), HPV 58 (274 pb), HPV 52 (229 pb), HPV 56 (181 pb). As figuras 12 e 13 são exemplos de amplificações da tipagem do HPV em algumas amostras das participantes do estudo.

Figura 12 – Amplificação de amostras com os iniciadores específicos Mix 1 (tipos 16, 18, 31, 45 e 59) do gene E6/E7 do HPV.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 13 – Amplificação de amostras com os iniciadores específicos Mix 2 (tipos 6/11, 33, 52, 56 e 58) do gene E6/E7 do HPV.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.8 Análises estatísticas

Foram confeccionadas tabelas de frequência absoluta e relativa, e aplicado o teste de independência Qui-Quadrado. Também foi calculado a Razão de Chances quando possível, de forma a quantificar as associações identificadas.

Ao se construir uma tabela de contingência, tem-se como principal objetivo analisar a distribuição conjunta de duas variáveis qualitativas, pois de certo modo espera-se que haja uma certa dependência entre as variáveis dispostas na referida tabela.

A razão de chances ou razão de possibilidades (em inglês: odds ratio), trata-se da medida do grau de associação entre variáveis, nela utiliza-se uma tabela 2x2 para estimar a grandeza dos efeitos por meio das observações da amostra. A razão de chances (RC) é definida como a razão entre a chance de um evento ocorrer em um grupo e a chance de ocorrer em outro grupo. Esses grupos podem ser, por exemplo, amostras de pessoas com ou sem uma doença, no qual se quer medir a chance dessa pessoa ter sido exposta a um determinado agente ambiental; ou grupos/amostras para análise estatística, como homens e mulheres, tratados e não tratados, etc.

4.9 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP) com número de parecer: 5.379.781 (Anexo I).

As pacientes presentes na clínica elegíveis à pesquisa formalizaram sua participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – APÊNDICE I), após tomarem conhecimento sobre os objetivos do trabalho, bem como os detalhes sobre os procedimentos envolvidos e com devido esclarecimento do sigilo sobre os dados.

5 RESULTADOS

A prevalência de HPV na orofaringe foi de 18,06%, com predomínio dos genótipos 16, 52 e 58. Para a mucosa jugal, teve-se prevalência de 18,49%, predominando os genótipos 52, 16 e 58. No colo do útero a prevalência foi de 18,88%, se destacado os genótipos 52, 58 e 16.

A Tabela 1 mostra as variáveis relativas ao perfil das 166 participantes da pesquisa. Os dados apresentam informações sobre diversas variáveis demográficas e socioeconômicas.

Inicialmente, quanto ao estado civil, observa-se que a maioria das participantes é casada, representando 54,22% do total, enquanto 45,18% são solteiras. A proporção de indivíduos que não informaram ou preferiram não responder é mínima, com apenas 0,60% do total.

A média da idade é de 32 anos, com um desvio padrão de 10, indicando uma dispersão moderada em torno da média. A idade variou de 18 a 74 anos.

A maioria das participantes (79,52%) possui pelo menos o ensino médio completo ou está cursando o ensino superior. Por outro lado, uma quantidade pequena da amostra (1,20%) possui pouca ou nenhuma instrução formal.

A maioria das participantes relatou que trabalha, seja exclusivamente (57,83%) ou combinando trabalho e estudo (13,86%). No entanto, cerca de 19,28% não está envolvida nem com o mercado de trabalho nem com estudos.

Cerca de 30,12% das pessoas recebem um salário-mínimo, enquanto 24,70% ganham entre 1 e 2 salários-mínimos. Por outro lado, 22,89% não informaram sua faixa salarial.

Finalmente, em relação ao número de residentes nos domicílios, a distribuição é relativamente equilibrada, com uma quantidade semelhante de domicílios com 2, 3 e 4 ou mais pessoas, representando, respectivamente, 25,30%, 29,52% e 43,98% do total.

Tabela 1 – Descrição do perfil sociodemográfico das 166 participantes do estudo, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variável	N	%
<i>Estado Civil</i>		
Solteira	75	45,18
Casada	90	54,22
Não sei/prefiro não responder	1	0,60
Total	166	100
<i>Idade (anos)</i>		

Média		32
Desvio Padrão		10
Mínimo		17
Máximo		74
<i>Escolaridade</i>		
Sem instrução	2	1,20
Fundamental I completo	5	3,01
Fundamental I completo/Fundamental II incompleto	13	7,83
Fundamental II completo/Médio incompleto	14	8,43
Médio completo/Superior incompleto	104	62,65
Superior completo	28	16,87
Total	166	100
<i>Ocupação</i>		
Trabalha	96	57,83
Estuda	15	9,04
Trabalha e estuda	23	13,86
Não trabalha e nem estuda	32	19,28
Total	166	100
<i>Salário Mínimo^a</i>		
Menos de 1 salário-mínimo	25	15,06
Um (1) salário-mínimo	50	30,12
Entre 1 e 2 salários-mínimos	41	24,70
Mais de 2 salários-mínimos	12	7,23
Não sei/prefiro não responder	38	22,89
Total	166	100
<i>Número de Residentes</i>		
Moro sozinha	2	1,20
2 Pessoas	42	25,30
3 Pessoas	49	29,52
4 ou mais	73	43,98
Total	166	100

^aValor do salário-mínimo: ano 2023 R\$ 1.302,00 e ano 2022 R\$ 1.212,00.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Na Tabela 2 temos as variáveis relacionadas a doenças prévias das participantes. Avaliando a prevalência de doenças crônicas na amostra, das 166 participantes, 15,66% relataram possuir alguma doença crônica, enquanto a grande maioria (83,73%) declarou não ter nenhuma. Apenas uma pequena parcela (0,60%) preferiu não responder ou não soube informar sua condição.

Em relação às doenças crônicas especificamente, a distribuição foi variada entre as 26 participantes que relataram possuir alguma. As principais condições mencionadas incluem hipertensão (15,38%), seguida por asma (11,54%) e tireoidite (19,23%). Outras doenças menos

comuns também foram relatadas, como diabetes, endometriose, e lúpus, cada uma representando uma parcela menor da amostra.

Por fim, em relação a lesões na cavidade oral, apenas 1,81% das participantes relataram possuir tal condição no momento da coleta, enquanto a maioria (98,19%) declarou não ter nenhuma lesão nessa região.

Tabela 2 – Descrição das doenças prévias relatadas pelas participantes, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variável	N	%
<i>Possui alguma doença crônica</i>		
Sim	26	15,66
Não	139	83,73
Não sei/prefiro não responder	1	0,60
Total	166	100
<i>Qual doença crônica (N=26)</i>		
Alopecia Androgenética	1	3,85
Asma	3	11,54
Diabetes/Tireoidite	1	3,85
Endometriose	1	3,85
Gastrite Crônica	1	3,85
Hérnia de Disco	1	3,85
Hipertensão	4	15,38
Hipertensão/Psoríase	1	3,85
Hipotireoidismo	1	3,85
Lúpus	1	3,85
Pênfigo	1	3,85
Psoríase	1	3,85
Tireoidite	5	19,23
<i>Lesão atual na cavidade oral</i>		
Sim	3	1,81
Não	163	98,19
Total	166	100

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Quanto ao etilismo, uma parcela muito pequena da amostra (2,41%) relatou fazer uso de bebidas alcoólicas, enquanto a maioria (47,59%) afirmou não fazer uso. No entanto, é notável que metade dos participantes (50,0%) preferiu não responder essa pergunta, o que pode indicar uma certa relutância em discutir esse hábito.

A maioria das participantes (98,8%) declarou não ser fumante.

Quanto ao uso de drogas ilícitas, todas as participantes (100,0%) declararam não fazer uso, indicando uma baixa prevalência desse comportamento na amostra estudada em Juazeiro do Norte.

Tabela 3 – Frequência em relação ao uso de bebidas alcoólicas, cigarro e drogas ilícitas, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variável	N	%
<i>Etilismo</i>		
Sim	4	2,41
Não	79	47,59
Não sei/prefiro não responder	83	50,00
Total	166	100
<i>Tabagismo</i>		
Sim, com frequência	1	0,60
Sim, mas com pouca frequência	1	0,60
Não	164	98,80
Total	166	100
<i>Uso de drogas ilícitas</i>		
Não	166	100,00
Total	166	100

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Tabela 4 apresenta informações referentes a métodos contraceptivos e utilização de vacina contra HPV. Percebe-se que 26,51% das participantes receberam a vacina para HPV, enquanto 45,18% relataram não a ter recebido. Outras 28,31% das participantes preferiram não responder ou não souberam informar se foram vacinadas.

Entre aquelas que receberam a vacina para HPV (N=44), a maioria (52,27%) recebeu a vacina quadrivalente, enquanto 22,73% receberam a vacina nonavalente. Um número significativo (25,00%) preferiu não responder ou não soube informar o tipo de vacinação.

Em relação ao uso de contraceptivos, 48,80% das participantes afirmaram utilizá-los, enquanto 50,60% declararam não o fazer.

Dentre as que utilizam contraceptivos (N=81), a maioria (79,01%) utiliza anticoncepcionais hormonais, seguido pelo DIU (11,11%) e preservativos (9,88%).

Quanto à realização do exame preventivo Papanicolaou, a grande maioria das participantes (90,96%) afirmou já tê-lo realizado, enquanto 9,04% declararam nunca ter feito.

Tabela 4 – Frequência das variáveis dos métodos contraceptivos e imunização contra HPV, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variáveis	Frequência	%
<i>Vacina para HPV</i>		
Sim	44	26,51
Não	75	45,18
Não sei/prefiro não responder	47	28,31
Total	166	100
<i> Tipo de vacina (N=44)</i>		
Quadrivalente	23	52,27
Nonavalente	10	22,73
Não sei/prefiro não responder	11	25,00
<i>Uso de Contraceptivo</i>		
Sim	81	48,80
Não	84	50,60
Total	166	100
<i>Tipo de Contraceptivo (N=81)</i>		
Anticoncepcional	64	79,01
DIU	9	11,11
Preservativo	8	9,88
<i>Prevenção (Papanicolau)</i>		
Sim	151	90,96
Nunca realizei	15	9,04
Total	166	100

^aQuadrivalente: imunização contra os subtipos 6, 11, 16 e 18; Nonavalente: imunização contra os subtipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.1 Resultado da pesquisa na orofaringe e mucosa jugal

5.1.1 Pesquisa na orofaringe

Conforme resultados mostrados na Tabela 6, tem-se que os resultados da beta-globina indicam que 144 (86,75%) das participantes apresentaram resultado positivo.

