

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

MAGDA ROGÉRIA PEREIRA VIANA

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR, MICRONÚCLEO E  
ESPECTROSCOPIA FT-IR NO DIAGNÓSTICO DO HPV NA  
PREVENÇÃO DO CÂNCER CERVICAL**

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS/SP  
2020

MAGDA ROGÉRIA PEREIRA VIANA

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR, MICRONÚCLEO E  
ESPECTROSCOPIA FT-IR NO DIAGNÓSTICO DO HPV NA  
PREVENÇÃO DO CÂNCER CERVICAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, nível doutorado, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba-UNIVAP.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Azevedo Canevari

Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS/SP  
2020

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

Viana, Magda Rogéria Pereira  
APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR, MICRONÚCLEO E ESPECTROSCOPIA  
FT-IR NO DIAGNÓSTICO DO HPV NA PREVENÇÃO DO CÂNCER CERVICAL /  
Magda Rogéria Pereira Viana; Renata de Azevedo Canevari; Leandro  
José Raniero; orientadora, Renata de Azevedo Canevari;  
co-orientadora Leandro José Raniero . - São José dos Campos, SP,  
2020.  
87 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José  
dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências


1. Engenharia Biomédica. 2. Papilomavírus Humano. 3. Técnica  
de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). 4. Técnica de  
Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)  
. 5. Técnica de Micronúcleo. I. Canevari, Renata de Azevedo. II.  
Raniero, Leandro José. III. Canevari, Renata de Azevedo, orient.  
IV. Raniero, Leandro José, co-orient. V. Universidade do Vale  
do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.  
VI. Título.

Eu, Magda Rogéria Pereira Viana, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em  
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o  
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado  
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de  
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e  
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 24 de Maio de 2020.

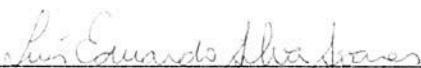
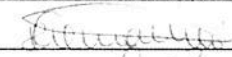


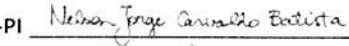
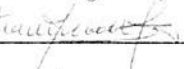


Autor(a) da Obra

MAGDA ROGÉRIA PEREIRA VIANA

“APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICRONÚCLEO E ESPECTROSCOPIA FT-IR  
EM COMPARAÇÃO AO TESTE MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DO HPV.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. LUIS EDUARDO SILVA SOARES   
PROF.ª DR.ª RENATA DE AZEVEDO CANEVARI   
PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO   
PROF.ª DR.ª MAIARA LIMA CASTILHO   
PROF. DR. NELSON JORGE CARVALHO BATISTA – UNIFSA-PI   
PROF.ª DR.ª CRISTIANE YUMI KOGA-ITO – Unesp 

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 28 de fevereiro de 2020.

## DEDICATÓRIA

A Deus pelo sustento que me concedeu para  
chegar até aqui, mesmo diante de tantos  
obstáculos

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela saúde e força por guiar os meus passos e não me deixar desistir nesta caminhada tão árdua, por me amparar nos momentos difíceis e de dor e me dar força interior para superar as dificuldades, para continuar e findar esta caminhada e principalmente por suprir todas as minhas necessidades.

À professora Dra. Renata de Azevedo Canevari, minha orientadora, mulher forte, pelo aprendizado resultante de suas orientações, que me trouxeram grande enriquecimento. Muito obrigada pelo apoio numa hora tão delicada da minha vida e por tornar possível a realização deste grande desafio. Ao professor Dr. Leandro José Raniero, meu co-orientador, que contribuiu muitíssimo com seu saber incomparável. Ao professor Dr. Nelson Jorge Carvalho Batista, pela colaboração e dedicação. À banca examinadora pelas relevantes contribuições para enriquecimento deste estudo.

A uma pessoa muito especial pela competência, dedicação e prontidão em me ajudar nessa caminhada cheia de dificuldades, com suas contribuições valiosas na construção deste sonho. Meus sinceros agradecimentos a você Igor Martins! Ao Dr. Breno Pupin que se dispôs a contribuir com este trabalho. A todos do Laboratório de Biologia Molecular da UNIVAP, pela força e pela convivência fraterna nos momentos que estive com vocês.

À Universidade do Vale do Paraíba e ao Centro Universitário Santo Agostinho UNIFSA por permitirem a realização do estudo em seus laboratórios. Aos professores, Rauyres e Fernanda, pela ajuda no decorrer de todo o processo, obrigada amigos. Ao Centro Universitário UNINOVAFAPI, pelo incentivo de sempre à formação docente e às alunas deste que me ajudaram com na coleta das amostras, de forma muito especial à Geovana, que sempre esteve disponível a colaborar até o último momento das coletas.

A minha mãezinha (Gerarda - *in memoriam*), por me ensinar que o estudo e o conhecimento são as maiores riquezas do ser humano, amo-a pra sempre!!! Ao meu paizinho (Antônio - *in memoriam*), que tanto falava neste momento e que nunca imaginei agradecê-lo por meio desta escrita, quanta saudade meu velhinho!!! As minhas irmãs, filhos, esposo, sobrinhos e demais familiares pelo carinho, paciência, incentivo e por acreditar que seria capaz de chegar até aqui.

Agradeço aos amigos que fizeram parte desses momentos, em especial à Teresa Marly, Larissa, Laís, Adélia, Francina, Eronice, Tânia Furtado, Socorro, que sempre me ajudaram e incentivaram em todas as horas dessa árdua caminhada.

Às pacientes que depositaram em mim sua confiança e tornaram possível a realização deste, pois sem elas não seria possível.

Meu sincero agradecimento a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo. MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

O câncer de colo de útero é considerado o terceiro tumor mais frequente e a segunda causa de mortalidade de mulheres no Brasil, sendo considerado um problema de saúde pública. A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é um dos principais fatores de risco que contribui para o desenvolvimento desta neoplasia. O principal método para o diagnóstico é a análise citológica pelo exame de Papanicolaou, mas a alta taxa de casos falso-negativos inviabiliza uma avaliação adequada, sendo importante o uso de técnicas auxiliares de detecção do HPV e, conseqüentemente, no diagnóstico desta doença. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia, aplicabilidade, sensibilidade e especificidade dos métodos alternativos para a detecção do HPV na prevenção do câncer cervical. As técnicas MN e FT-IR são indiretas, mas podem fornecer resultados úteis na detecção do HPV em pacientes submetidas ao exame citopatológico. As amostras de fluido cervical foram obtidas de 50 pacientes com citológica normal, posteriormente analisada pela PCR, teste de MN e análise de FT-IR. A análise molecular consistiu de extração do DNA das amostras endocervicais pelo protocolo *QIAamp® Virus Spin kit* (Qiagen), seguida da realização da PCR do gene viral *L1* utilizando-se os iniciadores MY09 e MY11. As amostras foram divididas com base nos resultados da PCR em dois grupos, HPV positivo (sete amostras) e HPV negativo (43 amostras). As análises dos testes de MN das amostras ectocervicais foram realizadas pelas leituras das frequências absoluta (N) e relativa (%), obtidas as médias, desvios padrões e analisadas pelos testes Shapiro-Wilk, Mann-Whitney e Qui-quadrado ( $X^2$ ). As análises de FT-IR das amostras endocervicais foram realizadas no equipamento *Spectrum 400*. A partir da matriz de covariância foram obtidos os componentes principais (PCs), e por meio das análises discriminantes linear e quadrática, supervisionada pelos resultados da PCR (grupos HPV positivo e HPV negativo), foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade. Os resultados das análises de PCR das 50 amostras permitiram validar 43 exames citológicos, mas sete amostras de resultado citológico negativo estavam infectadas pelo HPV. Os testes de MN mostraram maiores frequências de MN em amostras com HPV positivo, fatores relacionados a idade, ao abortamento e o uso de bebidas alcoólicas. Os espectros de análise FT-IR mostraram variações nas bandas de DNA e proteínas em amostras com alta frequência de MN, provavelmente devido à presença de histonas nucleossômicas e DNA que formam o MN. A análise dos componentes principais dos espectros de FT-IR não foi capaz de separar eficientemente as amostras HPV positivas das HPV negativas, mostrando-se inespecífico para diagnosticar o vírus. Assim, com a realização do estudo observou-se que a técnica de PCR pode ser considerada padrão ouro para a detecção do HPV por sua alta sensibilidade, que o aumento da frequência de MN observado neste estudo em amostras infectadas pelo HPV, pode ser devido à instabilidade genômica, causada pela presença do vírus, e que, apesar da espectroscopia FT-IR apresentar grande potencial, por ser um teste de alta sensibilidade e especificidade no rastreamento do câncer cervical, neste estudo não demonstrou ser eficiente na discriminação de amostras infectadas pelo HPV. Dessa forma, enfatiza-se que, estudos adicionais devem ser conduzidos para a aplicação da espectroscopia FT-IR e o teste de MN no diagnóstico da infecção pelo HPV e conseqüente aplicação na prevenção de câncer cervical.

**Palavras-chave:** Papilomavírus. Teste molecular. Reação em Cadeia de Polimerase. Teste de Micronúcleo. Espectroscopia FT-IR.

# APPLICATION OF PCR, MICRONUCLEUS AND FT-IR SPECTROSCOPY TECHNIQUES IN HPV DIAGNOSIS IN THE PREVENTION OF CERVICAL CANCER

## ABSTRACT

Cervical cancer is considered the third most frequent tumor and the second leading cause of mortality in women in Brazil, being considered a public health problem. Human Papillomavirus (HPV) infection is one of the main risk factors that contribute to the development of this neoplasm. The main method for diagnosis is cytological analysis by Pap smear, but the high rate of false-negative cases makes an adequate evaluation impossible, being important the use of auxiliary techniques for hpv detection and, consequently, disease diagnosis. This study aimed to evaluate the efficacy, applicability, sensitivity and specificity of alternative methods for hpv detection in the prevention of cervical cancer. The MN and FT-IR techniques are indirect, but can provide useful results in the detection of HPV in patients undergoing cytopathological examination. The cervical fluid samples were obtained from 50 patients with normal cytology, later analyzed by PCR, MN test and FT-IR analysis. Molecular analysis consisted of DNA extraction from endocervical samples using the QIAamp® Virus Spin kit (Qiagen) protocol, followed by PCR of the viral L1 gene using the MY09 and MY11 primers. The samples were divided based on the PCR results into two groups, HPV positive (seven samples) and HPV negative (43 samples). The analyzes of the MN tests of the ectocervical samples were performed by reading the absolute (N) and relative (%) frequencies, obtaining the means, standard deviations and analyzed by the Shapiro-Wilk, Mann-Whitney and Chi-square tests ( $X^2$ ). FT-IR analyses of endocervical samples were performed in spectrum 400 equipment. From the covariance matrix, the main components (PCs) were obtained, and through linear and quadratic discriminant analyses, supervised by PCR results (positive and negative HPV groups), sensitivity and specificity values were calculated. The results of the PCR analysis of the 50 samples allowed to validate 43 exams, but seven samples of negative result were infected with HPV. MN tests showed higher frequencies of NM in samples with positive HPV, factors related to age, abortion and alcohol use. The FT-IR analysis spectra showed variations in DNA and protein bands in samples with high Frequency of MN, probably due to the presence of nucleosomal histones and DNA that form the MN. The analysis of the main components of the FT-IR spectra was not able to efficiently separate positive HPV samples from negative HPV, showing to be non specific to diagnose the virus. Thus, with the accomplishment of the study, it was observed that the PCR technique can be considered the gold standard for HPV detection due to its high sensitivity, that the increased frequency of NM observed in this study in HPV-infected samples may be due to genomic instability caused by the presence of the virus, and that, although FT-IR spectroscopy has great potential, as it is a test of high sensitivity and specificity in cervical cancer screening, in this study it did not prove to be efficient in discriminating hpv-infected samples. Therefore, it is emphasized that additional studies should be conducted for the application of FT-IR spectroscopy and the MN test in the diagnosis of HPV infection and consequent application in the prevention of cervical cancer.

**Keywords:** Papillomavirus. Molecular test. Polymerase Chain Reaction. Micronucleus test. FT-IR spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da infecção pelo HPV. ....	20
Figura 2: Esquema ilustrativo da formação do MN após dano citogenético.....	28
Figura 3: Figura esquemática representativa de um Interferômetro de Michelson .....	30
Figura 4: Fotografia do material utilizado para coleta de fluido para PCR.....	33
Figura 5: Fotografia do material utilizado para coleta de citologia oncótica .....	33
Figura 6: Esquema descritivo da coleta e preparo de lâmina para citologia oncótica Papanicolaou.....	35
Figura 7: Fluxograma descritivo das etapas do preparo de lâminas para análise do MN. ....	38
Figura 8: Imagem obtida por Eletroforese em gel de agarose (2,0%) da amplificação do gene HPV <i>L1</i> utilizando os iniciadores MY09 e MY11 de 17 amostras de DNA do fluido cervical, mostrando sete amostras positivas para infecção viral (HPV +). ....	43
Figura 9: Imagem obtida por análise de microscopia óptica mostrando células superficiais, parabasais e basais, com presença e ausência de MN obtidas de fluido cervical, citologia de meio líquido, 1000X. ....	44
Figura 10: Gráfico do tipo <i>BoxPlot</i> dos resultados das amostras de fluido cervical HPV positivo e HPV negativo pelo teste molecular, em relação ao número de micronúcleos. ....	45
Figura 11: Gráfico de dispersão do número de MN por célula em 50 amostras de fluido cervical analisadas. As diferentes cores são utilizadas para diferenciar os resultados obtidos da PCR, amostras HPV positivo e HPV negativo. ....	47
Figura 12: Gráfico de classificação de sensibilidade e especificidade, ROC comparando os resultados da frequência de MN entre amostras HPV positivo e HPV negativo pela análise molecular. ....	47
Figura 13: Comparação entre os espectros de amostras negativas para HPV (vermelho) e amostras positivas para HPV (preto), sendo: A) os espectros e B) segunda derivada espectral .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura histopatológica e citopatológica utilizada no diagnóstico das lesões cervicais escamosas. ....	22
Tabela 2: Estudos sobre FT-IR, em relação ao Autor, Ano e principais Resultados. ....	31
Tabela 3: Tamanho das sequências amplificadas ( <i>amplicons</i> ) para os iniciadores MY09/MY11 de diferentes tipos de HPV's.....	36
Tabela 4: Características clínicas e comportamentais das pacientes e sua relação com a infecção pelo HPV.....	41
Tabela 5: Resultados das análises de citologia oncótica e PCR do gene <i>L1</i> do HPV em 50 amostras de fluido cervical de pacientes submetidas ao exame ginecológico. ....	42
Tabela 6: Frequência de MN observada, com valores de média e desvio padrão, na comparação entre os grupos de pacientes HPV positivo e HPV negativo. ....	45
Tabela 7: Relação de fatores de risco para câncer de colo de útero com e frequência de micronúcleos analisados em células de fluido cervical de 50 pacientes submetidas ao exame ginecológico. ....	46
Tabela 8: Diferença na segunda derivada do grupo HPV pela atribuição dos modos vibracionais e picos de absorção. ....	49
Tabela 9: Análise discriminante quadrática com validação cruzada baseada na Análise de Componentes Principais usando toda a faixa espectral. ....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIS: Atipias de significado indeterminado  
CNS: Conselho Nacional de Saúde  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
DST: Doença sexualmente transmissível  
ESF: Estratégia Saúde da Família  
FISH: Hibridação *in situ* por Fluorescência  
FT-IR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier  
HPV: Papilomavírus humano  
HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
IST's: Infecção sexualmente transmissível  
dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfatado  
LCR: Região reguladora  
LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau  
MN: Micronúcleo  
MS: Ministério da Saúde  
NaCl: Cloreto de sódio  
NIC: Neoplasia Intra-epitelial Cervical  
ORI: Origem de replicação  
ORF: *Open reading frame* que significa fase de leitura aberta  
PCR: Reação em Cadeia de Polimerase  
RNA: Ácido ribonucléico  
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
SUS: Sistema Único de Saúde  
TBE: Trisborato Ácido bórico EDTA  
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
UBS: Unidade Básica de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Papilomavírus Humano</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Fatores de Risco para Infecção pelo HPV</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Câncer do colo do útero</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4 Métodos atuais de diagnóstico do HPV</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4.1 Testes Sorológicos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4.2 Testes Morfológicos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4.3 Testes Moleculares</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5 Tratamento do Paciente Infectado pelo HPV</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6 Teste de Micronúcleo</b> .....	<b>26</b>
<b>3.7 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier</b> .....	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Casuística</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Pacientes e coleta das amostras</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3 Citologia Oncótica Papanicolaou</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4 Análise Molecular pela PCR</b> .....	<b>35</b>
<b>4.5 Teste de Micronúcleo</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6 Espectroscopia FT-IR</b> .....	<b>38</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 Análise Clínica das Pacientes</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2 Análise Citológica</b> .....	<b>41</b>
<b>5.3 Análise molecular</b> .....	<b>42</b>
<b>5.4 Análise pelo Teste de MN</b> .....	<b>43</b>
<b>5.5 Análise dos espectros de FT-IR</b> .....	<b>47</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>68</b>
<b>APÊNDICE 2</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>74</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>78</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>81</b>
<b>ANEXO 4</b> .....	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que ganhou relevância em virtude do seu perfil epidemiológico apresentado, com crescente aumento do número de casos anualmente. Estes fatos vêm conquistando importância, tanto na área da saúde quanto nas políticas públicas mundiais, propiciando pesquisas científicas que permitam o diagnóstico, a cura e/ou um tratamento eficaz. Com o maior conhecimento da etiologia e biologia desta doença é possível estabelecer prioridades e designar recursos, que sejam direcionados para a mudança positiva desse cenário. A vigilância de câncer destina-se, como em qualquer sistema de vigilância, a produzir informações para a tomada de decisões (INCA, 2017).