No que diz respeito ao HPV, 26 (18,06%) das 144 participantes apresentaram resultado positivo na orofaringe.

Quanto à tipagem do vírus, o HPV 16 foi o mais prevalente, encontrado em 11,11% das participantes. Outros tipos identificados incluem HPV 33, HPV 52, HPV 56, HPV 58 e HPV 59, cada um com uma prevalência inferior a 3%. É importante notar uma pequena parcela

das participantes, cerca de 6,94%, apresentaram mais de um tipo de HPV nesse mesmo sítio anatômico.

Em relação ao resultado final da pesquisa na orofaringe, 66 (45,83%) apresentaram resultado positivo para HPV.

Tabela 6 – Frequência da positividade ao HPV na orofaringe, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variáveis	Frequência	%
<i>Beta-globina</i>		
POSITIVO	144	86,75
NEGATIVO	22	13,25
Total	166	100
<i>HPV E6/E7 (N = 144)</i>		
POSITIVO	26	18,06
NEGATIVO	118	81,94
Total	144	100
<i>Tipo HPV (N = 144)</i>		
E6/E7 positivo	22	15,28
HPV 16	16	11,11
HPV 52	10	6,94
HPV 16 e 52	6	4,17
HPV 58	3	2,08
HPV 6 e/ou 11	3	2,08
HPV 59	2	1,39
HPV 33	2	1,39
HPV 52 e 56	1	0,69
HPV 56	1	0,69
NEGATIVO	78	54,17
Total	144	100
<i>Resultado Final Orofaringe (N = 144)</i>		
^a HPV POSITIVO	66	45,83
HPV NEGATIVO	78	54,17
Total	144	100

^aHPV positivo: positivo para E6/E7 e/ou genótipo identificado.

Beta-globina positivo: representa material com células humanas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.1.2 Pesquisa nas amostras de mucosa jugal

Conforme resultados mostrados na Tabela 7, tem-se que em relação ao teste de E6/E7, somente 27 (18,49%) das participantes foram positivas.

No que diz respeito aos tipos específicos de HPV identificados, o HPV 52 foi o mais prevalente, encontrado em 8,90% das participantes, seguido do HPV 16 presente em 7,53%.

Outros tipos identificados incluem HPV 58, HPV 33, HPV 56 e HPV 6/11, cada um com uma prevalência inferior a 3%. É importante notar que algumas participantes apresentaram mais de um tipo de HPV, sugerindo coinfeção.

No resultado final do teste de escova oral, 55 (37,67%) participantes foram positivas para HPV.

Tabela 7 – Frequência de positividade ao HPV nas amostras de mucosa jugal, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variáveis	Frequência	%
<i>Beta-globina</i>		
POSITIVO	146	87,95
NEGATIVO	20	12,05
Total	166	100
<i>E6/E7 (N = 146)</i>		
POSITIVO	27	18,49
NEGATIVO	119	81,51
Total	146	100
<i>Tipo HPV (N = 146)</i>		
E6/E7 positivo	20	13,70
HPV 52	13	8,90
HPV 16	11	7,53
HPV 58	4	2,74
HPV 16 e 52	1	0,68
HPV 33	1	0,68
HPV 52 e 33	1	0,68
HPV 52 e 56	1	0,68
HPV 56	1	0,68
HPV 58 e 33	1	0,68
HPV 6/11	1	0,68
NEGATIVO	91	62,33
Total	146	100
<i>Resultado Final Escova Oral (N = 146)</i>		
^a HPV POSITIVO	55	37,67
HPV NEGATIVO	91	62,33
Total	146	100

^aHPV positivo: positivo para E6/E7 e/ou genótipo identificado.

Beta-globina positivo: representa material com células humanas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.2 Pesquisa do HPV nas amostras de colo uterino

Conforme resultados mostrados na Tabela 8, tem-se que no teste de E6/E7, 27 (17,88%) das participantes apresentaram resultado positivo.

Quanto aos tipos de HPV identificados, o HPV 52 foi o mais prevalente, encontrado em 9,93% das participantes. Outros tipos identificados incluem HPV 16, HPV 58, HPV 33, HPV 56 e HPV 6/11, sendo que algumas participantes apresentaram mais de um tipo de HPV, indicando uma possível coinfeção.

Na análise final da escova de colo, 72 (47,68%) participantes foram positivas para HPV.

Tabela 8 – Descrição da positividade ao HPV nas amostras de colo uterino, Juazeiro do Norte, Ceará.

Variáveis	Frequência	%
<i>Beta-globina</i>		
POSITIVO	151	91,52
NEGATIVO	14	8,48
Total	165	100
<i>E6/E7 (N = 151)</i>		
POSITIVO	27	17,88
NEGATIVO	124	82,12
Total	151	100
<i>Tipo HPV (N = 151)</i>		
E6/E7 positivo	18	11,92
HPV 52	15	9,93
HPV 58	6	3,97
HPV 16	4	2,65
HPV 16 e 56	4	2,65
HPV 6/11	4	2,65
HPV 33	3	1,99
HPV 45	3	1,99
HPV 16 e 58	2	1,32
HPV 52 e 33	2	1,32
HPV 52 e 6/11	2	1,32
HPV 56	2	1,32
HPV 18	1	0,66
HPV 31 e 56	1	0,66
HPV 45 e 52	1	0,66
HPV 56 E 33	1	0,66
HPV 56 e 58	1	0,66
HPV 58 e 33	1	0,66
HPV 6/11 e 18	1	0,66
HPV 6/11 e 56	1	0,66
NEGATIVO	78	51,66

Total	151	100
<i>Resultado Final Escova de Colo (N = 151)</i>		
^a HPV POSITIVO	72	47,68
HPV NEGATIVO	79	52,32
Total	151	100

^aHPV positivo: positivo para E6/E7 e/ou genótipo identificado.

Beta-globina positivo: representa material com células humanas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.4 Análise bivariada da positividade ao HPV

5.4.1 Comparação da positividade ao HPV na região oral com a imunização

Para esta análise, considerou-se como positivo para HPV na região oral as participantes que apresentaram o vírus em pelo menos uma das amostras orais (swab de orofaringe ou escova de mucosa jugal). A Tabela 9 mostra o resultado a associação desses dados.

Os resultados da análise sobre HPV na região oral e sua relação com a vacinação indicam que, entre as participantes vacinadas para HPV, 63,64% tiveram resultado positivo para HPV na região oral. Por outro lado, para aquelas que não foram vacinadas, a porcentagem de HPV positivo foi ligeiramente menor, com 56% positivos. No entanto, a diferença na distribuição de HPV entre os grupos vacinados e não vacinados não foi estatisticamente significativa ($p=0,414$). Esse resultado indica que a vacinação contra o HPV pode não ter um impacto direto na presença do vírus na região oral das participantes estudadas.

Tabela 9 – Associação da positividade ao HPV na mucosa jugal e orofaringe comparando com a imunização contra o HPV.

Variáveis	HPV (mucosa jugal e orofaringe)			p
	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	Total N (%)	
<i>Vacina para HPV</i>				
Sim	28 (65,12)	15 (34,88)	43	0,471 ^a
Não	42 (58,33)	30 (41,67)	72	
Não sei/prefiro não responder	26 (57,78)	19 (42,22)	45	
Total	96 (60)	64 (40)	160	

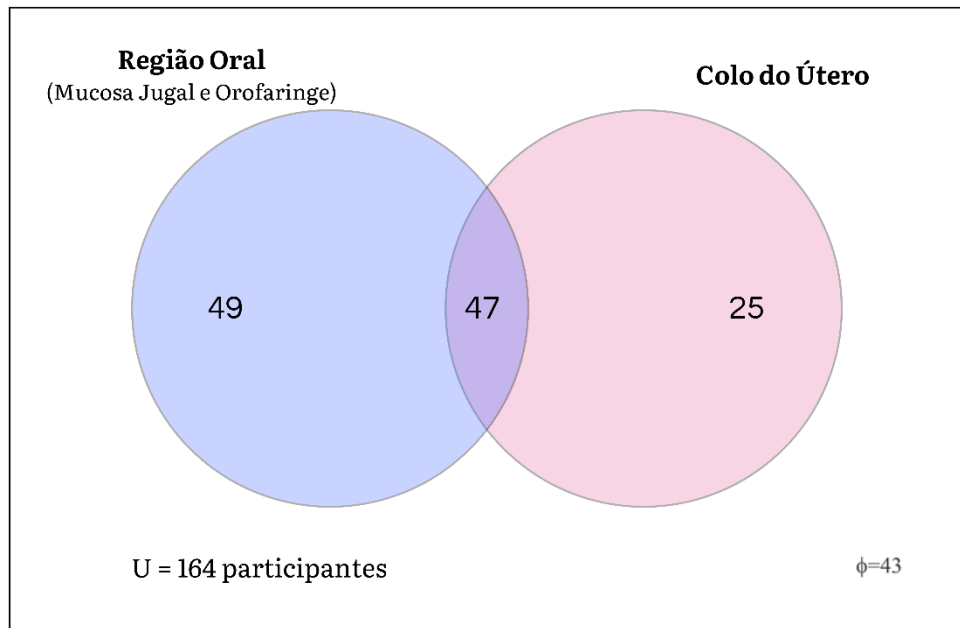
a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher; Nota: Não sei/prefiro não responder não utilizado no teste de significância.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.4.2 Associação do HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo do útero.

Também é de interesse avaliar se existe uma interação entre o HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo do útero; na Tabela 10 é mostrado os resultados dessa análise. No Gráfico 1 é possível visualizar o diagrama que mostra os casos de HPV na região oral e colo do útero, e a quantidade de participantes que tiveram simultaneamente HPV nas duas regiões. Foram incluídas todas as participantes com beta globina positiva, totalizando 164 participantes válidas.

Gráfico 1 – Diagrama de Ven da presença de HPV na região oral e colo do útero.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Ao examinar a presença de HPV no colo do útero em relação à sua detecção na região oral, observamos que 52,81% das participantes que testaram positivo para HPV no colo do útero também tiveram resultado positivo para HPV na região oral. Por outro lado, entre aquelas que testaram negativo para HPV na região oral, 38,98% foram positivos para HPV no colo do útero. No entanto, a diferença nas proporções de HPV positivo entre os grupos não alcançou significância estatística ($p=0,099$), sugerindo que a presença de HPV na região oral pode não estar fortemente associada à sua presença no colo do útero.