Esta doença é caracterizada pelo crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, originado na maioria dos casos, por condições multifatoriais, que podem agir em sequência ou em conjunto para promover ou iniciar a doença. Alguns tipos de câncer podem ser evitados pela supressão da exposição aos fatores de risco, assim, medidas preventivas devem ser implementadas, como as estratégias para o controle do tabagismo, a promoção da alimentação saudável, a vacinação para Papilomavírus humano (HPV), o estímulo à prática de atividades físicas, dentre outras. Além disso, o diagnóstico precoce aumenta a chance de cura para acima de 90% para a maioria dos tumores (INCA, 2016).

Entre os vários tipos de câncer, o câncer de colo uterino ocorre lentamente e é precedido por lesões intra-epiteliais que são caracterizadas por uma desorganização do epitélio malpighiano. A altura do epitélio implicado nas anomalias é descrita pelos graus I, II, e III da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC). Assim, é necessário realizar a prevenção para evitar esta ocorrência que pode se tornar em aumento da morbimortalidade pela doença (WALBOOMERS *et al.*, 2009).

No Brasil, a estimativa de incidência de morte por câncer de colo está em torno de 19 por 100.000 mulheres (19/100.000). Os estados da região Sul apontam maiores taxas de mortalidade, tais como no Paraná 25/100.000 e no Rio Grande do Sul 28/100.000, taxas estas que dependem da exposição das mulheres aos fatores de risco e da efetividade de um programa de rastreamento do câncer. No Piauí, aproximadamente 12/100.000 mulheres são anualmente, vitimadas pelo câncer de colo uterino. No mundo, 570 mil foram diagnosticadas somente em 2018, e em média, as mortes por câncer de colo uterino neste ano ocorreram em

311 mil mulheres, sendo destaque dessas mortes os países de baixa e média renda com mais de 85% dos casos (OPAS, 2019).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de colo uterino é considerado o terceiro tumor mais frequente na população, depois do câncer de mama e do colorretal e a segunda causa de morte em mulheres por câncer no Brasil, sendo considerado um grave problema de saúde pública. A incidência deste tipo de câncer vem crescendo anualmente no Brasil, quando se pode destacar que 80% dos novos casos ocorrem nos países em desenvolvimento e preferencialmente em mulheres jovens (INCA, 2018).

O HPV é apontado como um dos grandes responsáveis pelo desenvolvimento deste câncer. É um DNA-vírus da família Papillomaviridae, que acomete cerca de 600 milhões de pessoas no mundo. Este vírus é uma cepa viral que se instala na pele e mucosas genitais e evolui lentamente, afetando tanto mulheres quanto homens, sendo que nestes últimos o seu desenvolvimento ocorre de forma assintomática. A presença do vírus é capaz de favorecer o aparecimento de lesões benignas e malignas, sendo associado a 99% dos casos de câncer do colo uterino e 20 a 50% dos casos de câncer do pênis (INCT-HPV, 2013).

No Brasil, todo ano são esperados 700 mil novos casos de pessoas infectadas pelo vírus, aproximadamente 10 milhões de pessoas serão portadoras do vírus e em algum momento da vida, 75 a 80% da população irá contrair algum tipo de HPV. Dados estatísticos evidenciam que o aumento da incidência de infecção pelo HPV é devido, dentre outros fatores, ao início da vida sexual cada vez mais precoce, a múltiplos parceiros sexuais e à prática do sexo desprotegido (INCA, 2018).

Como a infecção pelo HPV é citada como um dos principais fatores de risco para o aparecimento do câncer cervical, o desenvolvimento de métodos que detectem a infecção por este vírus é extremamente importante para a prevenção e diagnóstico do câncer cervical. Neste sentido, prevenir essa doença ainda é a melhor opção, por isso, quanto mais precoce for o diagnóstico do HPV e a prevenção da neoplasia de colo uterino, melhor será o prognóstico da paciente. Nesta perspectiva, para a doença ser detectada precocemente e evitar o aumento da morbimortalidade é necessário a realização do exame preventivo.

Segundo os manuais do Ministério da Saúde (MS), todas as mulheres que têm vida sexual ativa devem realizar o exame de citologia oncológica para a detecção precoce do câncer de colo uterino, com enfoque maior para a faixa etária dos 25 a 64 anos de idade por ser a faixa etária de maior prevalência. Com a realização da citologia oncológica é possível detectar

alterações citológicas ocasionadas por diversos fatores, dentre eles, a infecção pelo HPV. Esta é uma técnica considerada padrão ouro na prática clínica, apesar de apresentar algumas desvantagens, tais como a sua baixa sensibilidade, ou seja, a probabilidade do teste ser falso negativo diante de casos de pacientes infectadas pelo HPV (INCA, 2017).

Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos alternativos, tais como análises moleculares, por exemplo, por meio da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a análise de Micronúcleos (MN) e técnicas espectroscópicas, como a Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) no sentido de detectar com maior precisão e confiabilidade as alterações que o vírus HPV pode causar nas células do colo uterino.

A técnica de PCR é considerada o método mais sensível para detecção do DNA do HPV em amostras clínicas. Esta metodologia caracteriza-se pela amplificação exponencial de sequência específica de DNA alvo, e tem potencial para a detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos, utilizando para isso iniciadores específicos para o genoma do HPV (RIVERO; NUNES, 2006).

O teste de MN é um método que pode identificar alterações nos núcleos dos tecidos que são alvos específicos de agentes carcinogênicos e genotóxicos nos quais os carcinomas se desenvolvem. Este teste tem sido considerado um método prático, rápido e de baixo custo para a detecção de grupos de risco e prevenção do câncer de colo uterino (VILANOVA *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017).

A realização da técnica de FT-IR possibilita avaliar a informação bioquímica da composição do tecido, como por exemplo, proteínas, polipeptídios, etc. Outro ponto importante é quantidade ínfima de amostras, permitindo medidas rápidas, confiáveis, controle de qualidade e análises dinâmicas (KONG; YOU, 2007).

Considerando estes aspectos, a aplicação dessas técnicas pode auxiliar na detecção das alterações que o HPV é capaz de causar nas células do colo uterino, possibilitando o diagnóstico precoce do câncer do colo uterino. O uso destas técnicas pode ter um impacto na prevenção secundária deste câncer, evitando, por exemplo, a progressão para lesões de alto grau. Como resultado, o tratamento será mais preciso, mais eficiente e conseqüentemente haverá possibilidade de um melhor prognóstico para o paciente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia, aplicabilidade, sensibilidade e especificidade dos métodos alternativos para a detecção do HPV na prevenção do câncer cervical.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificar pela técnica citopatológica de Papanicolaou a presença de alterações morfológicas, indicativas da infecção pelo HPV, em fluido cervical de pacientes que realizaram o exame citopatológico de rotina;
- Identificar a infecção pelo HPV por meio da técnica de PCR em amostras provenientes de exame ginecológico;
- Analisar a frequência de MN em células basais da mucosa uterina de pacientes submetidas ao exame ginecológico;
- Realizar a análise de FT-IR nas amostras de fluido cervical das mesmas pacientes para identificar alterações espectrais e bioquímicas que possam indicar a infecção pelo HPV;
- Correlacionar a presença de alterações citológicas com os resultados da PCR e com o número de MN encontrados em células basais da mucosa uterina das pacientes;
- Verificar a associação entre a presença de infecção pelo HPV pelo teste molecular e a frequência de MN das células do fluido cervical com as características clínicas e comportamentais das pacientes.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Papilomavírus Humano

Desde o final do século XX, em todo o mundo, a mudança no comportamento sexual das pessoas foi associada ao surgimento de novas doenças sexualmente transmissíveis (DST), como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), além de outras de importância até então secundária, como a condilomatose genital, conhecida desde a época greco-romana, em que a transmissão da doença era atribuída à relação homossexual, como verrugas genitais (SILVA *et al.*, 2008).

Em meados de 1935, Rous descreveu que as verrugas encontradas em coelhos apresentavam potencial para transformação maligna. A primeira observação de partículas de Papilomavírus em verrugas humanas foi relatada por Strauss *et al.* (1949), por meio da microscopia eletrônica. O potencial carcinogênico do HPV foi descoberto em pacientes com epidermodisplasia verruciforme, em 1950 (CRAWFORD; CRAWFORD, 1963).

O HPV é um vírus da Família Papillomaviridae que infecta as células epiteliais e causa lesões na pele ou mucosas com diversos agravos, dentre eles a verruga comum e a verruga genital ou condiloma. É um vírus icosaédrico não envelopado e com ácido nucléico constituído de DNA de dupla fita circular. O seu genoma é dividido em região reguladora (LCR), que contém a origem de replicação (ORI) e as regiões codificadoras que são denominadas de *open reading frame* (ORF) que significa fase de leitura aberta (ROSA; MEDEIROS; ROSA, 2009).

Este vírus possui 72 capsômeros, é pequeno, com tamanho de 55 nm de diâmetro e contém molécula circular única enrolada de DNA de fita dupla e proteína em sua estrutura, apresentando reação de atração pelo epitélio escamoso, causando infecções na mucosa e pele, acometendo também o epitélio cilíndrico (SOUZA; CATÃO, 2012). Foi caracterizado, em 1907, como agente causador das verrugas humanas, e isolado em 1933, onde somente em 1954 foi comprovado que a sua via de transmissão era sexual (ENCINA; ALVES, 2013).

A classificação do HPV é descrita segundo seu tropismo como cutaneotrópicos, os quais pertencem ao HPVs 1, 2, 5 e 8, que estão relacionados ao surgimento de verrugas e câncer de pele e mucosotrópicos, os quais pertencem os HPVs 6, 11, 42, 16, 18, 31 e 45, relacionados aos surgimentos de condilomas e câncer cervical. Além disso, eles podem ser classificados também quanto ao seu potencial de oncogenicidade em alto risco, os quais pertencem os HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 e baixo risco oncogênico os

quais pertencem os HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81, CP6 108. Os HPVs de alto risco oncogênico, quando associados a outros cofatores, apresentam relação com o desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais e o câncer invasivo de colo uterino, da vulva, da vagina e da região anal (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; FEBRASGO, 2016).

Dentre os mais de 100 subtipos de HPV já descritos, 20 tipos podem infectar o trato genital, e destes, 12 estão relacionados a lesões pré-oncogênicas e já referidos como HPVs de alto risco. Os principais subtipos associados ao câncer de colo uterino da população mundial são os HPVs dos tipos 16 e o 18, que também são tidos como responsáveis por até 91% dos casos de câncer de ânus (WHEELER *et al.*, 2012).

A oncogenicidade dos diversos subtipos de HPV está relacionada ao número de promotores regulando a expressão de oncogenes, onde subtipos de maior virulência possuem menos promotores que subtipos de menor virulência (BORSATTO; VIDAL; ROCHA, 2011).

### **3.2 Fatores de Risco para Infecção pelo HPV**

O principal fator de risco para a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer de colo uterino está relacionado à atividade sexual, em que a elevada quantidade de parceiros sexuais tem grande relevância em relação à vulnerabilidade, seguida de multigestações, do início precoce de vida sexual (sexarca) e de outras DST's (DUNNE *et al.*, 2015).

A infecção por HPV ocorre comumente durante o ato sexual, com o contato entre um tecido infectado e uma mucosa ou epitélio com micro lesões, facilitando a permeação do vírus até as células da camada basal dessa mucosa ou epitélio. O vírus, então, utiliza a célula hospedeira para se multiplicar (ZUR HAUSEN, 2002).

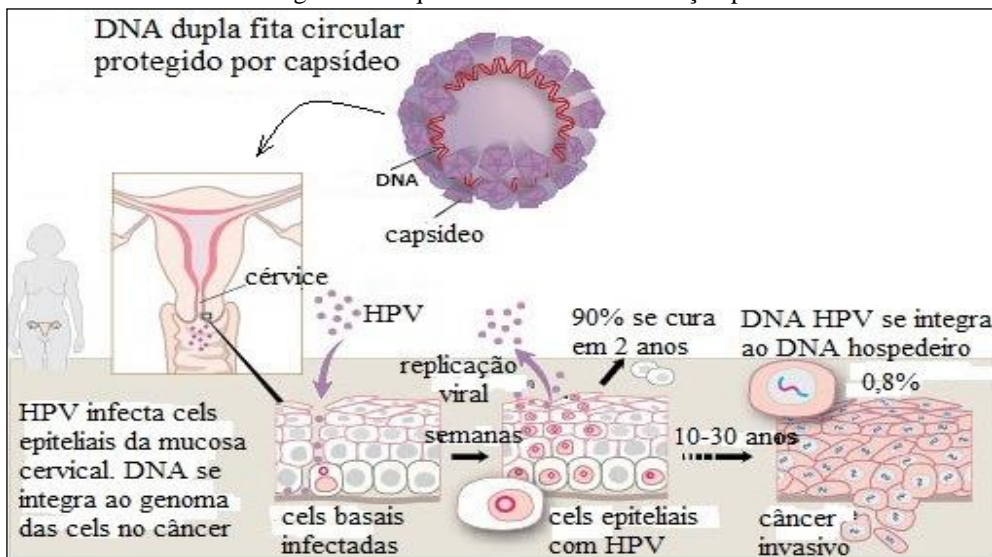
O HPV tem um amplo tropismo por epitélio de mucosa, podendo ocorrer com um único contato sexual, bastando apenas que o (a) parceiro (a) esteja infectado ou quando ocorrer o contato da pele ou mucosa com o epitélio infectado e fômites (TERAI *et al.*, 1999; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001; JUNG; BALSAMO; FORMIGA, 2005). O uso de preservativo é a principal recomendação para indivíduos que nunca tiveram contato com o HPV. É importante a adesão à vacina contra este vírus, preconizadas pelo Ministério da Saúde, principalmente pela alta potencialmente em meninas que não iniciaram a atividade sexual (INCT-HPV, 2013). Outros fatores de risco que estão relacionados à infecção pelo vírus são: a idade (ELEUTÉRIO *et al.*, 2011), o uso prolongado de anticoncepcionais orais e o tabagismo (BRASIL, 2010). Além disso, mulheres fumantes apresentam maior risco de desenvolvimento de câncer cervical por HPV, tanto para neoplasia

pré-invasiva quanto invasiva. O hábito de fumar tem sido relacionado com grande incidência e permanência da infecção pelo HPV (PINHEIRO *et al.*, 2013; JIN, 2016).

Após acontecer a infecção pelo HPV o organismo reage de várias maneiras, como, eliminar o vírus naturalmente sem que haja nenhuma sintomatologia em um período de aproximadamente 18 meses, ou o vírus pode permanecer no organismo sem nenhuma manifestação clínica durante anos. Contudo, em alguns portadores, o HPV pode persistir por muito tempo, ocasionando alterações genéticas, que podem resultar em verrugas genitais, lesões pré-malignas e vários tipos de cânceres, dentre eles o câncer de colo uterino, vagina, vulva, ânus, pênis e orofaringe (ROSENBLATT; LUCON; WROCLAWSKI, 2006).

Duas fases são sugeridas para replicação do DNA viral do HPV: a 1ª fase, de amplificação, com produção de alta carga viral nas camadas mais superficiais do epitélio infectado e a 2ª fase, de manutenção, com produção de carga viral menor na camada basal de células proliferativas. A fase de manutenção origina o período de latência da infecção por HPV no qual a carga viral mantém-se em níveis indetectáveis, que acontecem quando, após a relação sexual, o HPV infecta células epiteliais da mucosa cervical, 90% dos casos se curam em 2 anos, em 10% dos casos infectados pelo HPV oncogênico, em um período de 10 a 30 anos, ocorre o desenvolvimento do câncer invasivo em que o genoma do HPV integra-se ao genoma do hospedeiro (Figura 1) (PANG; THIERRY, 2012).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da infecção pelo HPV.



Fonte: Nobelprize, 2008.

### 3.3 Câncer do colo do útero

A infecção por tipos oncogênicos de HPV é o principal fator de risco associado ao câncer cervical, suas lesões precursoras e lesões intra-epiteliais escamosas de baixo e alto grau. Este vírus induz a instabilidade genômica, alterações no número de cromossomos, denominadas aneuploidias, bem como alterações estruturais cromossômicas e alterações gênicas no epitélio que estão associadas ao início do processo maligno (MARCO, 2013).

O câncer de colo de útero é considerado um problema de saúde pública em que os dados estatísticos evidenciam o aumento da incidência do contágio pelo vírus HPV e dos casos diagnosticados deste tipo de câncer, consequência, dentre outros fatores, do início da vida sexual cada vez mais precoce, do grande número de parceiros sexuais e pela prática do sexo desprotegido (ALVES *et al.*, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

O câncer do colo do útero apresenta aproximadamente 530 mil novos casos anuais no mundo é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres e a quarta causa mais frequente de morte, sendo responsável por 265 mil óbitos por ano. No Brasil, estimam-se 16.370 casos novos de câncer do colo do útero para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. De acordo com as regiões, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (25,62/100 mil). Nas Regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil) ocupa a segunda posição mais frequente; nas Regiões Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil), ocupa a quarta posição (INCA, 2018).

O crescimento deste câncer é lento e precedido por lesões intra-epiteliais caracterizadas por uma desorganização do epitélio malpighiano. Em sua evolução, passa por uma fase pré-invasiva, chamada de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), classificada histologicamente em graus I, II e III, que refletem o seu comportamento biológico. A NIC I, displasia leve, caracterizada por atipias celulares localizadas no terço inferior do epitélio escamoso; NIC II, displasia moderada, as atipias ocupam os dois terços inferiores desse epitélio; e NIC III, displasia acentuada/carcinoma in situ, em que as células atípicas comprometem mais de dois terços ou toda a espessura do epitélio (WALBOOMERS *et al.*, 2009; INCA, 2006). Para uma descrição completa das categorias diagnósticas atualmente utilizadas no Brasil, recomenda-se a consulta à Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas (INCA, 2006), descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Nomenclatura histopatológica e citopatológica utilizada no diagnóstico das lesões cervicais escamosas.