Quando analisamos o método de coleta específico do HPV na região oral, seja através de swab da orofaringe ou escova oral, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na distribuição de HPV positivo entre os participantes que realizaram a coleta e aqueles que não o fizeram. Para o swab ($p=0,243$) e para a escova ($p=0,069$), os valores “p” não indicaram diferenças significativas, ao nível de 95% de confiança, na associação entre a

presença de HPV na região oral e no colo do útero, independentemente do método de coleta utilizado.

Tabela 10 – Associação da positividade ao HPV na região oral (mucosa jugal ou orofaringe) e colo do útero.

Variáveis	HPV no colo uterino			p
	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	Total N (%)	
<i>HPV na mucosa jugal ou orofaringe</i>				
Sim	47 (52,81)	42 (47,19)	89	0,099 ^a
Não	23 (38,98)	36 (61,02)	59	
Total	70 (47,3)	78 (52,7)	148	
<i>HPV na orofaringe</i>				
Sim	32 (51,61)	30 (48,39)	62	0,384 ^a
Não	40 (44,44)	50 (55,56)	90	
Total	72 (47,37)	80 (52,63)	152	
<i>HPV na mucosa jugal</i>				
Sim	29 (58%)	21 (42%)	50	0,066 ^a
Não	43 (42,16%)	59 (57,84%)	102	
Total	72 (47,37%)	80 (52,63%)	152	

a. Valor p do teste Qui-Quadrado

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.4.3 Associação do HPV na mucosa jugal ou orofaringe e variáveis sociodemográficas e clínicas

Foi realizada também a associação do HPV na região oral com as variáveis sociodemográficas e clínicas coletadas, de forma a identificar os fatores de risco para infecção por HPV.

Tabela 11 – Comparação das variáveis sociodemográficas por HPV na mucosa jugal ou orofaringe.

Variáveis	HPV (mucosa jugal ou orofaringe)			p
	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	Total N (%)	
<i>Estado Civil</i>				
Solteira	43 (59,72)	29 (40,28)	72	0,878 ^a
Casada	53 (60,92)	34 (39,08)	87	
Total	96 (60,38)	63 (39,62)	159	
<i>Escolaridade</i>				
Sem instrução	2 (100)	0 (0)	2	0,203 ^b
Até ensino médio incompleto	17 (56,67)	13 (43,33)	30	

Médio completo/Superior incompleto	56 (56)	44 (44)	100	
Superior completo	21 (75)	7 (25)	28	
Total	96 (60)	64 (40)	160	
<i>Ocupação</i>				
Trabalha	54 (58,7)	38 (41,3)	92	0,196 ^a
Estuda	8 (53,33)	7 (46,67)	15	
Trabalha e estuda	10 (47,62)	11 (52,38)	21	
Não trabalha e nem estuda	24 (75)	8 (25)	32	
Total	96 (60)	64 (40)	160	
<i>Salário Mensal</i>				
Menos de 1 salário mínimo	13 (54,17)	11 (45,83)	24	0,886 ^a
Um (1) salário mínimo	26 (55,32)	21 (44,68)	47	
Entre 1 e 2 salários mínimos	23 (58,97)	16 (41,03)	39	
Mais de 2 salários mínimos	8 (66,67)	4 (33,33)	12	
Não sei/prefiro não responder	26 (68,42)	12 (31,58)	38	
Total	96 (60)	64 (40)	160	
<i>Número de Residentes</i>				
Moro sozinha	1 (50)	1 (50)	2	0,870 ^b
2 Pessoas	26 (65)	14 (35)	40	
3 Pessoas	29 (60,42)	19 (39,58)	48	
4 ou mais	40 (57,14)	30 (42,86)	70	
Total	96 (60)	64 (40)	160	

a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Tabela 11 mostra que, em relação ao estado civil, tanto mulheres solteiras quanto casadas apresentaram proporções semelhantes de HPV positivo na região oral, com 59,72% das solteiras e 60,92% das casadas apresentando HPV positivo.

Em relação a escolaridade, a presença de HPV na região oral não mostrou uma relação clara com o nível de escolaridade das participantes. As proporções de HPV positivo variaram de 100% entre as mulheres sem instrução a 75% entre aquelas com ensino superior completo.

No que se refere a ocupação das mulheres com diferentes status ocupacionais apresentaram proporções semelhantes de HPV positivo na região oral, variando de 47,62% entre aquelas que trabalham e estudam a 75% entre aquelas que não trabalham e nem estudam.

Quanto ao salário mensal, não houve uma relação clara entre o salário mensal e a presença de HPV na região oral. As proporções de HPV positivo variaram de 54,17% entre aquelas com salário inferior a um salário-mínimo a 66,67% entre aquelas com mais de dois salários-mínimos.

Em relação ao número de residentes, diferentes configurações de moradia não pareceram influenciar a presença de HPV na região oral. As proporções de HPV positivo

variaram de 50% entre aquelas que moram sozinhas a 57,14% entre aquelas com quatro ou mais residentes no domicílio.

Embora nenhuma das variáveis tenha mostrado uma associação estatisticamente significativa com a presença de HPV na mucosa jugal ou orofaringe, esses dados caracterizam a distribuição do HPV nas participantes.

Tabela 12 - Doenças prévias das participantes por presença de HPV na região oral.

Variáveis	HPV (mucosa jugal ou orofaringe)			p
	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	Total N (%)	
<i>Possui alguma doença crônica</i>				
Sim	17 (65,38)	9 (34,62)	26	0,522 ^a
Não	78 (58,65)	55 (41,35)	133	
Total	95 (59,75)	64 (40,25)	159	
<i>Possui lesão na cavidade oral</i>				
Sim	1 (33,33)	2 (66,67)	3	0,564 ^b
Não	95 (60,51)	62 (39,49)	157	
Total	96 (60)	64 (40)	160	

a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 12, pode-se concluir que, em relação a possuir alguma doença crônica, a presença de HPV na mucosa jugal ou orofaringe não mostrou uma associação estatisticamente significativa com a presença de alguma doença crônica ($p=0,522$). Entre as participantes com doença crônica, 65,38% apresentaram HPV positivo, enquanto entre aquelas sem doença crônica, 58,65% foram positivas para HPV.

No que se refere a possuir lesão na cavidade oral, a presença de lesão também não mostrou uma associação significativa com o HPV na região oral ($p=0,564$). Apenas 33,33% das participantes com lesões na cavidade oral foram positivas para HPV, enquanto 60,51% daquelas sem lesões foram positivas.

Esses resultados indicam que não houve uma associação estatisticamente significativa entre a presença de HPV na região oral e as condições de saúde investigadas.

Quanto ao uso de bebidas alcólicas mostradas na Tabela 13, também não houve significância estatística.

Tabela 13 – Uso de bebidas alcólicas com prevalência de HPV na mucosa jugal ou orofaringe.

Variáveis	HPV (mucosa jugal ou orofaringe)			p
	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	Total N (%)	
<i>Uso de bebidas alcoólicas</i>				
Sim	2 (66,67)	1 (33,33)	3	1 ^a
Não	42 (54,55)	35 (45,45)	77	
Não sei/prefiro não responder	52 (65)	28 (35)	80	
Total	96 (60)	64 (40)	160	

a. Valor p do teste Exato de Fisher

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Já na Tabela 14 é mostrada a relação com uso de contraceptivo. Conclui-se que, quanto ao uso de contraceptivo, das participantes que utilizam contraceptivo, 53,25% apresentaram HPV positivo. Essa diferença teve teste de significância estatística não significativo, valor $p = 0,075$.

Ao analisar os diferentes tipos de contraceptivo, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa com a presença de HPV na região oral ($p=0,228$). As proporções de HPV positivo variaram de 48,33% entre aquelas que utilizam anticoncepcional a 77,78% entre aquelas com DIU.

Quanto a realização do exame ginecológico preventivo (Papanicolaou), não foi encontrada uma associação significativa entre os resultados do exame de Papanicolaou e a presença de HPV na mucosa jugal ou orofaringe ($p=0,819$). Tanto entre aquelas que realizaram o exame quanto entre aquelas que nunca o fizeram, as proporções de HPV positivo foram semelhantes.

Tabela 14 – Uso de contraceptivo e exame Papanicolaou por presença HPV na mucosa jugal ou orofaringe.

Variáveis	HPV (mucosa jugal ou orofaringe)			p
	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	Total N (%)	
<i>Uso de Contraceptivo</i>				
Sim	41 (53,25)	36 (46,75)	77	0,075^a
Não	55 (67,07)	27 (32,93)	82	
Total	96 (60,38)	63 (39,62)	159	
<i>Tipo de Contraceptivo</i>				
Anticoncepcional	29 (48,33)	31 (51,67)	60	0,228 ^b
DIU	7 (77,78)	2 (22,22)	9	
Preservativo	5 (62,5)	3 (37,5)	8	

Total	41 (53,25)	36 (46,75)	77	
<i>Prevenção (Papanicolaou)</i>				
Sim	88 (60,27)	58 (39,73)	146	0,819 ^a
Nunca realizei	8 (57,14)	6 (42,86)	14	
Total	96 (60)	64 (40)	160	

a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.4.4 Associação do HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino com variáveis sociodemográficas e clínicas

Tabela 15 – Associação das variáveis sociodemográficas com HPV na região oral e colo uterino.