Classificação citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação de histológica da OMS (1952)	Classificação de histológica de Richart (1967)	Classificação Citológica Brasileira (2006)
Classe I	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas
-	-	-	Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC I	LSIL
	Displasia moderada e acentuada	NIC II e NIC III	HSIL
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	HSIL
			AIS
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

Fonte: Lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão Intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL); Adenocarcinoma *in situ* (AIS). INCA (2006).

### 3.4 Métodos atuais de diagnóstico do HPV

Para evitar as consequências causadas pelo vírus, é preciso realizar o diagnóstico da infecção, que é feito por meio de aspectos relevantes como o histórico, exame físico e exames complementares.

O diagnóstico precoce do vírus é a melhor forma para possibilitar o tratamento adequado. O HPV, por ser um vírus com alto potencial infeccioso carcinogênico, é objeto de diversos estudos que visam formas de detecção e identificação dos subtipos virais cada vez mais sensíveis e precisos.

Dentre os testes diagnósticos mais comuns existentes estão: os morfológicos, os testes sorológicos e os moleculares (CARMO; FIORINI, 2007). Os métodos morfológicos, considerados indiretos, detectam alterações citopatológicas e histopatológicas decorrentes da infecção pelo HPV, não detectando a presença do vírus, mas sim as alterações que o mesmo pode provocar no tecido infectado (RAMOS, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2013). A principal técnica de rotina de diagnóstico é o teste citopatológico Papanicolaou. Esta técnica não detecta o vírus, contudo mostra as alterações causadas pelo mesmo nas células da ectocérvice e da endocérvice da paciente (BRASIL, 2010). Os métodos moleculares, considerados métodos diretos, detectam a presença do genoma do HPV ou seus transcritos na amostra clínica. A biópsia de lesões permite o estudo anatomopatológico, mas não tem a capacidade de classificar e identificar o HPV, como ocorre pelo diagnóstico realizado pelas técnicas de biologia molecular (LETO *et al.*, 2011).

### **3.4.1 Testes Sorológicos**

Os testes sorológicos ou imunoenaios são técnicas utilizadas para detecção e qualificação de antígenos e anticorpos, ou qualquer outra substância capaz de desempenhar tal papel no ensaio, tais como drogas, hormônios, ácidos nucleicos, entre outros. Estes testes são pouco utilizados em rotina clínica devido a sua baixa especificidade e sensibilidade já que a resposta imunológica humoral contra o HPV é pequena e inespecífica, dificultando a detecção pela dosagem de anticorpos produzidos contra o antígeno viral (COURSAGET, 2003).

A dificuldade do diagnóstico sorológico está relacionada principalmente às reações cruzadas entre os diferentes tipos de HPV, a diversidade de locais em que o HPV pode se instalar, e a fraca resposta das células imunocompetentes das camadas superficiais do epitélio, onde ocorre a expressão viral (COURSAGET, 2003; RIBEIRO, 2009).

### **3.4.2 Testes Morfológicos**

O método morfológico baseia-se nas alterações morfológicas do tecido, macroscopicamente e microscopicamente por meio da análise citológica. A análise macroscópica consiste na realização do exame do colo uterino em que se observa a olho nu a presença ou não de ectopias, hiperemias e de lesões verrucosas que são indicativas de HPV (STOLER; SCHIFFMAN, 2001).

A análise citológica é realizada por meio do exame citopatológico de Papanicolaou. A introdução deste exame como teste de rastreamento há cerca de 60 anos resultou em uma redução considerável, cerca de 50% a 70%, dos índices de mortalidade por câncer cervical no mundo (MARTINS, 2005). O exame de Papanicolaou é realizado no material coletado da ectocérvice e endocérvice uterina disposto sobre lâmina e corado para análise. Esta consiste na busca de alterações morfológicas como a presença de coilócitos, principal característica do HPV, em que o núcleo é aumentado e a região perinuclear é ampla e clara, ou disqueratócitos, processo de diferenciação e queratinização do epitélio normal, sugerindo infecção por HPV (WOLSCHICK *et al.*, 2007).

A realização deste exame permite diagnosticar modificações do colo uterino a partir de células descamadas do epitélio, usualmente chamado de exame preventivo. Trata-se do esfregaço ou raspado de células esfoliadas do epitélio cervical e vaginal, que possibilita a evidenciação de lesões pré-neoplásicas e de doenças em estágios iniciais. Recomenda-se que deve ser realizado anualmente, e após o segundo exame com resultado negativo, o mesmo

deverá ser repetido a cada três anos. Contudo, obtendo o resultado positivo, a paciente deverá repetir os mesmos seis meses após o diagnóstico. Outras alterações, o médico decidirá a melhor conduta (BRASIL, 2010).

O teste citopatológico do Papanicolaou é preconizado pelo MS para detecção de lesões causadas pela presença do HPV. Trata-se de um exame rápido, de baixo custo e efetivo na detecção precoce de lesões. No entanto, esta técnica de realização é vulnerável a erros de coleta e de preparação da lâmina, além de haver subjetividade na interpretação dos resultados e ser incapaz de identificar o tipo de vírus presente na amostra (MARTINS, 2005).

Além disso, em muitos casos, este teste apresenta baixa sensibilidade e especificidade. Assim, novas técnicas de diagnóstico, tais como a análise molecular pela PCR, o teste de MN e a técnica de FT-IR tem sido pesquisadas com o objetivo de auxiliar a análise citológica e melhorar a qualidade do rastreamento do câncer cervical.

### **3.4.3 Testes Moleculares**

Considerando o fato dos métodos morfológicos e citopatológicos empregados atualmente apresentarem algumas desvantagens na detecção da infecção do vírus, tais como o elevado número de casos falso negativos, enfatiza-se que é de grande importância o estudo e o emprego de técnicas alternativas de diagnóstico.

Os testes moleculares são altamente específicos e sensíveis para a detecção do HPV. Estes são os únicos testes capazes de identificar o vírus mesmo em seu estado latente, ou seja, quando o vírus ainda não foi incorporado ao genoma do hospedeiro gerando as alterações citológicas. Os principais testes moleculares são: captura híbrida, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e PCR (FARSHADPOUR *et al.*, 2011; RITARI *et al.*, 2012).

A captura híbrida é o método de amplificação de sinal não radioativo em que sondas de RNA marcadas são utilizadas para hibridização do DNA alvo do HPV em solução. Este método detecta o DNA viral presente em materiais cérvico-vaginais, utilizando uma microplaca, por meio de sondas de RNA capazes de reconhecer as sequências do DNA de HPV de baixo e de alto risco. Para a realização desta técnica, inicialmente é realizada a desnaturação do DNA da amostra a ser analisada, que é em seguida hibridizada com múltiplas sondas de RNA em um tubo contendo uma solução tampão. Posteriormente os híbridos imobilizados são expostos a um anticorpo conjugado à fosfatase alcalina e revelados por quimiluminescência. O nível de quantidade de iluminescência pode ser então quantificado para análise da carga viral da paciente (WOLSCHICK *et al.*, 2007).

A técnica de FISH é um método histoquímico em que se pode visualizar, identificar, enumerar e localizar simultaneamente micro-organismos *in situ*, não havendo a necessidade de cultivos celulares. As sequências de ácidos nucléicos são examinadas dentro das células não alterando a integridade de seus compartimentos ou morfologia, por meio da visualização direta de cortes histológicos, utilizando-se microscópios ópticos epifluorescentes. Esta técnica baseia-se na detecção de sequências específicas de ácidos nucléicos em cromossomos morfológicamente preservados, células e tecidos, em que, em condições bem definidas há a formação duplex (hibridação), de um fragmento de ácido nucléico de fita simples modificado com sua sequência complementar (sequência alvo) em um espécime biológico fixado, como a sequência-alvo do DNA viral, que pode ser visualizada por meio de marcadores fluorescentes (CARMO; FIORINI, 2007; AMANN; FUCHS, 2008).

A PCR é um método de amplificação de sequências específicas de DNA alvo milhões de vezes. Existe a necessidade de que a sequência alvo de nucleotídeos seja conhecida para que se consiga desenhar iniciadores específicos à sequência que se deseja amplificar, possibilitando a amplificação da sequência desejada, por exemplo, com o desenho de iniciadores em regiões conservadas ou comuns do genoma do HPV, é possível a detecção de um painel de diferentes tipos de HPV em uma única reação (GIULIETTI *et al.*, 2001). O método de PCR que utiliza os iniciadores MY09-MY11 e GP05-GP06 para amplificar a região do gene *L1* do genoma viral, são os mais frequentemente utilizados para detecção de HPV em estudos clínicos e histológicos (COSER *et al.*, 2011). Estes iniciadores são eficazes para a amplificação em um largo espectro de genótipos de HPV em células obtidas a partir de esfregaços cervicais (SARTORI *et al.*, 2018).

A PCR, quando comparada com outras técnicas moleculares, é a técnica mais sensível e disponível atualmente, pois possibilita detectar quantidades mínimas de DNA viral na amostra em estudo. Contudo, quando comparada aos testes sorológicos e morfológicos apresenta desvantagens, como o custo mais elevado, sendo este um dos motivos de muitos laboratórios não a tornarem um teste padrão na rotina clínica (WOLSCHICK, 2007).

### **3.5 Tratamento do Paciente Infectado pelo HPV**

O tratamento do paciente infectado pelo HPV e já com a formação da lesão tem o objetivo de diminuir ou curar as lesões causadas pela infecção. A forma de tratamento dependerá de vários fatores, tais como, a idade da paciente, o tipo, a extensão e a localização das lesões (INCA, 2016).

O objetivo inicial do tratamento é eliminar os sintomas, amenizar a carga psicológica decorrente do estigma social e melhorar o aspecto estético do paciente, no que se refere aos condilomas, que com a eliminação desse tipo de lesão tenta-se diminuir a transmissibilidade, que parece ser mais significativa na presença dessas verrugas. Porém, até o momento, não existe um tratamento único e ideal para todos os pacientes, e tão pouco uma terapêutica capaz de erradicar o HPV, assim, o tratamento individualizado parece ser a conduta mais adequada (CARVALHO, 2010).

As principais formas de tratamento utilizadas em rotina são o uso de ácido tricloroacético, que é indicado em 50 a 90% dos casos de verrugas externas para ambos os sexos, devendo ser aplicado uma vez por semana até o desaparecimento da lesão; a fluoracila em creme, aplicada na lesão uma a duas vezes por semana e a podofilotoxina a 0,5% em solução ou 0,15% em creme, com aplicação que deve ser feita duas vezes ao dia durante três dias consecutivos (PASSOS *et al.*, 2008; TANER *et al.*, 2007).

Outra variedade de tratamento é a imunoterapia, em que se usa o interferon, sendo indicado para os casos recorrentes. Também pode-se citar o tratamento cirúrgico, tais como a exérese cirúrgica, eletrocoagulação, crioterapia e a laserterapia. Vale salientar que mesmo o tratamento sendo realizado por qualquer uma das formas citadas, as verrugas podem reincidir várias vezes e esses procedimentos podem ser dolorosos, visto que o agente causador é um vírus (EDWARDS *et al.*, 1998).

Atualmente, novas opções de tratamento como os cremes podofilotoxina e imiquimode foram incorporadas à lista de substâncias da rede pública pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para os pacientes com sinais da infecção por HPV não oncogênico, como verrugas nos genitais e ânus (CONASS, 2019).

### **3.6 Teste de Micronúcleo**

O MN consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma ovalada ou redonda, localizado perto do núcleo e constituído de fragmentos de cromátide ou, cromossomos acêntricos ou aberrantes, que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose. A sua formação resulta da extrusão de cromossomos inteiros ou fragmentos da molécula de DNA, dias ou semanas após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal estão em divisão. O MN é também considerado um marcador morfológico de lesão celular com potencial genotóxico de desenvolvimento neoplásico (SETÚBAL *et al.*, 2005; NERSESYAN, 2007), sendo conhecidos como corpos Howell-Jolly.

Foram identificados pela primeira vez no final do século XIX, em precursores de células vermelhas por William Howell e Justin Jolly e descritos como restos de núcleos de células vermelhas do sangue que circulavam em órgãos com características patológicas (SETÚBAL *et al.*, 2005; NERSESYAN, 2007; SEARS; UDDEN, 2011).

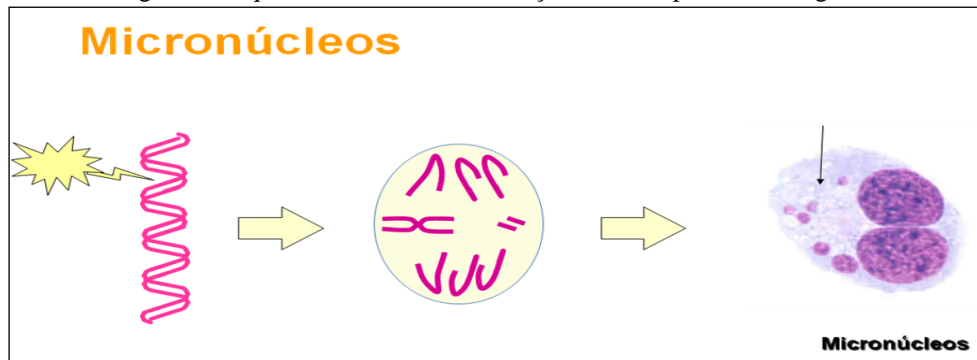
A importância do MN foi avaliada em meados do século XX, em pesquisas que evidenciaram a presença destes dentro da medula óssea durante diferentes estadiamentos patológicos. Não muito tempo depois os mesmos foram descritos em outras células, principalmente linfócitos. A pontuação de MN em células binucleadas bloqueada-citocinese após o tratamento com citocalasina-B foi postulada como um procedimento de escolha para a quantificação de MN em linfócitos (FENECH; MORLEY, 1985).

Estudos demonstram que existem pessoas geneticamente sensíveis a agentes genotóxicos como drogas, radiações e vírus, o que pode resultar em alterações no DNA genômico, ocasionando os mais diversos tipos de alterações celulares, tais como a micronucleação. O aparecimento do MN pode ocorrer pela adaptação que o organismo realiza em resposta a um dano, provocado por agentes internos ou externos, para que a célula mantenha suas funções (MARTINS; BOSCHINI FILHO, 2003; CARRARD *et al.*, 2007).

Evidências relacionaram a frequência de MN às exposições tóxicas ambientais e ocupacionais, estilo de vida, perfil genético, câncer e ocorrência de doenças (FENECH, 2007; HOLLAND *et al.*, 2008). A formação de um MN é um indicador de mutação cromossômica, uma alteração genética que resulta em instabilidade genômica, sendo uma alteração comum em muitas neoplasias, podendo ser considerado um marcador morfológico de células lesionadas de desenvolvimento neoplásico com potencial genotóxico (REIS *et al.*, 2004; NERSESYAN, 2007; FLORES; YAMAGUCHI, 2008; SHIMIZU, 2011).

A aplicação do teste MN foi realizada pela primeira vez em células esfoliadas da cavidade oral. Alguns estudos comprovaram a eficácia do teste *in vivo* como indicador de danos citogenéticos em células do epitélio de revestimento oral, brônquico e esofágico (STICH; ROSIN, 1983; LIPPMAN; PETERS; WARGOVICH, 1990). A vantagem deste teste é a capacidade de verificar, o estado de uma mucosa, *in vivo*, que é simultaneamente exposta à carcinógenos, co-carcinógenos e antioxidantes, o que dificilmente pode ser reproduzido *in vitro*. Outra vantagem é a habilidade de medir de forma objetiva e apurada a frequência de defeitos no DNA. Ademais, o MN aparece após o dano, antes de qualquer alteração pré-maligna clínica ou até mesmo histológica (SETÚBAL *et al.*, 2005).

Figura 2: Esquema ilustrativo da formação do MN após dano citogenético.



Fonte: Adaptado Fenech (2000).

A utilização do teste de MN foi feita em mamíferos *in vivo*, para detectar substâncias mutagênicas que interferem na formação do fuso mitótico ou que quebram os cromossomos, causando alteração na distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular, já que tem a propriedade de detectar alterações cromossômicas durante a divisão celular, provocadas por substâncias mutagênicas. É considerado padrão ouro para avaliação citogenética de lesões que ocorrem no DNA e pode ser usado no monitoramento de indivíduos que são expostos frequentemente a fatores de risco, representando um indicativo para que ocorra mudança de hábitos para as pessoas que ainda não apresentaram sinais de alterações ou danos celulares (ANDRADE *et al.*, 2005). No desenvolvimento da Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC), inúmeras anormalidades cromossômicas, tais como perdas ou ganhos cromossômicos, bem como alterações moleculares em genes específicos ocorrem na célula, levando a uma crescente instabilidade genômica no tecido (CAMPOS *et al.*, 2008).

O uso da técnica de MN, em esfregaços de células do colo uterino, na presença de processos inflamatórios, displásicos, e em condições normais também foi realizada por Gattás *et al.* (1992), que verificaram um aumento na frequência de MN em células displásicas moderadas e severas em relação às displásicas leves e processos inflamatórios, ou seja, a contagem de MN foi superior à observada no material citológico normal.

Posteriormente, vários estudos demonstraram que a avaliação da frequência de MN em células cervicais pode ser um critério adicional para estabelecer o risco de câncer cervical, pois a detecção do aumento da frequência de MN pode indicar a presença de lesão intraepitelial.

Vilanova *et al* (2012) utilizaram este teste para avaliar a presença de anomalias nucleares em tecidos tumorais que são alvos específicos de agentes carcinogênicos e genotóxicos e constataram uma maior quantidade de MN nesses tecidos. O resultado deste estudo indicou que é possível utilizar o teste como um método prático, de baixo custo e rápido

para a detecção de grupos de risco e prevenção do câncer uterino. Shi *et al.* (2015) revelaram que a realização desta técnica pode servir como um biomarcador eficaz para o rastreamento do câncer do colo do útero e revelaram que a combinação de MN com a detecção do HPV pode ser útil como um mecanismo eficaz para rastrear lesões cervicais pré-cancerosas na maioria dos países em desenvolvimento.