Variáveis	HPV na mucosa jugal ou orofaringe e no colo uterino			p	RC (IC 95%)
	Sim N (%)	Não N (%)	Total N (%)		
<i>Estado Civil</i>					
Solteira	29 (38,67)	46 (61,33)	75	0,011^a	2,45 (1,22 - 4,92)
Casada	18 (20,45)	70 (79,55)	88		
Total	47 (28,83)	116 (71,17)	163		
<i>Escolaridade</i>					
Sem instrução	0 (0)	2 (100)	2	1 ^b	
Até ensino médio incompleto	9 (28,13)	23 (71,88)	32		
Médio completo/Superior incompleto	30 (29,41)	72 (70,59)	102		
Superior completo	8 (28,57)	20 (71,43)	28		
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164		
<i>Ocupação</i>					
Trabalha	24 (25,53)	70 (74,47)	94	0,656 ^b	
Estuda	6 (40)	9 (60)	15		
Trabalha e estuda	7 (30,43)	16 (69,57)	23		
Não trabalha e nem estuda	10 (31,25)	22 (68,75)	32		
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164		
<i>Salário Mensal</i>					
Menos de 1 salário mínimo	5 (20)	20 (80)	25	0,261 ^b	
Um (1) salário mínimo	15 (30,61)	34 (69,39)	49		
Entre 1 e 2 salários mínimos	14 (35)	26 (65)	40		
Mais de 2 salários mínimos	1 (8,33)	11 (91,67)	12		
Não sei/prefiro não responder	12 (31,58)	26 (68,42)	38		
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164		
<i>Residentes</i>					
Moro sozinha	1 (50)	1 (50)	2	0,346 ^b	
2 Pessoas	8 (19,51)	33 (80,49)	41		
3 Pessoas	16 (33,33)	32 (66,67)	48		
4 ou mais	22 (30,14)	51 (69,86)	73		
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164		

a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme resultados da Tabela 15, conclui-se que houve uma associação estatisticamente significativa entre o estado civil e a presença de HPV na região oral e no colo uterino ($p=0,011$). Mulheres solteiras apresentaram uma proporção significativamente maior de

HPV na região oral e no colo uterino (38,67%) em comparação com mulheres casadas (20,45%). A razão de chances (RC) foi de 2,45 (IC 95%: 1,22 – 4,92), indicando que mulheres solteiras têm 2,45 vezes mais chances de ter HPV simultaneamente na mucosa jugal ou orofaringe e no colo uterino em comparação com mulheres casadas.

Avaliando a presença de doenças prévias, e uso de bebidas alcoólicas, não foi possível identificar nenhuma relação significativa com a prevalência de HPV conjuntamente na mucosa jugal ou orofaringe e o colo uterino.

Tabela 16 - Doenças prévias das participantes por presença de HPV na região oral e colo uterino.

Variáveis	HPV na mucosa jugal ou orofaringe e no colo uterino			p
	Sim N (%)	Não N (%)	Total N (%)	
<i>Possui alguma doença crônica</i>				
Sim	8 (30,77)	18 (69,23)	26	0,812 ^a
Não	39 (28,47)	98 (71,53)	137	
Total	47 (28,83)	116 (71,17)	163	
<i>Possui lesão na cavidade oral</i>				
Sim	0 (0)	3 (100)	3	0,558 ^b
Não	47 (29,19)	114 (70,81)	161	
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164	

a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 17 – Uso de bebidas alcóolicas com prevalência de HPV na região oral e colo uterino.

Variáveis	HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino			p
	Sim N (%)	Não N (%)	Total N (%)	
<i>Uso de bebidas alcóolicas</i>				
Sim	1 (25)	3 (75)	4	0,833 ^a
Não	24 (30,77)	54 (69,23)	78	
Não sei/prefiro não responder	22 (26,83)	60 (73,17)	82	
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164	

b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Por fim na Tabela 18 é destacado que mulheres que utilizam DIU apresentaram uma proporção maior de HPV na região oral e colo uterino (55,56%) em comparação com aquelas que utilizam anticoncepcional (20,97%). Porém essa diferença não foi significativa.

Tabela 18 – Uso de contraceptivo e exame Papanicolaou por presença HPV na região oral e colo uterino.

Variáveis	HPV na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino			p
	Sim N (%)	Não N (%)	Total N (%)	
<i>Uso de Contraceptivo?</i>				
Sim	21 (26,58)	58 (73,42)	79	0,538 ^a
Não	26 (30,95)	58 (69,05)	84	
Total	47 (28,83)	116 (71,17)	163	
<i>Tipo de Contraceptivo</i>				
Anticoncepcional	13 (20,97)	49 (79,03)	62	0,061 ^b
DIU	5 (55,56)	4 (44,44)	9	
Preservativo	3 (37,5)	5 (62,5)	8	
Total	21 (26,58)	58 (73,42)	79	
<i>Prevenção (Papanicolaou)</i>				
Sim	42 (28,19)	107 (71,81)	149	0,765 ^b
Nunca realizei	5 (33,33)	10 (66,67)	15	
Total	47 (28,66)	117 (71,34)	164	

a. Valor p do teste Qui-Quadrado; b. Valor p do teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou a prevalência de genótipos do HPV na mucosa jugal, orofaringe e colo uterino de mulheres em Juazeiro do Norte, Ceará. Esta pesquisa explorou a presença de 9 tipos de HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58, 59) e 2 tipos de HPVs de baixo risco (6 e 11), na mucosa jugal, orofaringe e colo uterino de mulheres de Juazeiro do Norte, utilizando o teste molecular de multiplex nested PCR, para detecção e genotipagem.

Atualmente, a PCR é considerada o método mais eficaz na detecção de HPV pela sensibilidade e especificidade, além de revelar a prevalência de diferentes genótipos coexistentes (ABREU, 2012; ZHOU *et al.*, 2015; LAWSON, 2018). O uso de técnicas inadequadas, a escolha de iniciadores menos sensíveis e, ainda, a aplicação da técnica em tecidos embebidos com parafina, que comprometem a integridade do DNA, podem resultar em erros quando se deseja estimar a prevalência do HPV (WANG *et al.*, 2012; DELGADO-GARCÍA, 2017; MASTORAKI *et al.*, 2020).

A detecção do HPV em 18,06% na orofaringe das participantes é um dado significativo, uma vez que estudos prévios indicam que a prevalência pode variar dependendo da população estudada e dos métodos de detecção utilizados. Por exemplo, Hidalgo-Tenório *et al.* (2023) observaram prevalência de HPV na orofaringe de 13% em uma população da Espanha, sendo o HPV 16 mais frequente. Gillison *et al.* (2012) observaram uma prevalência de HPV de 6,9% na orofaringe em uma população dos Estados Unidos, apresentando o HPV 16, também, como o mais prevalente.

Na mucosa jugal das participantes, a frequência de HPV foi de 18,49%. No nosso estudo o HPV 52 foi o mais prevalente, encontrado em 8,9% das participantes, seguido pelos HPV 16 e 58. Este achado é importante, pois, embora o HPV 52 não seja frequentemente o foco principal dos estudos, sua detecção sugere a necessidade de uma maior atenção e investigação sobre sua associação com doenças orais. Segundo estudo de Coutlée *et al.* (2007), o HPV 52 é um dos genótipos de alto risco frequentemente encontrados em infecções anogenitais, e sua presença na cavidade oral pode implicar em risco de desenvolvimento de neoplasias orais.

Nossos achados foram semelhantes aos encontrados por Colpani *et al.* (2020), que em revisão sistemática e metanálise, encontraram uma média de positividade do HPV na cavidade oral da população brasileira de 12%. Zambrano-Ríos *et al.* (2019) reforçaram as evidências da

necessidade de mais estudos quanto à presença de HPV na cavidade oral e orofaringe de indivíduos saudáveis.

No presente estudo, a frequência de HPV foi semelhante nas amostras de swab de orofaringe e escova da mucosa jugal. Entretanto, na mucosa jugal houve uma quantidade ligeiramente menor de HPVs de alto risco. Esse dado corrobora com o que está descrito na literatura. A região orofaríngea é mais susceptível à infecção por HPVs de alto risco, devido ao tipo de epitélio reticulado nas criptas tonsilares e abundante tecido linfoide nas tonsilas palatinas e base de língua. As criptas tonsilares são bem invaginadas, o que favorece a infecção persistente por HPV e possibilita a carcinogênese (RIETH *et al.*, 2018; MEHANNA, 2023).

Apesar do HPV ser amplamente aceito como um fator de risco para câncer na região oral, especula-se a capacidade deste vírus amplificar o papel carcinogênico de fatores de risco como o tabagismo e etilismo (PIRMORADI *et al.*, 2024)

Estudos de metanálise indicam que, mundialmente, o HPV 16 é o mais prevalente, seguido pelo HPV 18. No entanto, a frequência e os tipos de HPV podem variar de acordo com a região geográfica, com a população e os sítios anatômicos investigados e os métodos de análise. Trabalhos anteriores apontam que os quatro tipos de HPV de alto risco mais prevalentes nas Américas do Sul e Central são os genótipos 16, 18, 52 e 58 (WENTZEENSEN *et al.*, 2007; VERNET-TOMAS *et al.*, 2015).

Com relação a tipagem do vírus em amostras de orofaringe, o HPV 16 também foi o mais prevalente, encontrado em 11,1% das participantes, seguido dos tipos 52 e 58. Este dado corrobora com a literatura, que aponta o HPV 16 como o genótipo mais frequentemente associado a cânceres orofaríngeos. A presença de outros tipos, como HPV 33, HPV 52, HPV 56, HPV 58 e HPV 59, cada um com uma prevalência inferior a 3%, destaca a diversidade de tipos de HPV que podem infectar a orofaringe, embora menos comumente associados a malignidades.

Ainda na orofaringe, a detecção simultânea de múltiplos tipos de HPV em 6,9% das participantes sugere coinfeções, que podem ter impacto significativo na progressão da infecção e na resposta ao tratamento (NA *et al.* 2023). Isso ressalta a necessidade de um monitoramento rigoroso e de estratégias de prevenção, como a vacinação, que abranja múltiplos tipos de HPV.

A prática do sexo oral tem sido reconhecida como um importante fator de risco para a infecção por HPV na região oral. Estudos epidemiológicos demonstram uma associação clara entre o sexo oral e a presença de HPV na região oral, especialmente entre indivíduos que praticam sexo oral sem proteção. D'Souza *et al.* (2007) investigou os comportamentos sexuais associados à infecção por HPV oral e encontrou que o sexo oral é um fator significativo para a presença do vírus na região oral. Optamos por não incluir perguntas sobre a prática de sexo oral em nosso questionário por razões éticas e metodológicas. Primeiramente, o tema poderia ser considerado invasivo e desconfortável para muitas participantes, o que resultaria em uma taxa de resposta menor e em dados potencialmente enviesados. Além disso, perguntas de natureza sexual podem levantar preocupações sobre privacidade e confidencialidade, mesmo que garantidas, pode afetar a disposição das participantes em participar do estudo de maneira honesta.

No colo do útero, o HPV 52 foi identificado como o tipo mais prevalente, encontrado em 9,93% dos participantes, seguido pelos HPV 58 e 16. Apesar das coletas terem sido realizadas em duas clínicas particulares, contando com 166 participantes, a prevalência de HPV foi de 17,88%, semelhante ao observado mundialmente (BRUNI *et al.*, 2010; CIAPPONI, 2011; POP-BRASIL, 2020).