O estudo de Silva *et al.* (2017), realizado *in vitro* analisou a frequência de MN em amostras de pacientes diagnosticadas com câncer de colo uterino com indicação a radioterapia. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram o aumento na frequência de MN nos tecidos destas pacientes, porém, sugerem a realização de estudos com um maior número de voluntárias para confirmar esta afirmação.

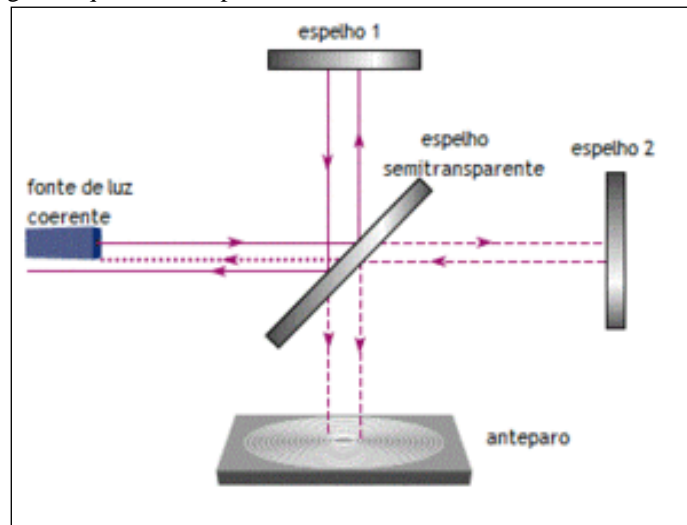
Considerando estes aspectos é importante a avaliação da possível aplicabilidade do teste de MN no diagnóstico da infecção pelo HPV e lesões oriundas da infecção viral, tal como o câncer uterino, no sentido de proporcionar a realização de ações na prevenção do câncer do colo uterino e conseqüentemente na melhora do prognóstico da paciente.

### **3.7 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier**

A técnica de FT-IR é promissora e referenciada como ferramenta de identificação de compostos inorgânicos e orgânicos puros, pois permite identificar por meio das deformações rotacionais e vibracionais das ligações químicas, a interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria (SKOOG *et al.*, 2010).

De forma geral e resumida, um espectrômetro de FT-IR é composto da fonte de radiação eletromagnética na região do infravermelho, interferômetro, porta amostra, detector, amplificador de sinal, conversor de sinal analógico para digital e o computador. O princípio físico deste equipamento baseia-se no interferômetro de Michelson, quando um feixe de radiação atinge um espelho semitransparente, dá origem a dois feixes perpendiculares, como exemplificado na Figura 3. Estes feixes são refletidos, pelos espelhos 1 e 2, e ao se combinarem produzem interferências construtivas ou destrutivas, em função do deslocamento de um dos espelhos. Quando este feixe é transmitido através da amostra, o espectro é calculado pela transformada de Fourier (STUART, 2004; YOUNG; FREEDMAN, 2009).

Figura 3: Figura esquemática representativa de um Interferômetro de Michelson



Fonte: Young e Freedman, (2009); Halliday e Jearl (2009).

Esta técnica foi bastante utilizada por profissionais na área da química orgânica, principalmente nos produtos de sínteses, depois os pesquisadores utilizaram o potencial da técnica para a área de Engenharia Biomédica e Saúde. Buscando-se relação de estudos com o tema desta tese, destaca-se o de Cohenford e Rigas (1998), que por meio de espectros de FT-IR de células esfoliadas de mulheres mostrou que alterações espectrais poderiam ser vinculadas a citologia normal ou com displasia ou que apresentavam câncer cervical.

Posteriormente, o estudo de Schubert *et al.* (2010) realizado com células classificadas como normais, mas com mudanças espectrais, sugeriu que um dos fatores associados a estas alterações espectrais poderia ser a presença do vírus HPV.

Kelly *et al.* (2010), também reforçou que diferenças espectrais em amostras de mulheres entre 20 e 30 anos, do mesmo grau citológico e tipo de HPV, poderiam ser explicadas pela infecção persistente de HPV. Os espectros de FT-IR também evidenciaram alterações espectrais correlacionadas com o câncer do colo uterino e no diagnóstico precoce para identificação de pacientes com grande risco de progredir para lesões cervicais de alto grau.

Lyng *et al.* (2015) descreveram que o FT-IR pode ser tão eficaz quanto a histopatologia, considerada atualmente como padrão-ouro, com grande capacidade para que essa técnica seja utilizada como opção ou auxílio aos métodos atuais de triagem de citologia. Entre as vantagens destacadas estão o aumento de precisão e a chance de detecção precoce do câncer do colo uterino para um melhor prognóstico à portadora do deste câncer.

O primeiro estudo que demonstrou a técnica de FT-IR como importante para auxiliar na detecção de alterações causadas pelo HPV foi realizado por Rymsza *et al.* (2018). Estudos anteriores aplicaram o FT-IR em pesquisa com cultura e evidenciaram modos vibracionais

dos compostos principais, de células normais e tumorais. A tabela 2 reúne os principais autores e avanços expressos em suas pesquisas.

Tabela 2: Estudos sobre FT-IR, em relação ao Autor, Ano e principais Resultados.

<b>Autor/Ano</b>	<b>Principais Resultados</b>
MORRIS <i>et al.</i> , 1995	O estudo mostrou completa concordância entre os achados espectrais e o resultado histopatológico no caso de NIC III, em que o HPV 18 estava presente. As diferenças espectrais reveladas pela FT-IR caracterizam anormalidades moleculares nas células cervicais durante a progressão para o câncer podendo ter potencial para auxiliar na tomada de decisão clínica.
OSTROWSKA <i>et al.</i> , 2010	A técnica espectroscópica vibracional para a triagem cervical não só pode distinguir as células cervicais com base no conteúdo bioquímico, mas também pode elucidar o efeito do HPV nas células.
OSTROWSKA <i>et al.</i> , 2011	Espectros de FT-IR revelaram diferenças no conteúdo de ácido nucléico, lipídeo e proteína entre as linhas celulares para o câncer cervical com o número de cópias do HPV, quando as intensidades de pico exibiram tendência crescente nos níveis de ácidos nucléicos e tendência decrescente nos níveis de lipídeos com o número crescente de cópias de HPV.
MFOUMOU <i>et al.</i> , 2012	A espectroscopia FT-IR pode ser usada para identificar modos vibracionais de alguns compostos principais, em tecidos normais e tumorais das células, como a identificação de vários componentes biomoleculares da célula, como também monitorar as mudanças nas características das composições moleculares e estruturas que acompanham as alterações resultantes de infecções virais ou transformações do estado normal da célula para o maligno.
RYMSZA <i>et al.</i> , 2018	O método ATR-FT-IR provou ser bem sucedido e pode ser um método promissor no futuro para auxiliar na detecção de HPV

Fonte: o autor

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Casuística**

Trata-se de um estudo experimental, ou seja, quando se determina um objeto de estudo e selecionam-se as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definem-se as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (GIL, 2008).

Este estudo seguiu as normas de Biossegurança e foi realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário UNINOVAFAPI, com protocolo nº 2.434.076 (ANEXO 1), atendendo à Resolução CNS/MS 466/2012. A coleta das amostras foi realizada nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) da Estratégia Saúde da Família (ESF), após terem sido especificadas as informações sobre a pesquisa a cada participante e esta ter manifestado espontaneamente o aceite em participar, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - ANEXO 2) e da autorização da instituição coparticipante (ANEXO 3).

A participação, de caráter estritamente voluntário, deu-se mediante o consentimento livre e esclarecido das mulheres, tendo sido assegurado a essas, o sigilo dos dados obtidos, garantido o anonimato e as participantes foram identificadas como número ordinal.

### **4.2 Pacientes e coleta das amostras**

Um total de 50 amostras cervicais foi obtido de pacientes que realizam exame ginecológico de rotina na UBS da Estratégia Saúde da Família (ESF) de Teresina – Piauí, no período de maio a setembro de 2018.

Participaram do estudo mulheres que atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos no estudo ao quais foram: pacientes com idade entre 18 e 65 anos de idade, cadastradas no SUS, mulheres com vida sexual ativa, mulheres com suspeita clínica de HPV e/ou com lesão cervical; bem como pacientes sem nenhum problema ginecológico, com hábitos de tabagismo (aqueles que já fumaram 100 ou mais cigarros durante a vida e que continuavam fumando – INCA, 2001) e alcoolismo (segundo OMS (2003), acima de 30 gramas de álcool/dia). Os critérios de exclusão para coleta das amostras foram: mulheres no período menstrual, mulheres com neoplasia uterina maligna pré-existente e doenças infectocontagiosas; pacientes

portadoras de outras Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST's) já confirmadas, tais como o HIV e pacientes grávidas.

Inicialmente foi aplicado um questionário (versão em português adaptado de Carrano e Natarajam, 1988). (APÊNDICE 1) às pacientes para coleta de dados sociodemográficos e realização de um levantamento estatístico em relação aos principais fatores que podem ocasionar a infecção por HPV. Os dados clínicos das pacientes foram coletados observando-se seus prontuários na Unidade Básica de Saúde (UBS), no momento da aplicação do questionário.

A coleta do material para citologia oncótica foi realizada após solicitação na consulta médica e/ou de enfermagem. Primeiramente foi coletado material da endocérvice e armazenado em tubos de coleta e para análise de PCR (Figura 4). Para a coleta das amostras de citologia oncótica utilizou-se a espátula de Ayre e escova endocervical *cytobrush* (Figura 5), para confecção de lâmina para estudo citopatológico.

Figura 4: Fotografia do material utilizado para coleta de fluido para PCR



Legenda: escova *cytobrush*; tubo de coleta para análise de PCR.  
Fonte: Rimsza *et al.* (2018).

Figura 5: Fotografia do material utilizado para coleta de citologia oncótica



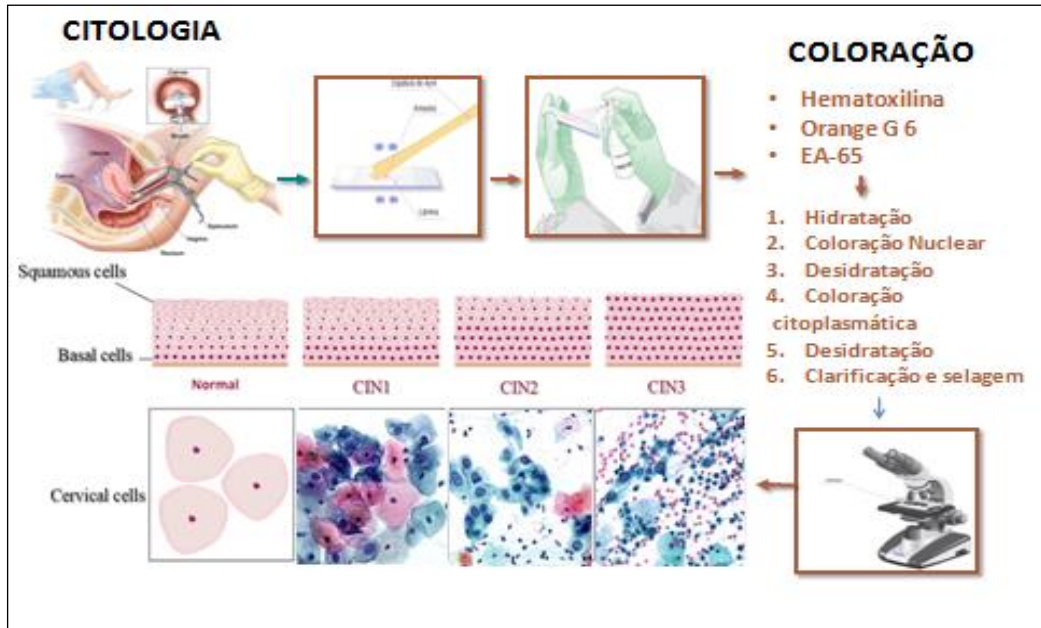
Legenda: espelho vaginal; lâmina para citologia; escova *cytobrush*;  
espátula de Ayre; luvas de procedimento.  
Fonte: O cuidar em enfermagem, 2019.

Quatro *scrapes* cervicais foram realizados em cada paciente. O primeiro *scrape* foi utilizado para realização da análise molecular (PCR), em que o material foi acondicionado em uma solução tampão, o kit de coleta *Universal Collection Médium – Digen* (Figura 4), e posteriormente armazenado em temperatura  $-20^{\circ}$  C. O segundo *scrape* representativo do raspado ectocervical (espátula de Ayre) e o terceiro *scrape* representativo do escovado endocervical (escova *cytobrush*) foram utilizados para a confecção das lâminas do esfregaço citológico pela técnica de Papanicolaou. O terceiro *scrape* do escovado endocervical, após a confecção da lâmina para a citologia oncótica, também foi acondicionado em um tubo Neogene, sem qualquer solução e armazenado à temperatura de  $-20^{\circ}$ C, para a posterior análise do FT-IR. O quarto *scrape*, representativo do raspado da ectocérvice com a escova *cytobrush*, foi acondicionado em um tubo Neogene, com solução alcoólica a 100% e armazenado à temperatura de  $-20^{\circ}$ C, para realização do teste de MN, realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro Universitário Santo Agostinho, sendo o Prof. Dr. Nelson Jorge o responsável. O material destinado à análise molecular e espectroscopia FT-IR foi analisado no Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório Central Analítica, respectivamente, pertencentes ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

### **4.3 Citologia Oncótica Papanicolaou**

Após a coleta das amostras para citologia oncótica, as mesmas foram encaminhadas para o Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia Raul Bacelar, localizado em Teresina, Piauí (Brasil), para realização da análise microscópica das lâminas e dois patologistas, que cumprem escala no laboratório mencionado realizaram estas análises para evitar resultados falsos negativos (Figura 6).

Figura 6: Esquema descritivo da coleta e preparo de lâmina para citologia oncótica Papanicolaou.



Fonte: o autor

#### 4.4 Análise Molecular pela PCR

Com o material coletado da endocérvice de cada paciente e armazenado em tubos de coleta foi realizada a análise molecular para detecção do HPV. O protocolo de purificação de ácidos nucléicos virais *QIAamp® Virus Spin kit* (Qiagen) foi usado para a extração de DNA de amostras ectocervicais e endocervicais para detecção molecular do HPV. A eletroforese em gel de agarose (2,0%) foi utilizada para avaliar a qualidade do DNA e os perfis de integridade. A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas por espectroscopia de absorção ultravioleta em NanoDrop (*ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade*), que mede sua absorbância a 260 nm. A razão obtida a partir da quantificação de 260/280 de DNA foi utilizada para avaliar a pureza das amostras em relação à contaminação por proteínas, enquanto a razão 260/230 foi utilizada para avaliar a pureza das amostras em relação à contaminação com reagentes. Os valores utilizados como referência foram de 1,8 a 2,0 e 1,7 a 2,2 respectivamente.

Todas as amostras foram submetidas à PCR do gene *L1*, que é a região mais conservada no genoma dos diferentes tipos de HPV utilizando-se os iniciadores MY09 (5'-CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC-3') e MY11 (5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') (Tabela 3).

Tabela 3: Tamanho das sequências amplificadas (*amplicons*) para os iniciadores MY09/MY11 de diferentes tipos de HPV.

<b>Tipos de HPV</b>	<b>Tamanho dos Amplicons iniciadores MY09/11 (em pares de bases)</b>
6b	449
11	448
13	-
16	452
18	455
31	-
32	449
33	449
34	458
35	452
39	455
40	455
42	449
45	455
51	452
52	449
53	448
56	449
58	449
61	455
66	449

Fonte: Peter *et al.*, (1990); Gravitt *et al.*, (2000).

Cada sistema de amplificação de DNA foi realizado com um volume final de 25 µl, consistindo em KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, trifosfato de desoxinucleotídeo 200 mM (dNTP), 50 pmol de cada primer e 2U de Easy Taq DNA Polymerase, em tubos de 200µl que foram transferidos para o termociclador (termociclador Veriti™). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 35 ciclos consistindo cada ciclo de uma desnaturação de 45 segundos a 94 °C, anelamento de 45s a 58 °C e extensão de 45s a 72 °C, seguidos por cinco minutos a 72 °C.

Para confirmar e validar os resultados obtidos as reações de PCR foram realizadas, com seis amostras de controle positivo (CP) juntamente com as 50 amostras do estudo. As amostras CP foram constituídas por DNA extraído do líquido cervical de pacientes que foram previamente analisadas pela PCR em um estudo prévio do grupo com os iniciadores MY09/MY11 (RYMSZA *et al.*, 2018) e deram resultados positivos quanto à amplificação do gene *L1* do HPV.

Adicionalmente, dois controles internos da PCR foram utilizados em cada reação: um controle negativo (CN1), que consiste em um tubo com ausência de DNA para controle de contaminação da reação e outro controle negativo (CN2) composto por DNA humano extraído

de uma pessoa sem evidência de infecção pelo HPV, confirmado pelas análises citológicas e testes clínicos realizados previamente.

Para analisar os produtos amplificados por PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% em Tris ácido bórico EDTA (TBE) 1X corados com brometo de etídio (3 µg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta usando um marcador de peso molecular de 100 pb.

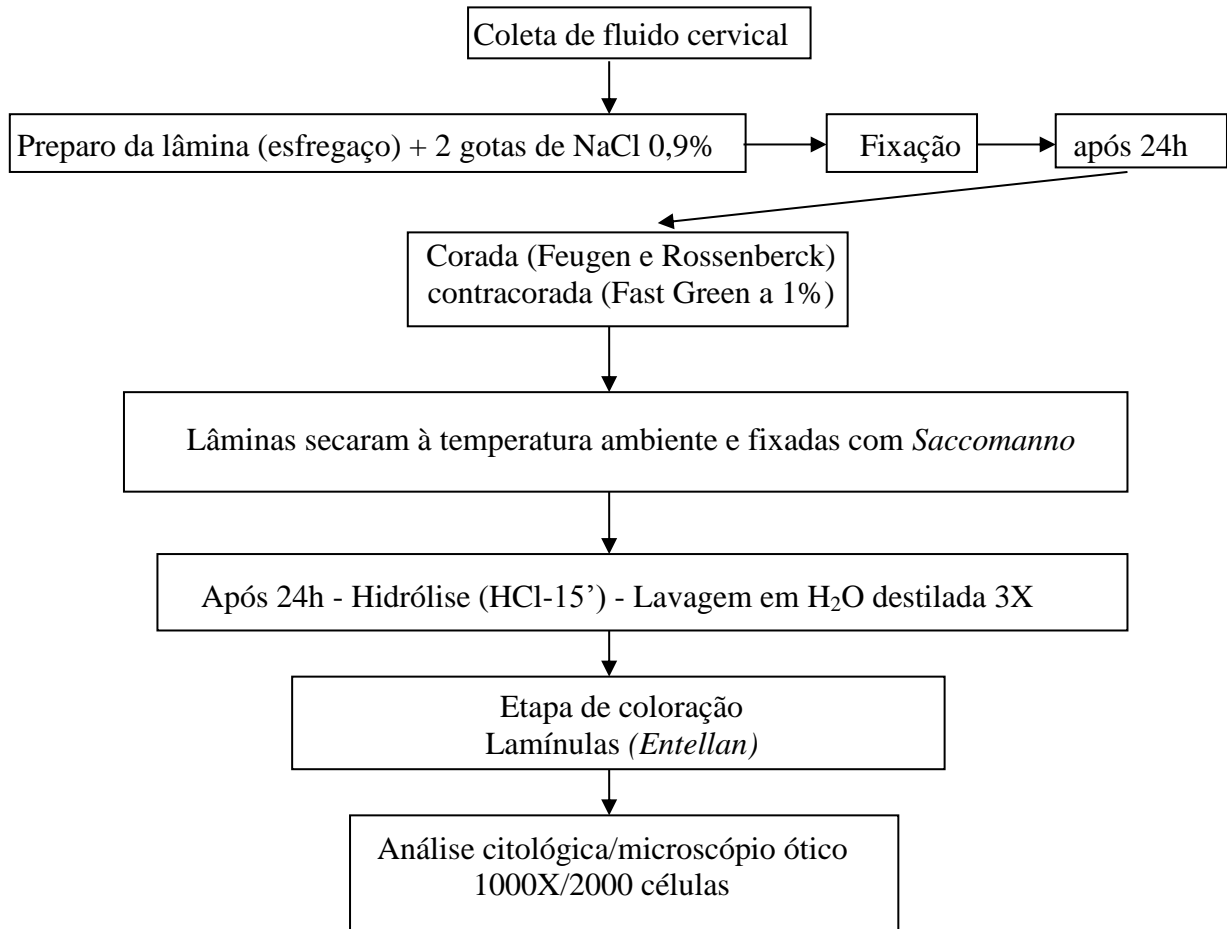
#### **4.5 Teste de Micronúcleo**

Com o material coletado da cérvix uterina foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, a qual foram adicionadas duas gotas de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%). A fixação do material foi feita em solução de metanol/ácido acético (3:1) e após 24h, as preparações foram coradas pelo método de Feulgen e Rossenbeck (1924) e contra coradas com *Fast Green* a 1%, em álcool absoluto, por 1 min.

As lâminas com o material coletado secaram à temperatura ambiente, e foram fixadas com fixador *Saccomanno*, em solução de metanol/ácido acético na concentração de 3/1. Transcorridas 24 horas foi realizada a hidrólise em solução de ácido clorídrico (5N), por 15 minutos, seguindo-se lavagem em água destilada por três vezes. A coloração foi feita utilizando-se o reativo de *Shiff* e a contra-coloração, com *Fast Green* a 1%. As lamínulas foram montadas com *Entellan*®. A análise citológica foi realizada sob microscopia óptica (1000x) e em teste cego em relação aos dados obtidos no questionário. Foram analisadas 2.000 células por paciente (1000 por lâmina) (Figura 7).

Os critérios de identificação de MN adotados foram os descritos por Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992), considerando MN, estruturas arredondadas e distintamente separadas do núcleo, com limites bem definidos, medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo e apresentado em relação a este, estrutura cromatínica e coloração similar, além de serem visualizados no mesmo plano.

Figura 7: Fluxograma descritivo das etapas do preparo de lâminas para análise do MN.



Fonte: o autor

#### 4.6 Espectroscopia FT-IR

Para a análise de espectroscopia FT-IR, as amostras foram divididas com base no resultado da análise de PCR em dois grupos, um grupo constituído por amostras positivas para o HPV (sete amostras mais as seis amostras CP analisadas em estudo anterior (RYMSZA *et al.*, 2018) e um grupo constituído de amostras negativas para o HPV (43 amostras). Cada amostra foi inicialmente diluída em 0,5 ml de solução salina e centrifugada por 2 min a 4000 rpm, seguida da adição de 1 ml de solução de lise de glóbulos vermelhos (tampão SLH) e centrifugado por 15 min a 5000 rpm. Após esse procedimento, 1 ml de solução salina foi adicionado e centrifugado por mais 15 minutos a 5000 rpm e, em seguida, o sobrenadante foi removido. Este passo foi repetido mais duas vezes.

A aquisição dos espectros foi realizada pelo equipamento Spectrum 400 (Perkin Elmer) equipado com um microscópio (Spotlight Perkin Elmer 400, EUA) e Spectrum Image,

*Spotlight* 400, na versão de software 3.6.2 foi usado para coletar os espectros. O sistema foi purgado com ar seco sem CO<sub>2</sub> (*Parker Purifier*, EUA) durante 2 horas antes da aquisição espectral. Os 20 µL de cada amostra purificada foram depositados nas janelas de fluoreto de cálcio (CaF<sub>2</sub>) e secos para formar uma película fina sob vácuo por 30 min. A análise foi realizada em dez pontos aleatórios na superfície do filme fino, cada ponto com uma média de 32 varreduras na faixa espectral entre 750 e 4000 cm<sup>-1</sup> usando 4cm<sup>-1</sup> de resolução.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os dados coletados foram transferidos da ficha de captação dos dados para a planilha Microsoft Excel, e em seguida exportados para o programa IBM SPSS *Statistics* 21.0. A análise estatística foi realizada pela leitura das frequências absolutas (N) e relativa (%) para variável descritiva e para variável quantitativa foram calculadas as medidas de média e desvio padrão e aplicado o teste de associação qui-quadrado (X<sup>2</sup>). Antes da aplicação deste teste, as medidas foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk (LE BOEDEC, 2016), para a verificação de normalidade, por ser um teste adequado para pequenas amostras, bem como ao teste não paramétrico de Mann-Whitney (TORMAN; COSTER; RIBOLDI, 2012). O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para a análise dos espectros de FT-IR, todos os espectros foram normalizados e centralizados em torno da média. As componentes principais foram calculadas por meio da matriz de covariância utilizando toda a faixa espectral. As análises de discriminantes Linear e Quadrática foram realizadas por meio dos resultados da PCR, no programa Minitab.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Clínica das Pacientes

A análise do teste de citologia oncótica Papanicolaou demonstrou a ausência de alteração citológica em 100% das amostras coletadas das pacientes do estudo.

Dentre as características avaliadas neste estudo, apenas a idade da paciente e a idade da primeira relação sexual (sexarca) foram estatisticamente significativas quando relacionadas com a presença ou ausência de infecção pelo HPV, identificado pela análise molecular (teste  $X^2$   $p < 0,05$ ). Foi observado que a infecção pelo HPV foi diagnosticada com frequência significativamente maior nas pacientes mais jovens quando comparadas com as pacientes com idade superior a 30 anos ( $p = 0,0005$ ). Além disso, a frequência de infecção também foi significativamente maior nas mulheres que tiveram a primeira relação sexual antes dos 20 anos em relação àquelas com primeira relação sexual após os 20 anos de idade ( $p = 0,0268$ ).

Quanto à multiplicidade de parceiros não foi detectada diferença significativa em relação à infecção pelo HPV, onde das sete mulheres com diagnóstico molecular positivo para o HPV, três (42,86%) possuem apenas um parceiro, quatro (57,14%) possuem dois parceiros e nenhuma delas teve três ou mais parceiros sexuais ( $p = 0,7736$ ).

Em relação ao tabagismo e consumo de álcool, nenhuma paciente HPV positivo era fumante e 42,86% eram pacientes que nunca usaram qualquer tipo de álcool, enquanto as demais (57,14%) consumiam álcool pelo menos uma vez por mês, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de HPV entre usuários e não usuários de álcool ( $p = 0,4500$ ) e tabagismo ( $p = 0,2497$ ).

Embora não sendo estatisticamente significativo, a relação entre nível educacional e a presença da infecção pelo HPV, foi observada maior prevalência de HPV entre os estudantes de maior escolaridade (Tabela 4).

Tabela 4: Características clínicas e comportamentais das pacientes e sua relação com a infecção pelo HPV.

<b>Características</b>	<b>HPV +</b>	<b>%</b>	<b>HPV -</b>	<b>%</b>	<b>p valor</b>
<b>Idade da paciente</b>					<b>0.0005***</b>
≤ 30 anos	7	100.00	13	30.23	
> 30 anos	0	0.00	30	69.77	
<b>Idade da primeira relação sexual (sexarca)</b>					<b>0.0268*</b>
≤ 20 anos	4	57.14	8	18.60	
> 20 anos	3	42.86	35	81.40	
<b>Multiplicidade de parceiros sexuais</b>					0.7736 <sup>ns</sup>
1	3	42.86	23	53.49	
2	4	57.14	19	44.19	
3 ou mais	0	0.00	1	2.33	
<b>Tabagismo</b>					0.2497 <sup>ns</sup>
Sim	0	0.00	7	16.28	
Não	7	100.00	36	83.72	
<b>Uso do álcool</b>					0.4500 <sup>ns</sup>
Sim	4	57.14	18	41.86	
Não	3	42.86	25	58.14	
<b>Grau de escolaridade</b>					0.6328 <sup>ns</sup>
Educação Elementar incompleta	0	0.00	4	9.30	
Educação Elementar completa	0	0.00	6	13.95	
Educação Secundária incompleta	1	14.29	5	11.63	
Educação Secundária Completa	3	42.86	19	44.19	
Educação Superior	3	42.86	8	18.60	
Educação Superior Incompleta	0	0.00	1	2.33	

Legenda: HPV-: amostras com ausência de HPV pelo teste molecular HPV+, amostras com presença de HPV pelo teste molecular; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; ns: não estatisticamente significativo.

Fonte: o autor.

## 5.2 Análise Citológica

O resultado da análise de citologia oncológica mostrou que 100% das amostras de fluidos cervicais das pacientes analisadas foram negativas para a presença de alterações citológicas.

### 5.3 Análise molecular

Na análise de quantificação do DNA de todas as amostras foram observados valores de concentração que variaram de 15 ng/μl a 651,85 ng/μl, com uma concentração média de 142,59 ng/μl. Em relação à contaminação com reagentes e proteínas foram observados valores ótimos da razão 260/280, que devem estar entre 1,8 e 2,0, e da razão 260/230 que devem estar entre 1,7 e 2,2 (APÊNDICE 2).

Na análise da eletroforese de DNA genômico das 50 amostras de fluido cervical das pacientes foi observado integridade do DNA em todas as amostras analisadas.

No presente estudo, foi observado que sete amostras foram positivas para infecção pelo HPV, mostrado por meio da visualização em eletroforese em gel de agarose da amplificação de sequência do gene *L1*. Todas estas sete amostras HPV positivas apresentaram diagnóstico citopatológico negativo pelo método de citologia oncótica Papanicolau (Tabela 5).

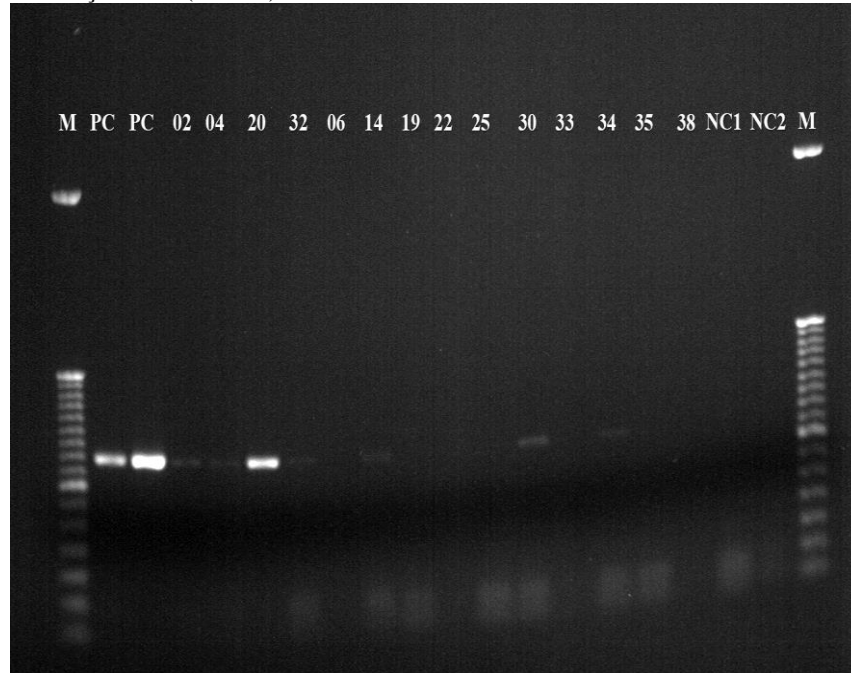
Tabela 5: Resultados das análises de citologia oncótica e PCR do gene *L1* do HPV em 50 amostras de fluido cervical de pacientes submetidas ao exame ginecológico.

Amostras	Citologia oncótica	Molecular (PCR)
1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50	Negativo para malignidade	Negativo
2, 4, 14, 20, 30, 32, 34	Negativo para malignidade	Positivo

Fonte: o autor

Na figura 8 está apresentada a eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene *L1* do HPV utilizando os iniciadores MY09 e MY11 de amostras de DNA do fluido cervical, mostrando as sete amostras positivas para infecção viral (HPV +) detectadas no presente estudo, duas amostras de controle positivo obtidas de estudo anterior do nosso grupo (RYMSZA *et al.*, 2018) e amostras de HPV negativo. Vale ressaltar que a sensibilidade da PCR foi extremamente alta, sendo capaz de amplificar a região flanqueada pelos *primers* mesmo em amostras com concentrações muito baixas de DNA, como a amostra 20 que apresentou apenas 15,00 ng/μL de DNA.

Figura 8: Imagem obtida por Eletroforese em gel de agarose (2,0%) da amplificação do gene HPV *L1* utilizando os iniciadores MY09 e MY11 de 17 amostras de DNA do fluido cervical, mostrando sete amostras positivas para infecção viral (HPV +).



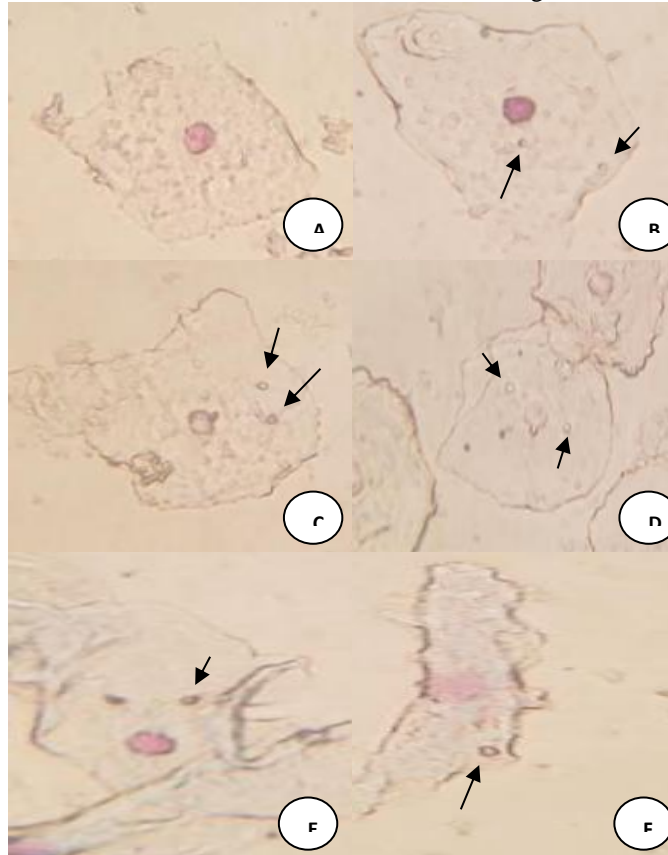
Legenda: M: Padrão de peso molecular (50 pb); CP: Controle Positivo (amostra HPV + obtida de estudo anterior); Amostras HPV +: 02, 04, 20, 32, 14, 30 e 34; Amostras HPV -: 06, 19, 22, 25, 33, 35 e 38, CN1: sem amostra de DNA (controle negativo); CN2: DNA de pessoa de saúde sem evidência de infecção pelo HPV por testes clínicos e laboratoriais (controle negativo).

Fonte: o autor.

#### 5.4 Análise pelo Teste de MN

Das 50 amostras de fluido cervical analisadas, 23 (46%) apresentaram presença de MN nas células, sendo sete dessas amostras HPV positivo detectadas em nosso estudo pela técnica de PCR (VIANA *et al.*, 2019- ANEXO 4) e 27 (54%) não apresentaram a formação de MN. Na Figura 9 são mostradas algumas células superficiais, parabasais e basais observadas na análise, tanto com presença quanto com ausência de MN, de amostra de fluido cervical, citologia de meio líquido, 1000X.