Este achado é relevante, pois, embora o HPV 52 não seja o tipo mais comumente associado ao câncer cervical, estudos mostram que ele possui um potencial oncogênico significativo. O estudo realizado por Clifford *et al.* (2005) indicou que o HPV 52, junto com outros genótipos de alto risco, está frequentemente associado a lesões intraepiteliais cervicais de alto grau.

Além do HPV 52, outros tipos identificados no colo uterino incluem: HPV 16, HPV 58, HPV 33, HPV 56 e HPV 6 e 11. O HPV 16, encontrado em menos participantes do estudo, é amplamente reconhecido como o tipo de HPV mais fortemente associado ao câncer cervical. Sua presença, mesmo em menor prevalência, é clinicamente significativa devido ao seu alto potencial oncogênico. Algumas participantes apresentaram mais de um tipo de HPV, indicando coinfeção. Coinfeções por múltiplos tipos de HPV podem aumentar o risco de persistência viral e progressão para lesões de alto grau no colo uterino. Segundo um estudo de Chaturvedi *et al.* (2011), a coinfeção com múltiplos tipos de HPV pode influenciar negativamente a resposta imune e aumentar o risco de câncer na cérvix uterina.

Neste estudo, mulheres solteiras apresentaram uma proporção significativamente maior de HPV na região oral e colo uterino (38,7%) em comparação com mulheres casadas (20,5%). Esses achados indicam que o estado civil pode influenciar na exposição e na prevalência do HPV, refletindo possíveis diferenças nos comportamentos sexuais e outros fatores associados. Estudos anteriores têm descrito esta maior prevalência entre as mulheres sem parceiro fixo. No estudo realizado por Duarte *et al.* (2017) em 353 mulheres ribeirinhas da Amazônia, foi possível observar que a prevalência do HPV foi 3 vezes maior entre as mulheres que não tinham parceiro fixo, em comparação com as que tinham parceiro fixo.

Os resultados deste estudo indicam que mulheres que utilizam DIU apresentaram uma proporção maior de infecção por HPV na mucosa jugal, orofaringe e colo uterino (55,6%) em comparação com aquelas que utilizam anticoncepcionais orais (30%). No entanto, é importante notar que essa diferença não alcançou significância estatística. Castellsagué *et al.* (2011) realizou uma análise sobre o uso de DIU e sua associação com infecção do colo uterino pelo HPV e o risco de câncer cervical. Os resultados apontam que o uso do DIU pode atuar como um cofator protetor na carcinogênese cervical. A imunidade celular desencadeada pelo dispositivo pode ser um dos vários mecanismos que explicam essa proteção.

No nosso estudo, a maioria das mulheres relataram já ter realizado o Papanicolaou (90,96%), em comparação aquelas que nunca haviam realizado (9,0%). A taxa elevada de mulheres que afirmaram já ter realizado o exame preventivo indica uma boa adesão à principal estratégia de prevenção ao câncer de colo uterino. Isso é crucial para a detecção precoce de lesões precursoras do câncer.

Entre as participantes que foram vacinadas contra o HPV, 63,6% apresentaram resultado positivo para HPV na região oral. Por outro lado, entre as não vacinadas, a porcentagem de resultados positivos foi de 56%. É importante considerar que esses resultados podem ser influenciados por diversos fatores, como o comportamento sexual, a exposição prévia ao vírus antes da vacinação, ou até mesmo, a infecção por genótipos de HPVs cuja vacina não confere imunização. O estudo realizado por Chaturvedi *et al.* (2011) aponta que a infecção oral por HPV está fortemente associada ao número de parceiros sexuais orais e ao tabagismo. Portanto, a maior prevalência de HPV oral entre os vacinados poderia refletir diferenças comportamentais entre os grupos estudados.

Na atualidade, devido às mudanças nos hábitos sexuais da população em geral, como início precoce da vida sexual, as características epidemiológicas das infecções por HPV nos

órgãos genitais e em outros sítios anatômicos modificaram, com maior exposição à infecção dos pacientes com idade precoce, tornando o HPV uma infecção endêmica (D'SOUZA *et al.*, 2007; NAGHAVI *et al.*, 2016).

A principal limitação deste estudo foi contar com dois pontos de coleta, sendo representados por duas clínicas privadas. No entanto, a concentração nessas clínicas permitiu uma execução mais viável e controlada do estudo. A escolha por um grupo mais homogêneo e acessível facilita a obtenção de resultados iniciais que podem ser validados e expandidos em estudos subsequentes. Considera-se, ainda mais, que estudos incluindo mulheres atendidas em instituições públicas, como nas Unidades Básicas de Saúde, poderiam traduzir de forma mais fiel a distribuição dos genótipos no município de Juazeiro do Norte. Nossos resultados enfatizam a necessidade de estudos mais amplos que avaliem a prevalência e a distribuição do HPV na Região do Cariri, Ceará. Por apresentar como objetivo principal determinar a prevalência do HPV e dos seus genótipos, este estudo teve o seu propósito alcançado. Recomenda-se que estudos futuros incluam uma amostragem mais ampla e diversificada para validar e expandir os achados apresentados.

A escolha das duas clínicas privadas foi primariamente motivada pela facilidade de acesso e à infraestrutura necessária para a realização do estudo. Estas clínicas já possuíam um histórico de colaboração com equipes de pesquisa, permitindo um fluxo de informações mais eficiente e um ambiente mais controlado para a coleta de dados. A inclusão de instituições do setor público exigiria uma coordenação mais complexa e recursos adicionais.

7 CONCLUSÃO

A prevalência do HPV, nos sítios anatômicos estudados nas mulheres de Juazeiro do Norte, foi semelhante ao observado no Brasil e no mundo. Os três genótipos mais frequentes na orofaringe, mucosa jugal e colo uterino das participantes foram os HPVs 16, 52 e 58.

Na região oral, a prevalência de HPVs de alto risco foi maior na orofaringe, em comparação com a mucosa jugal.

Mulheres solteiras apresentaram uma proporção maior de HPV simultaneamente na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino em comparação com mulheres casadas.

Considerações finais

Mulheres que utilizam DIU apresentaram proporção maior de HPV simultaneamente HPV simultaneamente na mucosa jugal ou orofaringe e colo uterino em comparação com as que usam anticoncepcionais orais.

O HPV se mostrou menos prevalente nas mulheres que nunca haviam realizado a exame preventivo antes dessa pesquisa

Portanto, embora os resultados atuais forneçam informações iniciais sobre a prevalência do HPV nessa população, é necessário acompanhar o papel da vacinação na prevalência do vírus nessa região e potencializar as estratégias de prevenção e tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. L. P.; SOUZA, R. P.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M. E. L. A review of methods for detect human Papillomavirus Infection. **Virology journal**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2012.
- AGUIRRE, L. E. B.; MONGELÓS-DACUNTE, P. E.; SALINAS, T. M. A.; CARDOZO, F. TORRES, L. P. M. Optimization of a conventional PCR technique for detection of human papillomavirus type 16 and 18. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 16, n. 3, p. 6-12, 2018.
- AMARAL, C. M. M. **Avaliação da Presença do Papilomavírus Humano (HPV) em Tumores de Pulmão**. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Pernambuco, Pernambuco 2015.
- BARRETO, J. A. P.; MARINHO, M. N. A. S. B.; VIDAL, E. C. F.; PINTO, A. G. A. et al. Percepciones de mujeres portadoras del virus papiloma humano a cerca de la infección: estudio exploratório. **Online Brazillian Journal of Nursing**, v. 13, n. 3, p. 382-392, 2016.
- BODA D.; DOCEA A.; CALINA D.; ILIE M.; et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). **Int. J. Oncol.**, v. 52, n. 3, p. 637–655, 2018.
- BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, M.; FERRER, E. et al. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789–1799, 2010.
- CALCAVECCHIA, C. A. **Vídeo para prevenção do contágio de infecções por hpv em adolescentes**. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia da UFRJ, Rio de Janeiro, 2018.
- CALUMBY, R. J. N.; SILVA, R. A. S.; SUÁREZ, J. A. G.; LÔBO, T. L. G. F.; VIEIRA, D. S.; SILVA, K. W. L.; REIS, M. J.; GRILLO, L. A. M. Human papillomavirus (HPV) and cervical neoplasia: importance of vaccination. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, n. 2, p. 1610-1628, 2020.
- CARTAXO, M. L. T. **Principais dificuldades relatadas pelas mulheres para realização do exame de Papanicolau**. Artigo apresentado ao curso de Enfermagem da Faculdade de Juazeiro do Norte – FJN, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Enfermagem, Juazeiro do Norte, 2018.
- CARTER J. R.; DING Z.; ROSE B. R. HPV infection and cervical disease: A review. **Aust New Zeal J. Obstet. Gynaecol.**, v. 51, n. 2, p. 103-108, 2011.
- CASTELLSAGUÉ, X.; DÍAZ, M.; VACCARELLA, S.; DE SANJOSÉ, S. et al. Intrauterine device use, cervical infection with human papillomavirus, and risk of cervical cancer: a pooled analysis of 26 epidemiological studies. **Revista Lancet Oncol**, v. 12, n. 11, p. 1023-1031, 2011.
- CAVALCANTE, J. R.; PINHEIRO, L. G. P.; ALMEIDA, P. R. C.; FERREIRA, M. V. P. et al. Association of breast cancer with human papilomavírus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. **Clinics**. v. 73, 2017.

Centers for Disease Control and Prevention. FDA licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2, Cervarix) for use in females and updated HPV vaccination recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report.**, v. 59, n. 20, p. 626-629, 2010.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M.; Hernandez, B. Y. et al. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 23, p. 4294-4301, 2011.

CIAPPONI, A.; BARDACH, A.; GLUJOVSKY, D.; GIBBONS, L.; PICCONI, M. Type-Specific HPV Prevalence in Cervical Cancer and High-Grade Lesions in Latin America and the Caribbean: Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**. v. 6, n. 10, 2011.

CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 991-998, 2005.

COLPANI, V.; SOARES, F. F.; BACELO, B. A.; KOPS, N. L. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. vol. 15, n. 2, 2020.