Figura 9: Imagem obtida por análise de microscopia óptica mostrando células superficiais, parabasais e basais, com presença e ausência de MN obtidas de fluido cervical, citologia de meio líquido, 1000X.



Legenda: A: Célula superficial de paciente HPV negativo e ausência de micronúcleo; B, C, D: Células superficiais de pacientes HPV negativo e presença de micronúcleo; E: Célula parabasal de paciente HPV positivo e presença de MN e F: Célula basal de paciente HPV positivo com presença de MN.  
Fonte: o autor.

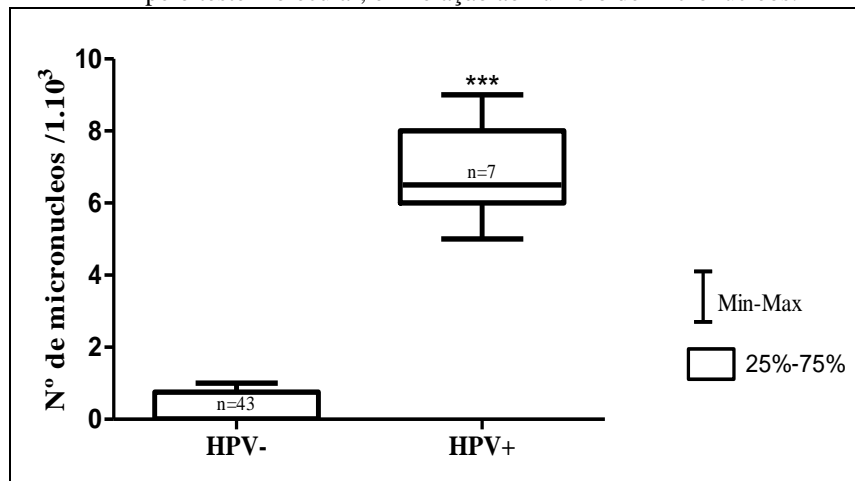
Na comparação da frequência de MN das células entre as amostras HPV positivo e HPV negativo, observou-se uma média de 20,71 (18,22-23,20) por lâmina no grupo das sete amostras HPV positivo, detectadas previamente pelo teste molecular, e uma média de 0,76 micronúcleos (0,41-1,12) por amostra, no grupo das 43 amostras HPV negativo. A comparação entre as médias da frequência de micronúcleos entre estes dois grupos analisados foi estatisticamente significativa, sendo superior nas amostras HPV positivo em relação às amostras não infectadas pelo vírus (HPV negativo) (*teste Mann-Whitney,  $p < 0,0001$* ) (Tabela 6, Figura 10).

Tabela 6: Frequência de MN observada, com valores de média e desvio padrão, na comparação entre os grupos de pacientes HPV positivo e HPV negativo.

	HPV Positivo		HPV Negativo		p-valor
	Média (IC - 95%)	Desvio padrão	Média (IC - 95%)	Desvio padrão	
<b>Micronúcleo</b>	20,71	2,69	0,76	1,15	<0,0001

Fonte: o autor

Figura 10: Gráfico do tipo *BoxPlot* dos resultados das amostras de fluido cervical HPV positivo e HPV negativo pelo teste molecular, em relação ao número de micronúcleos.



Legenda: HPV-: amostras com ausência de HPV pelo teste molecular HPV+: amostras com presença de HPV pelo teste molecular, n: número total de amostras \*\*\* (1000 células por lâmina) valor estatisticamente significativo (teste *Mann-Whitney*,  $p < 0,05$ ).

Fonte: o autor.

A relação da frequência de micronúcleos com os fatores de risco para a infecção de HPV mostrou diferença estatisticamente significativa entre a frequência de micronúcleos e a idade da paciente, abortamento e o uso de bebida alcoólica, sendo este último fator de risco para o desenvolvimento de câncer (SEITZ, 2017) (Tabela 7).

A maior frequência de micronúcleos foi observada em amostras de pacientes que tiveram a primeira relação sexual com idade menor que 20 anos, porém não apresentou evidência estatisticamente significativa.

Em relação à quantidade de parceiros sexuais, o uso de contraceptivo oral e o hábito tabagista, não foi observado diferença estatisticamente significativa quando comparado estes fatores com a frequência de micronúcleos observada nas células de fluido cervical das pacientes.

Tabela 7: Relação de fatores de risco para câncer de colo de útero com e frequência de micronúcleos analisados em células de fluido cervical de 50 pacientes submetidas ao exame ginecológico.

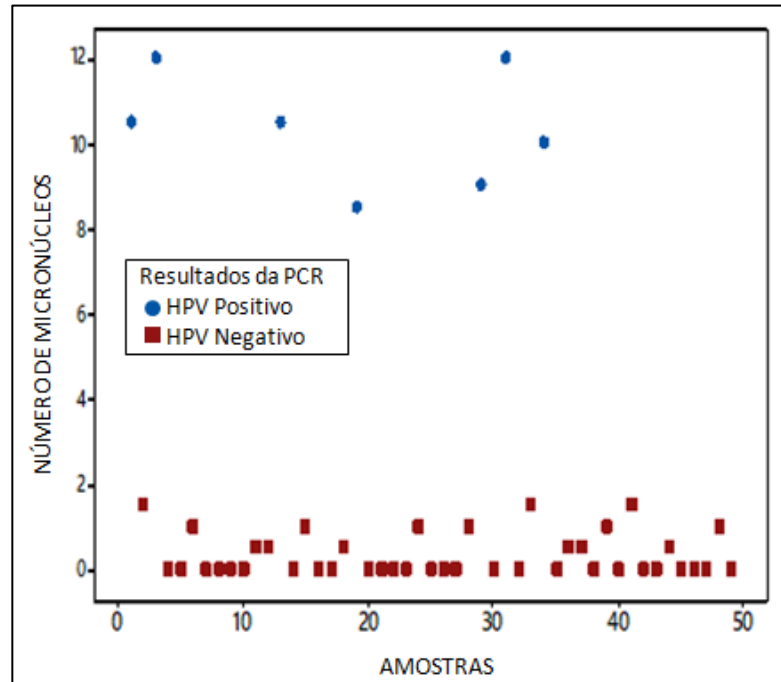
Fatores	Grupo definido	Amostras	Frequência MN	MN (%)	(Média ± Desvio Padrão)	Valor de P
<b>Idade</b>	< ou = 30 anos	20	120	85,7	(70,0±70,7)***	<b>0,0001</b>
	> 30 anos	30	41	25,4	(35,5±7,7)	
<b>Idade da primeira relação sexual</b>	< ou = 16 anos	36	160	68,6	(98,0±87,6)	0,73
	> 16 anos	14	73	31,3	(43,5±41,7)	
<b>Parceiros</b>	1	26	76	40,8	(26,0±35,3)	0,10
	2	23	90	48,3	(23,0±47,3)	
	3 ou +	1	20	10,7	(1,0±13,4)	
<b>Contraceptivo oral</b>	Sim	7	8	4,4	(7,5±0,70)	0,23
	Não	43	173	95,6	(108,0±91,9)	
<b>Abortamento</b>	Sim	43	33	18,5	(38,0±7,07)***	<b>0,0001</b>
	Não	7	145	81,5	(76,0±97,5)	
<b>Tabagismo</b>	Sim	22	92	51,6	(57,0±49,4)	0,4237
	Não	28	86	48,3	(57,0±41,0)	
<b>Alcoolismo</b>	Sim	10	10	5,7	(10,0±0,0)***	<b>0,0039</b>
	Não	40	165	94,2	(102,5±88,3)	

Legenda: MN: micronúcleo. Teste de  $X^2$ ,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*valor estatisticamente significativo.

Fonte: o autor.

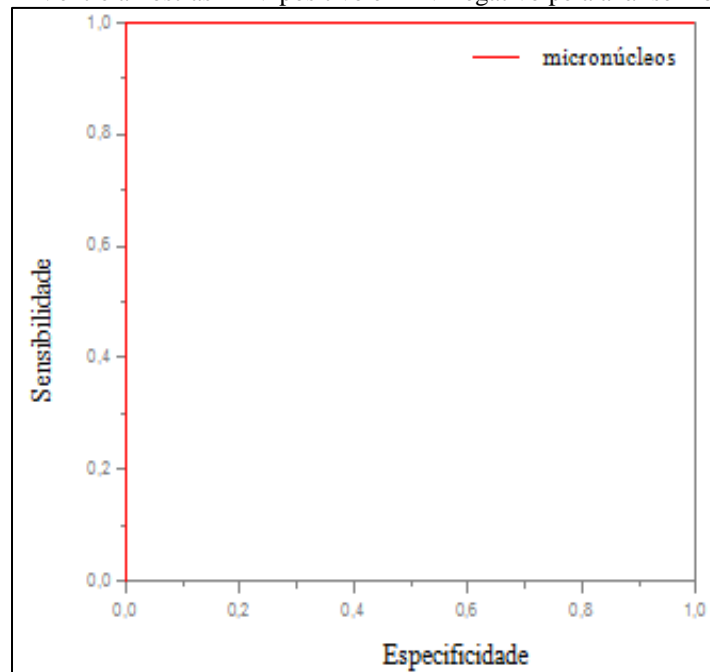
Na Figura 11 está representado o gráfico de dispersão do número de micronúcleos por célula de amostras de fluido cervical de 50 pacientes, onde a cor azul representa as sete amostras HPV positivo pelo teste molecular, e que apresentaram mais de dois micronúcleos e a cor vermelha representa as 43 amostras HPV negativo, onde foram observadas células com menos de dois micronúcleos. Na figura 12 estão ilustrados os resultados da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) baseada nos resultados do teste de MN celular utilizada para identificar as células com presença de HPV. Os resultados da curva ROC mostraram 100% de acurácia na identificação do HPV, com 100% de sensibilidade e especificidade quando confrontado com os resultados obtidos da análise molecular por PCR.

Figura 11: Gráfico de dispersão do número de MN por célula em 50 amostras de fluido cervical analisadas. As diferentes cores são utilizadas para diferenciar os resultados obtidos da PCR, amostras HPV positivo e HPV negativo.



Fonte: o autor

Figura 12: Gráfico de classificação de sensibilidade e especificidade, ROC comparando os resultados da frequência de MN entre amostras HPV positivo e HPV negativo pela análise molecular.



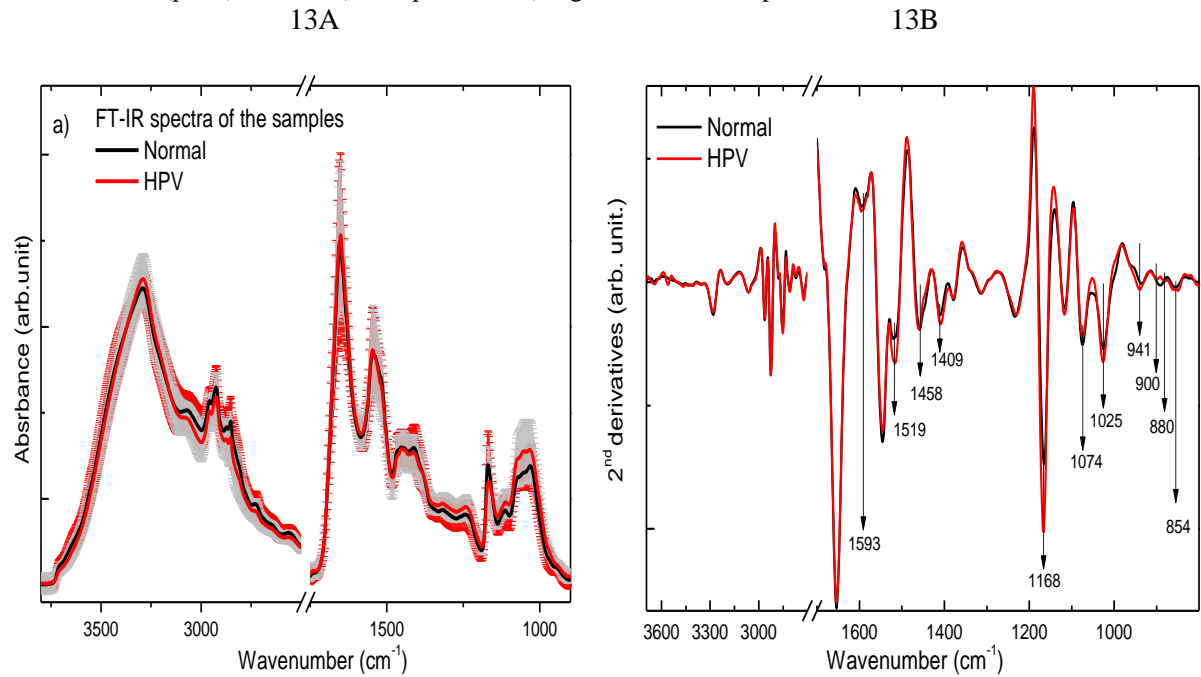
Fonte: o autor

## 5.5 Análise dos espectros de FT-IR

Na figura 13 estão apresentados os resultados de 50 amostras com laudo citológico normal, sendo sete amostras HPV positivo pelo resultado da análise molecular. Neste gráfico

a linha na cor cinza ao redor das linhas preto e vermelho representa o desvio padrão, indicando sobreposições dos espectros na faixa total estudada, realçando as diferenças entre os grupos (Figura 13A). As segundas derivadas dos espectros de FT-IR foram calculadas por meio dos espectros médios dos grupos (Figura 13B).

Figura 13: Comparação entre os espectros de amostras negativas para HPV (vermelho) e amostras positivas para HPV (preto), sendo: A) os espectros e B) segunda derivada espectral



Fonte: o autor

Foram demonstradas poucas diferenças entre os espectros com a análise dos dados, considerando o desvio padrão e sua sobreposição, onde a comparação entre as médias pode ajudar a entender as principais regiões espectrais. Considerando também que, o vírus HPV está apenas adicionado ao material genético das células, a diferença na segunda derivada do grupo HPV pode ser a atribuição de modos vibracionais (cm<sup>-1</sup>), conforme Tabela 8.

Tabela 8: Diferença na segunda derivada do grupo HPV pela atribuição dos modos vibracionais e picos de absorção.

<b>Modo Vibracional</b>	<b>Pico de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>
$\delta(\text{NH}_2)$ ou $\nu(\text{C} = \text{N})$	~1593
Base do anel ou $\delta(\text{C-H})$ desoxirribose	~1558
Amida II (acoplada) ou $\nu(\text{C-N})$	~1409
$\nu(\text{C-N})$ adenina ou $(\text{C-O})$ ribose	~1168
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$	~1074
$\nu(\text{C-O})$	~1025
Deformação do anel, $\delta(\text{N-C-N})$ adenina	~941
Deformação do anel, $\delta(\text{N-C-N})$ citosina	~900
Desoxirribose, $\nu(\text{C-O-C})$	~880
$\delta(\text{C-H})$	~854

Fonte: o autor

As análises discriminantes Linear (LDA) e quadrática (QDA) foram realizadas com base na Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando toda a faixa espectral. Para aumentar a taxa de classificação correta, as análises foram feitas com validação cruzada *leave-one-out*, levando a uma estimativa mais precisa. O melhor resultado do LDA para a proporção geral correta foi de 76,8% usando as primeiras 10 PCs, acumulando 97,0% da covariância dos dados. No entanto, o mesmo resultado foi alcançado para o QDA usando as primeiras quatro PCs mostrando mais eficiência na extração de informações de dados, usando 84,6% da covariância dos dados (Tabela 9). A proporção entre o número correto pelo número total do grupo, significa para taxa verdadeira positiva, a sensibilidade (76,9%) e para taxa verdadeira negativa, a especificidade (76,7%).

Tabela 9: Análise discriminante quadrática com validação cruzada baseada na Análise de Componentes Principais usando toda a faixa espectral.

Resumo de classificação do QDA com validação cruzada		
Grupos	Grupo	Verdadeiro
	H	N
H	10	10
N	3	33
Número total	13	43
Número Correto	10	33
Proporção	76,9%	76,7%

Legenda: N = 56, N correto = 43, Proporção correta = 76,8%

Fonte: o autor.

## 6 DISCUSSÃO

O vírus HPV está geralmente associado ao surgimento de tumores que podem ser benignos e malignos e neste último caso o câncer cervical, conforme relatado por alguns estudos (NAKAGAWA; SCHIRMER; BARBIERE, 2010; MOURA *et al.*, 2014; MACHADO, 2015). Ao infectar uma célula, o DNA deste vírus incorpora ao genoma do hospedeiro (CROSIGNANI *et al.*, 2013). Vários fatores podem ser associados à presença do HPV em infecção genital, tais como os relacionados ao comportamento sexual, primeira relação sexual (sexarca), o número de parceiros sexuais, a escolaridade e o nível sócio-econômico (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Em nosso estudo apenas a idade da paciente e a idade da primeira relação sexual (sexarca) foram estatisticamente significativas quando relacionadas com a presença ou ausência de infecção pelo HPV, onde a infecção pelo HPV foi diagnosticada com frequência significativamente maior nas pacientes mais jovens quando comparadas com as pacientes com idade superior a 30 anos e maior nas mulheres que tiveram a primeira relação sexual antes dos 20 anos.

Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos que mostraram que a prevalência da infecção pelo HPV é maior em mulheres mais jovens (SUDENGA *et al.*, 2017), entre 15 e 19 anos, com de 28% de mulheres infectadas por HPV (RIBEIRO *et al.*, 2013). O estudo de Adenis *et al.* (2017) revelou que mais de 50% das pacientes HPV positivo iniciaram suas práticas sexuais antes dos 16 anos de idade, o que pode sugerir que a prevalência da infecção pelo HPV encontra-se na população mais jovem, e que a regressão das alterações ocasionadas por este vírus pode ou não acontecer, tornando importante um acompanhamento especializado apropriado.

O estudo de Campos *et al.* (2008) evidenciou que diversos fatores influenciam direta e indiretamente o desenvolvimento do câncer do colo do útero relacionado ao HPV, tais como a idade, o número de parceiros sexuais, a idade de início das relações sexuais, o hábito de utilizar bebidas alcoólicas frequentemente, o hábito de fumar e o uso de contraceptivos orais. A utilização de anticoncepcionais orais, destacado no estudo de Shapiro, Rosenberg e Hoffman (2003), pode interferir na resposta eficiente das lesões causadas pelo vírus no colo uterino de mulheres jovens, pelo aumento da atividade de transformação dos vírus oncogênicos do HPV. Para Edouard (2005), o uso de contraceptivos hormonais propiciaria o aumento do risco de infecções cervicais pela indução ao aumento do pH vaginal e integração do DNA viral no genoma hospedeiro, proporcionando a progressão das lesões pré-malignas.

Contudo, em nosso estudo estes fatores não tiveram relação com a infecção pelo HPV nas amostras analisadas.

Quanto à escolaridade, não foi possível observar relação entre a infecção pelo HPV e o baixo nível de escolaridade das pacientes deste estudo, considerando que 42,86% das pacientes HPV positivo possuíam ensino médio completo e superior incompleto, resultado que contrasta com os estudos de Ribeiro *et al.* (2013) e Abreu *et al.* (2018), que evidenciaram relação entre o HPV e baixa escolaridade, fator associado à falta de conhecimento e de informações básicas necessárias para a adoção de medidas de prevenção de IST's. Esperava-se que as mulheres com um melhor nível educacional e cultural, vivendo em uma área geográfica com serviços públicos mais acessíveis tivessem menor probabilidade de contrair este vírus, considerando o maior nível de esclarecimento e melhor alcance ao serviço público de saúde para o rastreamento de lesões pré-cancerosas, bem como para a promoção, prevenção e recuperação da saúde. Esperava-se também que a maior taxa de infecção fosse na população menos informada.

Na comparação entre os fatores de risco para infecção de HPV com a frequência de micronúcleos analisadas nas células dos fluidos cervicais das pacientes foi observado diferença estatisticamente significativa apenas com relação à idade da paciente, realização de aborto e o uso de bebida alcoólica. Em relação ao tabagismo, não foi observada diferença significativa de número de micronúcleos de fluido cervical entre mulheres fumantes e não fumantes. Estes resultados são divergentes do estudo de Cerqueira *et al.* (1998), que evidenciaram maior número de MN em células cervicais esfoliadas nas pacientes fumantes. Assim, embora se saiba que a exposição direta do DNA no epitélio cervical à nicotina e à cotinina, e a exposição aos produtos resultantes das reações de outros componentes de cigarros são considerados como os mecanismos principais pelos quais o tabagismo pode contribuir para o aparecimento do câncer cervical (SIMONS; PHILIPS; COLEMAN, 1993; TELES; MUNIZ; FERRARI, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018), com os nossos resultados obtidos, não foi possível estabelecer a relação do cigarro com o aumento da frequência de micronúcleos.

Alguns estudos também relacionam o início e desenvolvimento do câncer de colo uterino, com outros fatores além do cigarro, tais como, a precocidade no início das relações sexuais, multiplicidade de parceiro, uso de hormônios para a contracepção por muito tempo, abortamentos, o uso de álcool e o hábito de fumar, dentre outros (FRIGO; OLIVEIRA, 2015; MELO *et al.*, 2016). Vale ressaltar que todas as pacientes do estudo apresentavam citologia

cervical normal e, portanto, a relação desses fatores de risco com o desenvolvimento do câncer de colo de útero não foi possível ser realizada neste estudo.

A análise de citologia oncótica Papanicolau, embora seja amplamente aplicada e considerado o teste padrão ouro, pode apresentar alta taxa de erros na interpretação do grau de diferenciação celular e na avaliação da morfologia cervical, levando a resultados falso-negativos e à necessidade de estudos e implementação de novas técnicas diagnósticas.

O avanço na área de biologia molecular que utiliza técnicas extremamente sensíveis na detecção direta e específica do HPV, detectando muitas vezes alterações moleculares antes que as alterações celulares se tornem visíveis e progridam para o câncer (KITCHENER *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015), tem cada vez possibilitado o barateamento e a sua aplicação na rotina clínica.

A amplificação gênica por PCR, segundo Coser *et al.* (2011), tem sido realizada com alta precisão e consiste na amplificação do DNA viral (HPV), utilizando iniciadores nas sequências conservadas do gene *L1* do HPV sendo utilizada, principalmente, para comprovar a existência ou não do DNA do vírus HPV (NONNENMACHER *et al.*, 2002). Com a aplicação desta técnica é possível identificar o DNA do HPV em 99,7% dos tipos de câncer do colo do útero invasivo (OLIVEIRA, 2013), que é primordial para estabelecer o genótipo do vírus que está presente nas amostras de fluidos ou mucosas genitais e assim auxiliar na escolha do tratamento mais adequado para pacientes infectados por este vírus (SERRAVALLE, 2015).

Neste estudo, das 50 amostras de fluido cervical de pacientes com resultado da citologia oncótica normal de pacientes analisadas por esta técnica, apenas em sete foram detectadas como positivas para a infecção pela presença de HPV pela análise molecular da PCR, técnica considerada padrão ouro (COSER *et al.*, 2011). Este resultado confirma a alta sensibilidade da PCR quando comparada com a análise citológica, pois nas pacientes com citologia normal foi detectada a presença do genoma do HPV.

Um estudo prévio de nosso grupo (RYMSZA *et al.*, 2018) comprovou a eficácia e sensibilidade do teste molecular pela PCR no diagnóstico do HPV, comparando-o com a citologia oncótica (Papanicolaou). Outro estudo realizado em Bangladesh (2019) evidenciou a eficácia do uso do emprego desta técnica de PCR na detecção do HPV em mulheres, que revelou que, de um total de 141 mulheres pesquisadas, 52 (36,9%) apresentaram resultado positivo para DNA do vírus, a presença do HPV (NAHAR *et al.*, 2019). Porém, apesar de se considerar a eficácia da técnica de PCR, tanto quanto a sua especificidade quanto

sensibilidade, conforme descreve Brustoloni *et al.*, (2007), a mesma ainda apresenta a desvantagem de possuir um custo mais elevado quando comparado com a análise citológica.

A realização do teste de MN neste estudo foi considerada, pois é um método já estabelecido na literatura, de baixo custo, sensível, rápido, de fácil manipulação, e que pode ser aplicado em larga escala, porém apresenta escassez de estudos atuais que abordem a relação aplicada por nós, tornando nosso estudo um dos poucos que relata a temática.

As pacientes que realizaram este teste foram identificadas quanto à idade, idade de início das relações sexuais, número de parceiros, uso de contraceptivo oral, hábito de fumar e hábito alcoólico, por serem fatores que mantêm estreita relação com o aumento da frequência de MN (FERNANDES, 2005; CAMPOS *et al.*, 2008; AMBROISE; BALASUNDARAM; PHANSALKAR, 2013). Em nosso estudo, das 50 amostras de fluido cervical analisadas, 23 (46%) apresentaram presença de MN nas células, sendo sete dessas amostras HPV positivo detectadas em nosso estudo pela técnica de PCR. A maior frequência de MN nas amostras HPV positivas em relação às amostras não infectadas pelo vírus (HPV negativo) sugere a relação da presença de infecção pelo vírus e a consequente formação de micronúcleos nas células.

Além disso, com base em nossos resultados sugere-se que mesmo em amostras com citologia normal, para as lesões intra-epiteliais, existem falhas na divisão celular e alterações cromossômicas que ocasionam a formação de micronúcleos. Os resultados do presente estudo estão de acordo com Doorbar (2005), que mostrou que no vírus existem fatores oncogênicos que provocam alterações citogenéticas nas camadas celulares da cérvix uterina e induzem a replicação de células imaturas, dificultando sua maturação e diferenciação, ocasionando a descontinuação da replicação, tendo como consequência várias anormalidades genéticas, tais como a formação de MN, que podem ser verificadas pelo teste de MN. Também concorda com o estudo de Vilanova *et al.* (2012) que observaram maior frequência de MN em pacientes portadoras do HPV, e que com a realização do teste de micronúcleo, é possível identificar anomalias nucleares em tecidos que são alvos específicos de agentes carcinogênicos e genotóxicos, onde os carcinomas se desenvolvem.

A inclusão de outras técnicas que possam superar as desvantagens dos testes moleculares e o teste de MN sempre pode beneficiar o paciente no sentido de trazer um diagnóstico mais preciso e confiável. A técnica de espectroscopia FT-IR pode trazer algumas vantagens, tais como o requerimento mínimo de preparo de amostras e a rapidez dos resultados.

Na literatura há poucos estudos da análise FT-IR para fins diagnósticos em câncer de colo uterino e o presente estudo é um dos primeiros, juntamente com o nosso estudo prévio publicado (RYMSZA *et al.*, 2018) que relaciona a técnica de FT-IR com a infecção pelo HPV em amostras de pacientes com citologia cervical normal.

As primeiras investigações de células esfoliadas cervicais utilizando FT-IR foram realizadas no início dos anos 90 e diferenças significativas entre amostras normais, pré-cancerígenas e cancerígenas foram evidenciadas pela publicação de artigos desta época (FUNG *et al.*, 1997). No estudo de Ellis *et al.* (2013), a espectroscopia FT-IR é descrita como uma técnica extremamente sensível que tem sido utilizada na detecção de vários tipos de cânceres, como o câncer de colo uterino, em que todos os constituintes bioquímicos de uma determinada amostra analisada são determinados. O estudo de Cohenford e Rigas (1998) mostrou alterações espectroscópicas nos espectros de FT-IR de células esfoliadas morfológicamente normais de mulheres com displasia ou câncer, diferenciando deste estudo apenas em relação a mulheres com displasia ou câncer. Para o diagnóstico de câncer, o estudo de Raniero *et al.*, (2011) e Backer *et al.*, (2008) comparou o tecido normal e anormal feito com vários grupos de pesquisa, os quais revelaram diferenças entre os modos de vibração dos espectros principalmente atribuídos às variações de lipídios e proteínas.

Neste estudo a classificação citopatológica foi normal em todas as amostras coletadas, então se utilizou a técnica PCR para rastrear o DNA do HPV nas células cervicais e estes resultados foram usados para discriminar a Análise de Componentes Principais calculada através dos espectros de FT-IR, que demonstraram resultados de especificidade e sensibilidade em torno de 76%, o que poderia ser explicado pelo grande desvio padrão e sua sobreposição.

As segundas derivadas dos espectros médios dos grupos mostraram variações nos modos vibracionais do DNA que poderiam ser atribuídos à presença do vírus. A deformação angular de  $\delta(\text{NH}_2)$  tem absorção nesta região espectral, formando uma sobreposição de bandas. A região espectral de  $1409\text{ cm}^{-1}$  dos modos amida II também tem deformação angular. A banda encontrada a  $1168\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída como  $\nu(\text{C-N})$  de adenina, conforme a banda de  $1074\text{ cm}^{-1}$ , pode ser designada como amida III,  $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ . O pico de absorção  $941\text{ cm}^{-1}$  foi atribuído como uma deformação do anel de adenina  $\delta(\text{N-C-N})$  (DHAOUADI *et al.*, 1993; CHENG *et al.*, 2005; FAGUNDES *et al.*, 2014).

Sugere-se que a menor carga viral muitas vezes reduzida na infecção ao paciente, bem como o número de pares de bases do pequeno tamanho do genoma viral do HPV, provavelmente não apresentaram diferenças significativas para possibilitar a discriminação

das amostras por FT-IR nos grupos HPV positivo e HPV negativo, obtidos pela análise de PCR. Porém, o estudo de Rymza *et al.* (2018) revelou mudanças espectrais por FT-IR em células citológicas normais obtidas do esfregaço cervical, provavelmente devido à infecção pelo HPV. Entretanto, este estudo evidenciou que, de fato, a ausência de agrupamento por Análise de Componentes Principais (PCA) ocorreu porque 100% das amostras estudadas foram diagnosticadas como HPV positivo pela de PCR. Assim, não houve base estatística significativa para a espectroscopia de FT-IR apresentar este potencial.

Para o nosso conhecimento, um estudo recente realizado por Mo *et al.* (2020) utilizou o FT-IR em células esfoliadas cervicais combinadas com análise multivariada em grupos de amostras positivas para HPV e amostras normais e demonstrou diferença óbvia no espectro infravermelho entre os dois grupos, mostrando que a combinação da espectroscopia FT-IR com análise discriminante linear por análise de componentes principais tem um grande potencial para a triagem da presença do vírus HPV, com resultados de especificidade e sensibilidade em torno de 98%, o que difere do nosso estudo por não apresentar nível de especificidade e sensibilidade tão altos assim.

Considerando as técnicas abordadas e os resultados obtidos nos laudos de citologia não possibilita determinar se as amostras tinham a presença do HPV, o que foi possível pela realização da análise de PCR, em que foi verificado que era HPV positivo ou não. Portanto, já se pode destacar a discrepância entre os resultados do laudo de citologia e os resultados do PCR. Por outro lado, o FT-IR mostrou um resultado de baixa sensibilidade e especificidade em função da baixa carga viral ou baixa alteração proteica.

Portanto, torna-se imprescindível a realização de novos estudos, com um maior número amostral, incluindo amostras com citologia cervical alterada, no sentido de se estabelecer técnicas de diagnóstico que se complementem com resultados rápidos e precisos, e consequentemente eficácia na prevenção de lesões uterinas e tratamento das pacientes.

## 7 CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo foi possível atingir os objetivos propostos, pela comparação dos resultados da análise molecular pela PCR, com os resultados do MN e técnica de FT-IR, em que se observou que o exame citopatológico das amostras analisadas não evidenciou alterações citológicas indicativas da presença do vírus HPV.

A presença de infecção por este vírus, evidenciada pela PCR em algumas amostras com citologias normais, confirma a hipótese de que o HPV pode estar presente no colo uterino, mesmo sem manifestação clínica. É importante ressaltar que a detecção molecular do HPV é fundamental no diagnóstico precoce e prognóstico clínico de lesões pré-cancerosas, possibilitando melhor tratamento para a paciente, como poder ser utilizada como um mecanismo alternativo de vigilância para a triagem citológica de rotina. A técnica de PCR pode ser considerada padrão ouro para a detecção do HPV pela sua alta sensibilidade.

Sugere-se que o aumento da frequência de MN observado neste estudo em amostras infectadas pelo HPV, pode ser devido a instabilidade genômica causada pela presença do vírus. Dessa forma, pode-se considerar o teste de MN como um teste de rastreamento de infecção pelo HPV e que possui o potencial de atuar como um exame preventivo, pois é um método prático, simples, de baixo custo e não invasivo que monitora o efeito de fatores carcinógenos na célula.

A espectroscopia FT-IR comparada com a PCR foi menos efetiva, sendo menos precisa e direta, pois a PCR é específica na detecção do genoma do vírus. Apesar da espectroscopia FT-IR apresentar grande potencial, por ser um teste de alta sensibilidade e especificidade no rastreamento do câncer cervical, não demonstrou ser eficiente na discriminação de amostras infectadas pelo HPV.

Observando-se a comparação entre as técnicas utilizadas neste estudo, destaca-se a alta sensibilidade da técnica molecular de PCR, que apesar da sua alta sensibilidade e ser considerada padrão ouro, apresenta certa dificuldade de ser implementada na rotina clínica devido ao seu alto custo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. N. S. *et al.* Knowledge and perception of HPV in the population over 18 years of age in the city of Ipatinga – State of Minas Gerais, Brazil. **Cien Saude Colet.**, v. 23, p. 849–860, 2018.
- ADENIS, A. *et al.* V. High prevalence of HPV infection in the remote villages of French Guiana: an epidemiological study. **Epidemiol Infect.**, v. 145, p. 1276–1284, 2017.
- ALVES, R. R. *et al.* Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: a community-based study. **BMC Public Health.** v.1, p. 1041, 2013.
- AMANN, R.; FUCHS, B. M. Single-cell identification by improved FISH. **Nature Reviews Microbiology.** v. 6, p.339- 348, 2008.
- AMBROISE, M. M.; BALASUNDARAM, K.; PHANSALKAR, M. Predictive Value of Micronucleus Count in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Carcinoma. **Turk Patoloji Derg.**, v. 29, p. 171-178, 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Câncer Cervical: Causas, Fatores de Risco e Prevenção.**Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2018.
- ANDRADE, M. G. *et al.* Micronúcleo: Um Importante Marcador Biológico Intermediário na Prevenção do Câncer Bucal. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 48, 2005.
- BAKER, M. J. *et al.* FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. **Br J Cancer.**, v. 99, p. 1859-1866, 2008.
- BORSATTO, A. Z.; VIDAL, M. L. B.; ROCHA, R. C. N. P. Vacina contra o HPV: Aspectos Práticos. **Rev Brasil Cancerol.**, v. 57, n.1, p. 67-74, 2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Comitê permanente de acompanhamento da vacina do HPV.** Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
- BRUSTOLONI, Y. M. *et al.* Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 102, p. 497–500, 2007.
- CAMPOS, L. M. F. R. *et al.* Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer, **Med J.**, v. 126, n. 6, p. 323-8, 2008.
- CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus Humano. **SaBios-Rev Saúde Biol.**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2007.
- CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. **Considerações para monitoramento populacional utilizando técnicas citogenéticas.** Pesquisa de mutação / toxicologia genética. Elsevier, 1988.