COUTLÉE, F.; ROULEAU, D.; GHATTAS, G.; et al. Confirmatory real-time PCR assay for human papillomavirus (HPV) type 52 infection in anogenital specimens screened for HPV infection with the linear array HPV genotyping test. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 11, p. 3821-3823, 2007.

CVITANOVIĆ, H.; LUGOVIĆ-MIHIĆ, L.; DJAKOVIĆ, I.; KUNA, M. S. A. The influence of psychological stress on hpv infection manifestations and carcinogenesis. **Cell Physiol Biochem**, V. 55, N. 52, P. 71-88, 2021.

CVITANOVIĆ, H.; MILOŠEVIĆ, M.; BUKVIĆ-BEŠLIĆ, I.; LUGOVIĆ-MIHIĆ, L. Determination of Psychological Stress, Serum Immune Parameters, and Cortisol Levels in Patients With Human Papilloma Virus. **Clinical Therapeutics**, v. 45, n. 5, p. 783- 799, 2020.

D'SOUZA, G. CULLEN, K.; BOWIE, J.; THORPE, R.; FAKHRY, C. Differences in Oral Sexual Behaviors by Gender, Age, and Race Explain Observed Differences in Prevalence of Oral Human Papillomavirus Infection. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86023, 2014.

DELGADO-GARCÍA, S.; MARTINEZ-ESCORIZA, J.; ALBA, A.; MARTÍN-BAYÓN, T.; et al. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2017.

D'SOUZA, G.; AGRAWAL, Y.; HALPERN, J.; BODISON, S.; GILLISON, M. L. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. **Journal Infect Dis**, v. 199, n. 9, p. 1263-1269, 2009.

DUARTE, D. V.; VIEIRA, R. C.; DE BRITO, E. B.; PINHEIRO, M. C. N. Prevalence of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Screening among Riverside Women of the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 39, n. 7, p. 350-357, 2017.

ELAGALI, A. M.; SULIMAN, A. A.; ALTAYEB, M.; DANNOUN, A. I. Human papillomavirus, gene mutation and estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a cross-sectional study. **Jornal Médico Pan-Africano**, v. 38, n. 43, 15 jan. 2021.

ESQUENAZI, D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; CARVALHO, M. G. C.; BARROS, F. S. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n.1, p. 78- 84, fev. 2010.

ESTÊVÃO, D.; COSTA, N. R.; DA COSTA, R. M. G.; MEDEIROS, R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1862, n. 2, p. 153- 162, 2019.

Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-BRASIL) - 2015-2017 / Associação Hospitalar Moinhos de Vento. – Porto Alegre, 2020.

FERNANDES, J. FERNANDES, T. A. A. M.; AZEVEDO, J. C. V.; COBUCCI, R. N. O. et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis. **Oncology Letters**, v. 9, n. 3, p. 1015-1026, 2015.

FERNANDES, R. A. **A atuação do enfermeiro na prevenção do câncer de colo de útero na atenção primária em saúde: um relato de experiência.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Enfermagem para obtenção do título de Bacharel em Enfermagem, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.

FERRARO, C. T. L.; CANEDO, N. H. S.; OLIVEIRA, S. P.; CARVALHO, M. G. C. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, São Paulo: v. 47, n. 4, p. 451-459, 2011.

GILLISON, M. L.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R. K.; TONG, Z. Y. et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. **Revista JAMA**, v. 307, n. 7, p. 693-703, 2012.

GONZALEZ, V.; HOLCBERG, M.; DIAZ, A.; DUARTE, B. et al. HPV vaccine: is it recommended by the pediatricians of the different health service providers in Montevideo?. **Pediatría Del Uruguay**. v. 92, n. 1, p. 206, 2021.

HIDALGO-TENORIO, C.; CALLE-GÓMEZ, I.; MOYA-MEGÍAS, R.; RODRÍGUEZ-GRANGES, J. et al. HPV Infection of the Oropharyngeal, Genital and Anal Mucosa and Associated Dysplasia in People Living with HIV. **Viruses**, v. 15, n. 5, p. 1170, 2023.

HUPP, J. R.; ELLIS III, E.; TUCKER, M. R. **Cirurgia oral e maxilo facial contemporânea.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Diagnóstico precoce do câncer de boca. Rio de Janeiro, INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/livro-diagnostico-precoce-cancer-boca-2022.pdf>. Acesso em: 19/02/2024.

KOLIOPOULOS G.; NYAGA V. N.; SANTESSO N.; BRYANT A. et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 8, n. 8, 2017.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE P. FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 2, p. 467–475, 2005.

KURY, C. M. H.; GUIMARAES, G. R.; LEANDRO, C. G.; FERNANDES, L. A. et al. Associations of human papillomavirus (HPV) genotypes and related risk factors in a cohort of women living with HIV in a Brazilian countryside city. **J. Med. Virol.**, v. 94, n. 6, p. 2802-2810, 2022.

KURY, C. M. H.; Santos, K.C. D. S.; Carestiato, F. N.; Rapozo, G. et al. Human papillomavirus prevalence, genomic diversity and related risk factors in HIV-positive women from a countryside city in the state of Rio de Janeiro. **Hum Vaccin Immunother**, v. 17, n. 3, p. 838-844, 2021.

LAURENTINO, N. F. et al. **Reação em cadeia da polimerase no diagnóstico do Alzheimer**. In: II CONBRACIS – II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, 2017.

LAWSON, J. S.; SALMONS, B.; GLENN, W. K. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). **Frontiers on Oncology**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2018.

LIMA, A. S. P.; BARROS, A. B.; CAMPOS, J. R. E. C.; ALVES, S. M. et al. Percepção dos adolescentes sobre papilomavírus humano e a importância da vacinação. **Tecnologia e Informação Para o Cuidar em Enfermagem**, v. 2, p. 176-188, 2020.

LIMA, H. F. et al. **Saúde e educação popular com mulheres sobre o exame Papanicolau: relato de experiência**. In: Anais do XII Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC), v. 4, n. 1, 2017.

LIMA, L. M. et al. Sexually Transmitted Infections Detected by Multiplex Real Time PCR in Asymptomatic Women and Association with Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol. 40, n. 19, p. 540-546, 2018.

MARKOWITZ, L.; DUNNE, E.; SARAIYA, M.; LAWSON, H. et al. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm. Rep.**, v. 56, n. 2, p. 1-24, 2007.

MASTORAKI, A.; SCHIZAS, D.; GKIALA, A.; NTELLA, V. et al. Human Papilloma Virus infection and breast cancer development: Challenging theories and controversies with regard to their potential association. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 25, n. 3, p. 1295-1301, 2020.

MEHANNA, Hisham. **Oral sex is now the leading risk factor for throat cancer. The Conversation: academic rigour, journalistic flair**, 25 abr. 2023. Disponível em: <https://theconversation.com/oral-sex-is-now-the-leading-risk-factor-for-throat-cancer-204063>. Acesso em: 10 Jun. 2024.

MELO, A. U. C.; RIBEIRO, C. F.; SANTOS, T. S.; ALBUQUERQUE J, R. L. C.; et al. Papilomavírus humano como fator de risco para o carcinoma bucal e de orofaringe. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 41, n. 4, p. 207-211, 2012.

- MIRGHANI, H.; AMEN, F.; BLANCHARD, P. Treatment de-escalation in HPVpositive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *International Journal Cancer*, v. 136, p. 1494-503, 2015
- MOHAMMED, S.; BAKSHI, N.; CHAUDRI, N.; AKHTER, J. Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 23, n. 3, p. 180-191, 2016.
- MOTTA, R. DA R.; ZETTLER, C. G.; CAMBRUZZI, E.; JOTZ, G. P.; BERNI, R. B. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz. J. Otorhinolaryngol*, v. 75, n. 4, 544-549, 2009.
- MOURA, E. R. F.; VERAS, S. S.; DIAS, A. A.; AGUIAR, L. N. R.; NOGUEIRA, P. S. F.; COSTA, C. J. S. C. Clinical, therapeutic, and sexual overview of women with Human Papilloma Virus and/or Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Revista de Enfermagem Referência*, vol. 4, n. 3, p. 113-120, 2014.
- MÜNGER, K.; JONES, D. Leanne. Human papillomavirus carcinogenesis: an identity crisis in the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *Journal of Virology*, v.89, n.9, p.4708-4711, 2015.
- NA, J.; LI, YA.; WANG, J.; WANG, X. et al. The correlation between multiple HPV infections and the occurrence, development, and prognosis of cervical câncer. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 2023.
- NAGHAVI, A. O.; STROM, T. J.; AHMED, K. A.; ECHEVARRIA, M. I.; Management of Oropharyngeal Cancer in the HPV Era. *Cancer Control: journal of the Moffitt Cancer Center*, v. 23, n. 3, p. 197-207, 2016.
- NETO, J. C. S. *Citologia Clínica do Trato Genital Feminino*. Curitiba: Revinter, 2012.
- OLIVEIRA, J.; MUTRAN, T. J.; SANTANA, V. C. Prevalência de HPV em amostras cervicovaginais sem alterações citológicas. *Arquivo de Ciências da Saúde*, São Paulo, vol. 24, n. 1, p. 47-51, 2017.
- OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; PINTO, L. P.; COSTA, A. L. L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 69, p. 553-559, 2003.
- PALLIS, A. G.; SYRIGOS, K. N. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, v, 88, n. 3, p. 494-503, 2013
- PESSOA, N. D. S. **Estudos sobre a expressão do Papilomavírus Humano (HPV): avaliação comparativa sobre lesões cervicais, sangue periférico e retinoblastomas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- PETITO, G.; CARNEIRO, M. A. D. S.; SANTOS, S. H. R.; SILVA, A. M. T. C. et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol*, v. 83, n. 1, p. 38-44, 2017.
- PETROSKY, E.; BOCCHINI, J. A.; HARIRI, S.; CHESSON, H. et al. Use of 9-Valent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine: Updated HPV Vaccination Recommendations of the

Advisory Committee on Immunization Practices. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 64, n. 11, p. 300-304, 2015.

PETRY, K. U. HPV and Cervical Cancer. **Scandinavian J. of Clin. and Lab, Invest Supplementum**, v. 74, n. 244, p. 59-62, 2014.

PIRMORADI, Z.; NAZARI, K.; SHAFIEE, N.; NIKOUKAR, N. et al. Oral cancer and HPV: Review Article. **Asian Pac J Cancer Biol**, v. 9, n.1, p. 87-95, 2024.

PRADO, R.; SALIM, M. **Cirurgia Bucomaxilofacial - Diagnóstico e Tratamento**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Grupo Gen, 2018.

PRIGGE, E. S.; VON KNEBEL, D. M.; REUSCHENBACH, M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. **Mutat. Res. Ver. Mutat. Res.**, v. 772, n. 1, p. 51-66, 2017.

QUEIROZ, F. A.; ROCHA, D. A. P.; FILHO, R. A. A. B.; SANTOS, C. M. B. Detection and genotyping of HPV in women with indeterminate cytology and low-grade squamous intraepithelial lesions. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 51, n. 3, p. 166-172, 2015.

RAMOS, E. **A importância do teste de captura híbrida 2 no acompanhamento de pacientes tratadas por lesão intraepitelial cervical de alto grau**. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

REIS, A. A. S.; DE PAULA, L. B.; MONTEIRO, C. D.; SANTOS, R. D. S. et al. Infecção viral e estudos moleculares dos carcinomas associados ao Papilomavírus Humano. **Estudos**, v. 37, n. 7-8, p. 607-624, 2010.

RIETH, K. K. S.; GILL, S. R.; LOTT-LIMBACH, A. A.; MERKLEY, M. A. et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus in tonsil tissue in healthy adults and colocalization in biofilm of tonsillar crypts. **JAMA Otolaryngology Head Neck Surgery**, v. 144, n. 3, p. 231-237, 2018.

RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, M. I.; GÓMEZ-URQUIZA, J. L.; HUSEIN-EL, A. H.; ALBENDÍN-GARCÍA, L. Prevalence and risk factors of human papillomavirus in male patients: A systematic review and metaanalysis. **Int. J. Environ Res. Public Health**, v. 15, n. 10, 2018.

ROMANOS, M. T. V. Viroses oncogênicas. In: SANTOS, N. S. O; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

ROOS, N.; BREINER, B.; PREUSS, L.; LILIE, H.; HIPPEL, K.; HERRMANN, H.; HORN, T.; BIENER, R.; IFTNER, T.; SIMON, C. Optimized production strategy of the major capsid protein HPV 16L1 nonassembly variant in E. coli. **Protein Expression and Purification**, v. 175, 2020.

SASLOW, D. ET AL. DIANE, S.; HERSCHEL, W. L.; MAUREEN, K. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. **J. Low Genit. Tract. Dis.**, v. 62, n. 3, p. 147-172, 2012.

SCHIFFMAN, M.; VAUGHAN, L. M.; RAINE-BENNETT, T. R.; CASTLE, P. E. A study of HPV typing for the management of HPV positive ASC-US cervical cytologic results. **Gynecologic Oncology**, v. 138, n. 1, p. 573- 578, 2015.

SENA, L. X; SOUZA, N. A; GRADELLA, D. B. T. Conhecimento, atitude e prática do exame Papanicolaou por mulheres do norte do espírito santo. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, vol. 15, n. 27, p. 102-112, 2018.

SICHERO, L.; PICARETAS, VILLA, L. L. The contribution of Latin American research to HPV epidemiology and natural history knowledge. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 53, n. 2, 2020.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: a Cancer of Journal Clinicians**, v. 64, n. 1, p: 9–29, 2014.

SILVA, E. R. et al. Diagnóstico molecular do papilomavírus humano por captura híbrida e reação em cadeia da polimerase. **Femina**, Minas Gerais, vol. 43, n. 4, p. 181-184, 2015.

SILVA, Y. K. et al. **Papilomavírus humano (HPV) em câncer cervical**. In: Congresso Nordeste de Biólogos, n. 7, João Pessoa, 2017.

SOSSAUER, G.; ZBINDEN, M.; TEBEU, P. M.; FOSSO, G. K. et al. Impact of an educational intervention on women's knowledge and acceptability of human papillomavirus self-sampling: a randomized controlled trial in Cameroon. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

SOUZA, N. C. C. **Identificação da prevalência de variantes de papilomavírus humano (HPV) no estado de alagoas e desenvolvimento de “kit” de detecção e tipificação em amostra biológica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

TRISTÃO, W. et al., Epidemiological study of hpv in oral mucosa through pcr. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, Araras, vol. 78, n. 4, p. 66-70, 2012.

VANSHIKA, S.; PREETI, A.; SUMAIRA, Q.; VIJAY, K. et al. Incidence OF HPV and EBV in oral cancer and their clinico-pathological correlation– a pilot study of 108 cases. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**. v. 11, n. 2, p. 180-184, 2021.

VERNET-TOMAS, M.; MENA, M.; ALEMANY, L.; BRAVO, I. et al. Human papillomavirus and breast cancer: no evidence of association in a Spanish set of cases. **Anticancer Res**, v. 35, n. 2, p. 851-856, 2015.

VILLAGOMEZ, D. E. R. **Cancer cervical deteccion oportuna en Papanicolau en hospital basico iess duran año 2017**. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina da Universidade de Guayaquil, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina, Guayaquil, 2018.

VINODHINI, K.; SHANMUGHAPRIYA, S.; DAS, B. C.; NATARAJASEENIVASAN, K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. **Gynecologic Oncology**. v. 285, n. 3 p. 771-777, 2012.

WANG, T.; CHANG, P.; WANG, L.; YAO, Q. et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 48-55, 2012.

WENDLAND, E. M.; VILLA, L.L.; UNGER, E. R.; DOMINGUES, C. M. et al. Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 4020, 2020.

WENTZENSEN, N.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Biomarkers in cervical cancer screening. **Diseases Markers**, v. 23, n. 4, p.315-330, 2007.

WILSON, L. PAWLITA, M.; CASTLE, P. E.; WATERBOER, T. et al. Natural immune responses against eight oncogenic human papillomaviruses in the ASCUS-LSIL triage study. **Int. J. Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2172-2181, 2013.

XAVIER, H. V.; RODRIGUES, A. L. G.; TOURINO, L. H. P.; SOUZA, C. S. Epidemiological characteristics of oral cancer in the state of Acre. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n. 10, p. 80491-80507, 2020.

ZAMBRANO-RÍOS, D.; FERNÁNDEZ; DAZA, F. F.; MATTA, A. J. Detección del virus del papiloma humano en mucosa oral de mujeres de Cali, Colombia. **Infectio**, v. 23, n. 3, p. 266-270, 2019.

ZHAO, X. Y.; LI, S. Y.; LI, Y.; WANG, X. L. et al. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma tissues from Baoding City of Hebei Province. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, v. 23, n. 2, p. 91-93, 2009.

ZHOU, Y.; LI, J.; JI, Y.; REN, M. et al. Inconclusive role of human papillomavirus infection in breast cancer. **Infectious agents and cancer**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2015.

ANEXO I - PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL SÓCIO-ECONÔMICO-CULTURAL E FATORES DE RISCO PARA HPV EM MULHERES DE JUAZEIRO DO NORTE, CEARÁ

Pesquisador: MATHEUS MOURA DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56917421.6.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.379.781

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como objetivo avaliar a prevalência da infecção pelos HPV's 6/11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 e 59 em mulheres residentes em Juazeiro do Norte, Ceará. Existe carência de informações da prevalência do HPV em diferentes regiões geográficas do Brasil e da prevalência em outros sítios anatômicos além da região cervical, assim como de estudos que pesquisem na mesma população em diferentes regiões anatômicas. Com isso, espera-se estabelecer o perfil sócio-econômico-cultural e os subtipos de HPV presentes no colo uterino e na cavidade oral de mulheres atendidas em clínicas do município de Juazeiro do Norte, Ceará.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência da infecção pelos HPV's 6/11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 e 59 em mulheres residentes em Juazeiro do Norte, Ceará.

Objetivo Secundário:

- Analisar os dados demográficos, laboratoriais e comportamentais das participantes associadas com a infecção pelo HPV. ---- Determinar a frequência e os tipos de HPV na cavidade oral e do colo uterino das participantes.
- Estimar alterações da prevalência do HPV nesta população atribuída a vacinação.
- Estudar a correlação entre o HPV identificado na cavidade oral e o HPV presente no colo uterino.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 5.379.781

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco associado a pesquisa é de exposição de dados, porém para evitar esse problema todas as participantes serão identificadas por números, excluindo qualquer forma de rastreamento das participantes.

Benefícios:

Identificar os tipos de HPVs mais recorrentes na região e o perfil epidemiológico da população afetada mostra-se uma estratégia eficaz para a criação de campanhas educacionais direcionadas para o público-alvo à infecção, com o intuito de qualificar o conhecimento e minimizar as estimativas de novos casos de cânceres provocados pelo vírus

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em questão está bem escrito, de boa leitura e entendimento. Está incluído desenho do estudo, introdução, revisão, objetivos, metodologia, cronograma de atividades, orçamento e outros. A documentação exigida pela RESOLUÇÃO 466/2012/CNS/MS que regulamenta os estudos aplicados aos seres humanos está incluída.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação do trabalho estão coerentes com o tema abordado e o rigor da ética em pesquisa

Recomendações:

O projeto de pesquisa está devidamente instruído para que o mesmo seja executado. Portanto o parecer é favorável à sua APROVAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1837173.pdf	06/03/2022 13:39:55		Aceito
Outros	TERMO_DE_FIEL_DEPOSITARIO_BIO LAB.pdf	06/03/2022 13:38:57	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	06/03/2022 13:36:59	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 5.379.781

Orçamento	ORCAMENTO.pdf	06/03/2022 13:36:37	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	07/02/2022 16:31:19	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2021_PROJETO_MATHEUS_MOURA.pdf	07/02/2022 16:30:40	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Outros	CURRICULO_PESQUISADOR_PRINCIPAL.pdf	07/02/2022 16:28:45	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Outros	TERMO_DE_FIEL_DEPOSITARIO_VIDANALISE.pdf	07/02/2022 16:24:37	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS.pdf	07/02/2022 16:23:33	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	CARTA_SOLICITANDO_APRECIACAO_CEPUFC_v2.pdf	07/02/2022 16:22:41	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_DOS_PESQUISADORES v2.pdf	07/02/2022 16:17:59	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.pdf	07/02/2022 16:16:36	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	14/10/2021 09:08:18	MATHEUS MOURA DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 30 de Abril de 2022

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Estudo “PERFIL-SÓCIO-ECONÔMICO-CULTURAL E FATORES DE RISCO PARA HPV EM MULHERES DE JUAZEIRO DO NORTE, CEARÁ.”

- **Vidanalyse Centro de Diagnóstico**
- **Centro de Diagnóstico BioLab Análises**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado pelo pesquisador Matheus Moura dos Santos como participante da pesquisa intitulada “PERFIL SÓCIO-ECONÔMICO-CULTURAL E FATORES DE RISCO PARA HPV EM MULHERES DE JUAZEIRO DO NORTE, CEARÁ. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é compreender a frequência do HPV, comparando com as características clínicas e comportamentais da participante. Estas informações podem servir de auxílio no desenvolvimento de ações que busquem o controle e a prevenção desta doença. Caso você participe, será necessário responder um questionário com quinze perguntas que leva cerca de dez minutos para ser respondido integralmente. O questionário tem perguntas pessoais como idade, escolaridade, renda, antecedente pessoal, consumo de cigarros, de bebida alcoólica, atividade sexual, histórico de doenças sexualmente transmissíveis e vacina contra HPV. Caso você experimente algum desconforto ao responder o questionário, poderá deixar de responder as questões que eventualmente lhe causarem incômodo. Será realizado um exame de detecção do vírus. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida.

Será realizada uma rápida coleta de células da sua cavidade oral e, aproveitando que você irá realizar o Papanicolau, uma pequena quantidade de amostra do colo uterino também será coletada para a realização da pesquisa.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer tipo de pagamento, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois você será identificado com um número (registro do laboratório).

Endereço dos responsáveis pela pesquisa:**Nome:** Dr^a *Cristiane Cunha Frota***Instituição:** *Universidade Federal do Ceará***Endereço:** *Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza***Telefones para contato:** *(085) 3366-8303.***Nome:** Matheus Moura dos Santos**Instituição:** *Universidade Federal do Ceará***Endereço:** *Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza*

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00- 12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa (preencher abaixo):		
Nome do pesquisador	Data (D/M/A):	Assinatura
Nome da testemunha (se o voluntário não souber ler)	Data (D/M/A):	Assinatura
Nome do profissional (que aplicou o TCLE)	Data (D/M/A):	Assinatura

APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO

1. Caracterização Sócio-Econômico-Demográfica

Código da Pergunta	Pergunta	Código do Descritor	Código da Resposta
01.	IDADE	_____ Anos	IDADE
02.	ESTADO CIVIL	1. Solteira 2. Casada 3. Prefiro não responder.	ESTACIVIL
03.	ESCOLARIDADE	1. Sem instrução. 2. Fundamental I completo. 3. Fundamental I completo/Fundamental II incompleto. 4. Fundamental II completo/Médio Incompleto. 5. Médio completo/Superior incompleto 6. Superior completo. 7. Não sei/não quer responder.	ESCOL
04.	OCUPAÇÃO	1. Trabalha. 2. Estuda. 3. Trabalha e estuda. 4. Não trabalho e nem estuda. 5. Não sei/não quer responder.	OCUP
05.	SALÁRIO MENSAL (SE TRABALHA)	1. Menos de 1 salário mínimo. 2. Um (1) salário mínimo. 3. Entre 1 e 2 salários mínimos. 4. Mais de 2 salários mínimos. 5. Não sei/não quer responder.	SALM
06.	NÚMERO DE RESIDENTES	1. Moro sozinha. 2. 2 Pessoas. 3. 3 Pessoas. 4. 4 ou mais. 5. Não quero responder.	RESID

2. Patologias Associadas

Código da Pergunta	Pergunta	Código do Descritor	Código da Resposta
07.	DOENÇA CRÔNICA	1. Sim. 2. Não. 3. Não sei/não quero responder	DOENCR
08.	QUAL DOENÇA CRÔNICA		DCRON
09.	DIAGNÓSTICO DE IST	1. Sim. 2. Não. 3. Não sei/não quero responder	ISTDIAG
10.	QUAL IST		IST
11.	LESÃO NA CAVIDADE ORAL	1. Sim 2. Não 3. Prefiro não responder	CAVIORAL

3. Análise dos Hábitos

Código da Pergunta	Pergunta	Código do Descritor	Código da Resposta
12.	USO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS	1. Sim, com frequência. 2. Sim, mas com pouca frequência. 3. Não 4. Prefiro não responder.	ALCOOL
13.	FUMA	1. Sim, com frequência. 2. Sim, mas com pouca frequência. 3. Não 3. Prefiro não responder.	FUM
14.	FUMA HÁ QUANTO TEMPO	_____ (tempo em anos)	FUMTEM
15.	USO DE DROGAS ILÍCITAS	1. Sim, com frequência. 2. Sim, mas com pouca frequência. 3. Não. 3. Prefiro não responder.	DROG
16.	USO DE DROGAS ILÍCITAS HÁ QUANDO TEMPO	_____ (tempo em anos)	DROGTEM
17.	VACINA PARA HPV	1. Sim. 2. Não. 3. Não sei/não quero responder.	VACHPV
18.	TIPO DE VACINA PARA HPV	1. Rede Pública 2. Rede Privada 3. Não sei/prefiro não responder.	VACTIPO
19.	USO DE MÉTODOS CONTRACEPTIVOS	1. Sim 2. Não. 3. Prefiro não responder.	METCONT
20.	QUAL MÉTODO CONTRACEPTIVO?	_____	CONTRAC

3. Dados Laboratoriais

Código da Pergunta	Pergunta	Código do Descritor	Código da Resposta
21.	REALIZOU PREVENÇÃO (PAPANICOLAU)	1. Sim. 2. Nunca realizei. 3. Prefiro não responder.	PAPA
22.	COMO FOI O RESULTADO	1. Normal, sem nenhuma alteração. 2. Alterado, deu alguma alteração. 3. Não lembro/não quero responder.	PAPADIAG
23.	TESTE POSITIVO PARA HPV	1. Sim. 2. Não. 3. Não sei/não quero responder.	HPVPOS

APÊNDICE III – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, INVITROGEN)

invitrogen

1. Ao receber a amostra, registrar e manter congelada em freezer (-20 °C) até o momento da extração do DNA.
2. **Para a extração de biópsias:** deixar a biópsia à temperatura ambiente para descongelar por até 10 minutos. Transferir a biópsia para uma placa de Petri estéril e cortar em pequenos fragmentos com auxílio de bisturi. Transferir os fragmentos, com auxílio da ponta da ponteira e bisturi, para o microtubo original. **Para a extração de Swabs:** Transferir o Swab para um microtubo estéril, previamente identificado, e cortar a haste com auxílio de bisturi. **Para a extração de escovas:** Não é necessário preparo prévio.
3. Adicionar **180 µL de PureLink™ Genomic Digestion Buffer (nº 1)** - *permite a ruptura da membrana plasmática* - e **20 µL de Proteinase K (nº 2)** ao tubo - *digestão enzimática (hidrólise das proteínas - quebra das histonas e consequente quebra da membrana nuclear, colocando o DNA em suspensão*. Certifique-se de que o tecido está completamente imerso na mistura do tampão.
4. Agitar em vórtex - *ruptura mecânica* - e incubar a 55 °C - *temperatura ótima de atuação da enzima* - em Thermo-shaker a 250 rpm (ou banho seco). Geralmente deixa-se a amostra *overnight* (18 - 20 horas).
5. Adicionar **20 µL de RNase A (nº 3)** - *promoverá a eliminação de qualquer RNA residual por digestão, antes de ligar as amostras à membrana de sílica* - misturar bem por vórtex breve e incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos (deixar em repouso na estante, em cima da bancada).
6. Adicionar **200 µL de PureLink™ Genomic Lysis / Binding Buffer (nº 4)** - *permite alta ligação do DNA na coluna de sílica* - e misturar bem por agitação em vórtex para se obter uma solução homogênea.
7. Adicionar **200 µL de Etanol 100%** ao lisado - *o etanol promove uma transição estrutural na molécula de DNA, resultando em agregação e precipitação*. Misturar bem por agitação em vórtex para se obter uma solução homogênea.
8. Retire uma **coluna PureLink™ Spin** - *coluna que contém resina de sílica, que promove a ligação seletiva do DNA*.
9. Adicionar o lisado (~ 640 µL) para a **coluna PureLink™ Spin**. **Dica:** utilizar a ponteira amarela (pipeta de 200 µL) para evitar transferir pedaços de biópsias que possam entupir a coluna.
10. Centrifugar a coluna a 10.000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente.
11. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna de centrifugação em um novo **tubo coletor PureLink™ Collection** fornecido com o kit.
12. Adicionar **500 µL de Wash Buffer 1 (nº 5)** - *o tampão de lavagem tem o objetivo de retirar as impurezas. O DNA permanece ligado à coluna de sílica*. **Atenção:** verificar se o etanol já foi adicionado previamente ao tampão.
13. Centrifugar a coluna a 10 000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente.

14. Rejeitar o tubo coletor e colocar a coluna de centrifugação em um outro **tubo PureLink™ Collection** fornecido com o kit.
15. Adicionar **500 µL de Wash Buffer 2 (nº 6)** - *o tampão retira as impurezas; o DNA permanece ligado à coluna de sílica.* **Atenção:** verificar se o etanol já foi adicionado previamente ao tampão.
16. Centrifugar a coluna à velocidade máxima (13.000 rpm) durante 3 minutos à temperatura ambiente. Descartar o tubo coletor.
17. Colocar a coluna de centrifugação em um microtubo estéril de 1,5 mL previamente identificado (retirar a tampa – cortar com auxílio de tesoura previamente higienizada com álcool 70%).
18. Adicionar **50 µL de PureLink™ Genomic Elution Buffer (nº 7)** à coluna. Escolher o volume de eluição adequado para as suas necessidades (utiliza-se geralmente 50 µL – pode variar de acordo com a quantidade estimada de DNA alvo na amostra clínica). *Através do tampão de eluição o DNA será eluído através da coluna, pois o mesmo possui baixa força iônica (pH 9,0).*
19. Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto (deixar em repouso na estante). Centrifugar a coluna à velocidade máxima (13.000 rpm) durante 2 minutos à temperatura ambiente.
20. O tubo coletor contém DNA purificado. Descartar a coluna. Tampar o microtubo e quantificar o DNA em espectrofotômetro NanoDrop®.
21. Identificar o microtubo (tampa e corpo) indicando o NÚMERO DA AMOSTRA, INICIAIS DO PACIENTE, [DNA] e DATA. Inserir os dados no livro de protocolo e na planilha do Google Drive.