- CARRARD, V. C. *et al.* Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre. v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.
- CARVALHO, N. Sustained efficacy and immunogenicity of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3 years in young adult women. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6247-6255, 2010.
- CERQUEIRA, E. M. *et al.* Danos genéticos em células esfoliadas do colo uterino. Associação e interação entre o tabagismo e progressão para transformação maligna? **Acta Cytol.**, n. 3, p. 639-49, 1998.
- CHENG, W. T. *et al.* Micro-Raman spectroscopy used to identify and classify human skin pilomatrixoma. **Microsc. Res. Technol.**, v. 68, n. 2, p. 75–79, 2005.
- COHENFORD, M. A.; RIGAS, B. Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on IR spectroscopy: Implications for tumor biology. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 95, p. 15327–15332, 1998.
- CONSELHO NACIONAL DE SECRETÁRIOS DE SAÚDE (CONASS). Notícias do Ministério da Saúde. **HPV terá dois novos tratamentos gratuitos em 2019**. Disponível em <https://www.conass.org.br/hpv-tera-dois-novos-tratamentos-gratuitos-em-2019/>. Acesso em: 02 ago. 2019.
- COSER, J. *et al.* Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. **Genet Mol Res.** v. 12, n. 4, p. 4276-85, 2011.
- COURSAGET, P. Serology for human papillomavirus. **Salud Publica Mex.**, v. 45, p. 361-6, 2003.
- CRAWFORD, L. V.; CRAWFORD, E. M. A comparative study of polyoma viruses. **Virology**, v. 21, p. 258-63, 1963.
- CROSIGNANI, P. *et al.* Towards the eradication of HPV infection through universal specific vaccination. **BMC Public Health.**, v. 13, p. 1-11, 2013.
- DHAOUADI, Z. *et al.* Vibrational motions of bases of nucleic acids as revealed by neutron inelastic scattering and resonance Raman spectroscopy. 1. Adenine and its deuterated species. **J. Phys. Chem.**, v. 97, n. 5, p. 1074–1084, 1993.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol.**, v. 32, n. Supp. 1, p. S7-S15, 2005.
- DUNNE, E. F. *et al.* Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. **Am Med Assoc.**, v. 297, p. 813–819, 2015.
- EDOUARD, L. Sex in the cervix: hormones, infections and cancers. **J Fam Plann Reprod Health Care.**, v. 31, p. 338 – 339, 2005.

EDWARDS, L. *et al.* Self-administered Topical 5%. Imiquimod Cream for External Anogenital Warts. **Arch Dermatol.** v. 134, p. 25-30, 1998.

ELEUTERIO, R. M. N. *et al.* Identificação de DNA-HPV em Adolescentes e Mulheres Jovens sem Coito Vaginal. **DST J Bras Doenças Sex Transm**, v. 23, p. 66-68, 2011. Disponível em: <http://www.dst.uff.br/revista23-2-2011/4Identificacao%20de%20DNAHPV%20em%20Adolescentes%20e%20Mulheres%20Jovens%20sem%20Coito%20Vaginal.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

ELLIS, D. I. *et al.* Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. **Analyst.**, v. 138, p. 3871–3884, 2013.

ENCINA, G. M. A; ALVES, C. S. R; **Papiloma vírus Humano (HPV):** sua relação com câncer de colo uterino. Faculdades Integradas de Ourinhos. 2013. Disponível em: [http://corenpr.org.br/artigos/Papiloma%2520v%25C3%25ADrus%2520Humano%2520\(HPV\)\\_Griselda\\_Maria\\_Avila\\_Encina.doc+&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://corenpr.org.br/artigos/Papiloma%2520v%25C3%25ADrus%2520Humano%2520(HPV)_Griselda_Maria_Avila_Encina.doc+&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br). Acesso em: 27 abr. 2014.

FAGUNDES, J. *et al.* Ribosomal DNA Nanoprobes studied by Fourier Transform Infrared spectroscopy. **Spectrochim. Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.**, v. 118, p. 28-35, 2014.

FARSHADPOUR, F. *et al.* Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a casecontrol study regarding tobacco and alcohol consumption. **Patholog Res Int.**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA (FEBRASGO). **Doenças do Trato Genital Inferior** - Coleção Febrasgo. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 14, p. 29-36, 1985.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols.**, v. 2, p. 1084-104, 2007.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste de micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica, **Rev Saúde Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FERNANDES, T. S. **Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleo no biomonitoramento individual:** estudo comparativo. 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H.: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung vom Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Z Phys Chem.** ,v. 135, p. 203-248, 1924.

FRIGO, L. F.; OLIVEIRA, Z. S. Câncer de colo de útero: efeitos do tratamento. **Cinergis.**, v. 16, n. 3, 2015.

FUNG, M. F. K. *et al.* Comparison of fourier-transform infrared spectroscopic screening of exfoliated cervical cells with standard papanicolaou screening, **Gynecol. Oncol.**, v. 66, p. 10–15, 1997.

GATTÁS, G. J. F. *et al.* Identificação de micronúcleos (MN) em células esfoliadas de colo uterino de pacientes assintomáticas: correlação dos métodos de Papanicolaou e Feulgen-fast-green. **Revista A Folha Médica**, v. 104, n. 3, p. 57-59, 1992.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

GIULIETTI, A. *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**. San Diego, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

GRAVITT, P. E. *et al.* Melhor amplificação dos papilomavírus humanos genitais. **J Clin Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 357-61, 2000.

HALLIDAY, R.; JEARL, W. **Fundamentos de física 4**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

HOLLAND, N. *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps: **Mutat Res.**, v. 659, n. 1-2, p. 93-108, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Abordagem e tratamento do fumante: consenso 2001**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Nomenclatura Brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais e saúde**. 2 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer - INCA. **Coordenação de prevenção e vigilância**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 23 mar. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA **Câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=326](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326). Acesso em: 08 fev. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA **Incidência do Câncer no Brasil, estimativa 2018**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=326](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326). Acesso em: 22 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DAS DOENÇAS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (INCT-HPV)- **GUIA DO HPV. Entenda de vez os papilomavírus humanos, as doenças que causam e o que já possível fazer para evitá-los**. São Paulo, 2013. Disponível em: [http://www.incthpv.org.br/upl/fckUploads/file/Guia%20do%20HPV%20Julho%202013\\_2.pdf](http://www.incthpv.org.br/upl/fckUploads/file/Guia%20do%20HPV%20Julho%202013_2.pdf) f. Acesso em: 11 mar. 2016.

JIN, X.W. Cost-Effectiveness of Primary HPV Testing, Cytology and Co-testing as Cervical Cancer Screening for Women Above Age 30 Years, **J Gen Intern Med.**, v. 31, p. 1338–1344, 2016.

JUNG, C. C.; BALSAMO, F.; FORMIGA, G. J. S. Condiloma acuminado em cicatriz Cirúrgica de amputação abdômino-perineal do reto. Relato de caso. **Rev Bras Coloproct.**, v. 25, n. 2, p. 155-157, 2005.

KELLY, J. G. *et al.* A spectral phenotype of oncogenic human papillomavirus-infected exfoliative cervical cytology distinguishes women based on age. **Clin Chim Acta**, v. 411, p. 1027-1033, 2010.

KITCHENER, H. C. *et al.* MAVARIC - a comparison of automation-assisted and manual cervical screening: a randomized controlled trial, Clinical Governance. **An Internacional Journal**, v. 15, n. 3, 2011.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.

LE BOEDEC, K. Sensitivity and specificity of normality tests and consequences on reference interval accuracy at small sample size: A computer-simulation study. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, 2016.

LETO, M. G. P. *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 2, 2011.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. **Oral Oncology.**, v. 37, p. 401-18, 2001.

LIPPMAN, S. M.; PETERS, E. J.; WARGOVICH, M. J. Bronchial micronuclei as a marker of an early atage of carcinogenesis in the human tracheobronchial. **Int J Cancer**, v. 45, p. 811-15, 1990.

LYNG, F. *et al.* Vibrational Microspectroscopy for Cancer Screening. **Appl Sci.**, v. 5, n. 1, p. 23-35, 2015.

MACHADO, L. M. **HPV, câncer no colo uterino e seus fatores de risco para o acometimento.** Pernambuco, p. 1-33, 2015.

MARCO, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Viruses**, v. 5, n. 2, p. 708-31, 2013.

MARTINS, K. F; BOSCHINI FILHO, J. Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes. **Rev Fac Cienc Med.**, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2003.

MARTINS, L. F. L. Fatores associados a na realização do exame Papanicolau: um estudo transversal da base populacional em duas capitais brasileiras. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 52, n. 6, p.197, 2005.

MELO, T. F. V. *et al.* Perfil epidemiológico de mulheres com HPV atendidas em uma unidade básica de saúde. **Revista de Pesquisa: Cuidado é fundamental Online**, v. 8, n. 4, p. 5177-5183, 2016.

MFOUMOU, E. *et al.* A new concept to measure cell proliferation using Fourier transform infrared spectroscopy, **Med Hypotheses.**, v. 79, p. 171–173, 2012.

MO, H. *et al.* Rapid and non-invasive screening of high-risk human papillomavirus using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Optik.**, v. 206, 2020.

MORRIS, I. B. J. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy of dysplastic, papillomavirus-positive cervicovaginal lavage specimens. **Gynecol Oncol.**, v. 56, p. 245–9, 1995.

MOURA, E. R. F. *et al.* Panorama clínico, terapêutico e sexual de mulheres portadoras de Papiloma Vírus Humano e/ou Neoplasia Intraepitelial Cervical. **Rev Enf Ref.**, v. 4, n. 3, p. 113-120, 2014.

NAHAR, F. *et al.* Diagnóstico Molecular do Vírus do Papiloma Humano por PCR. **Mymensingh Med J.**, v. 1, p. 175-181, 2019.

NAKAGAWA, J. T. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Rev Bras Enferm.**, v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.

NERSESYAN, A. K. Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a mini review. **Tsitol Genet.**, v. 41, n. 5, p. 317-8, 2007.

NOBELPRIZE. org. **Press release.** 2008. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/press-release/>. Acesso em: 15 abr. 2016.

NONNENMACHER, B. *et al.* Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Rev Saúde Pública**, v. 36, p. 95-100, 2002.

O CUIDAR em enfermagem. Disponível em: <http://ocuidaremenfermagem.blogspot.com>. Acesso em: 16 jan. 2019.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC Cancer.**, v. 13, n. 357, 2013.

OLIVEIRA, G. R. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obs.**, v. 35, p. 226–232, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Folha informativa - **Limite da OMS para o álcool.** Jun, 2003.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Folha informativa - **HPV e câncer do colo do útero.** 2019.

OSTROWSKA, K. M. *et al.* Investigation of the influence of high-risk human papillomavirus on the biochemical composition of cervical cancer cells using vibrational spectroscopy. **Analyst.**, v. 135, p. 3087, 2010.

OSTROWSKA, K. M. *et al.* Correlation of p16 INK4A expression and HPV copy number with cellular FTIR spectroscopic signatures of cervical cancer cells. **Analyst.**, v. 136, p. 1365–1373, 2011.

PANG, C. L.; THIERRY, F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. **Microbial Pathogenesis**, v. 58, p. 55-65, 2012.

PASSOS, M. R. L. *et al.* Papilomavírose humana em genital, Parte I. DST. **J Bras Doenças Sex Trans.**, v. 20, n. 2, p. 108-124, 2008.

PETER, J. F. S. *et al.* The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J General Virology**, v. 71, p. 173-181, 1990.

PINHEIRO, M. M. *et al.* HPV e o desenvolvimento de neoplasias: uma revisão integrativa de literatura. **Rev Ciênc Saúde**, v. 15, n.1, p. 19-27, 2013.

RAMOS, M. L. M. **Alterações Citopatológicas ocasionadas pelo Papilomavírus humano (HPV) em adolescentes no Brasil.** 2013. 32f. Monografia (especialização em Citologia Clínica) – Faculdade Boa Viagem, Recife, 2013. Disponível em: <http://www.cceursos.com.br/img/resumos/citologia/30.pdf> . Acesso: 15 abr. 2016.

RANIERO, L. J. *et al.* In and ex vivo breast disease study by Raman spectroscopy. **Theor Chem Acc.**, v. 130, p. 1239–1247, 2011.

REIS, S. A. *et al.* Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicilau. **Rev Odonto Ciência.** v. 19, n. 46, p. 367-71, 2004.

RIBEIRO, A. A. **Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal.** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em medicina tropical e saúde pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

RIBEIRO, R. F. *et al.* Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: a community-based study. **BMC Public Health.** v. 13, p. 1-12, 2013.

RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Braz Oral Res.**, v. 20, n. 1, 2006.

RITARI, J. *et al.* Detection of human papillomaviruses by polymerase chain reaction and ligation reaction on universal microarray. **PLoS One.**, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2012.

- RYMSZA, T. *et al.* Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening, *Spectrochim. Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.*, v. 196, p. 238–246, 2018.
- ROSA, M. I.; MEDEIROS, L.R.; ROSA, D. D. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad Saúde Pública*, v. 25, n. 5, p. 953-64, 2009.
- ROSENBLATT, C.; LUCON, A. M.; WROCLAWSKI, E. R. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.
- SARTORI, M. P. D. N. *et al.* Presence of infection and analysis of HPV subtypes in girls younger than 9 years old attended at a referral service in Espírito Santo, Brazil, *J. Med. Virol.*, v. 90, p. 761–766, 2018.
- SCHUBERT, J. M. *et al.* Spectral cytopathology of cervical samples: Detecting cellular abnormalities in cytologically normal cells. *Lab Invest.*, v. 90, p. 1068–1077, 2010.
- SEARS, D. A.; UDDEN, M. M. Howell–Jolly bodies: a brief historical review. *Am J Med Sci.*, v. 343, p. 407–09, 2011.
- SEITZ, H. K. Alcohol and cancer-individual risk factors. *Addiction.*, v. 112, n. 2, p. 232-233, 2017.
- SERRAVALLE, K. Comparação entre duas técnicas de genotipagem do HPV em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau. *Rev Bras Ginecol Obs.*, v. 37, n. 2, p. 94-99, 2015.
- SETÚBAL, A. M. G. *et al.* Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal, *Rev Odonto Ciência- Fac.Odonto/PUCRS*, v. 20, n. 28, 2005.
- SHAPIRO, S.; ROSENBERG, L.; HOFFMAN, M. Risk of invasive cervical cancer in relation to the use of injectable progestogen contraceptives and estrogen / progestogen combined oral contraceptives (África do Sul). *Cancer Causes Control.*, v. 14, n. 5, p. 485-95, 2003.
- SHI *et al.* Associação entre a frequência de micronúcleos e cervical grau neoplasia intraepitelial no exame citológico THINPREP e seu significado. *Int J Clin Pathol Exp.*, v. 8, n. 7, p. 8426-32, 2015.
- SHIMIZU, N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 119-23, 2011.
- SILVA, C. S. F. *et al.* Frequência de micronúcleos em pacientes portadoras de câncer de colo uterino com indicação a radioterapia. In: Santana, Otacilio Antunes; Cabral Filho, Paulo Euzébio; Rodrigues, Claudio Gabriel. *In: ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA*, 2017, São Paulo. *Anais...*, São Paulo: Blucher, p. 52-53, 2017.
- SILVA, E. P. *et al.* Frequency and genotyping of human papillomavirus in women submitted to cytology, *DST J Bras Doenças Sex Transm.* v. 27, p. 22–28, 2015.

- SILVA, H. A. *et al.* A citopatologia uretral como ferramenta na detecção de efeito citopático do papilomavírus humano (HPV) em pacientes com peniscopia característica de infecção viral. **RBAC**, v. 40, n. 1, p. 69-71, 2008.
- SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- SIMONS, A. M.; PHILIPS, D. H.; COLEMAN, D. V. Danos ao DNA no epitélio cervical relacionados ao tabagismo. **BMJ.**, v. 306, n. 6890, p. 1444-8, 1993.
- SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev Bras Cancerol**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.
- SOUZA, D. R.; CATÃO, R. M. R. A importância do conhecimento sobre papilomavírus humano: considerações gerais. **Rev Biol Farmácia.**, v. 8, n. 2, p. 1-14, 2012.
- STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human bucal mucosa cells. **International Journal of Cancer**. v. 31, n. 3, p. 305-308, 1983.
- STOLER, M. H.; SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. **JAMA.**, v. 285, p. 1500-1505, 2001.
- STRAUSS, M. J. *et al.* Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 72, n. 46, 1949.
- STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2004.
- SUDENGA, S. L. *et al.* Cervical HPV Natural History Among Young Western Cape, South African Women: The Randomized Control EVRI Trial. **J Infect.**, v. 72, p. 60-69, 2017.
- TANER, Z. M. H. *et al.* Therapeutic value of trichloroacetic acid in the treatment of isolated genital warts on the external female genitalia. **J Reprod Med.**, v. 52, n. 6, p. 521-525, 2007.
- TELES, C. C. G. D.; MUNIZ, M. C. V.; FERRARI R. Tabagismo Associado às Lesões Precursoras para o Câncer de Colo Uterino. **Rev enferm UFPE on line**, v. 7, n. 9, p. 5427-34, 2013.
- TERAI, M. *et al.* Oral wart associated with human papillomavirus type 2. **J Oral Pathol Med.**, v. 28, n. 3, p. 137- 40, 1999.
- TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. **Am J Epidemiol.**, v. 13, p. 840-850, 1991.
- TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. **Mutat Res.**, v. 271, p. 69-77, 1992.

TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Revista HCPA**, v. 32, n. 2, p. 227-234, 2012.

VIANA, M. R. P. *et al.* Molecular Detection of HPV and FT-IR Spectroscopy Analysis in Women with Normal Cervical Cytology. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, 2019.

VILANOVA, L. B. *et al.* Determinação da Frequência de Alterações Citogenéticas, Através do Teste de Micronúcleo em Células Cervicais Uterinas de Pacientes Portadoras De HPV. **Vittalle**, v. 24, n. 1, p. 19-25, 2012.

WALBOOMERS, J. M. M. *et al.* Papilomavírus Humano é uma causa necessária de câncer cervical invasivo em todo o mundo. **J. Patol.**, v. 189, p. 12-19. 2009.

WHEELER, C. M. *et al.* Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. **The Lancet Oncology**. v. 13, n. 1, p. 100–110, 2012.

WOLSCHICK, N. M. *et al.* Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. **Rev Bras Anal Clin.**, v. 39, n. 2, p. 123-129, 2007.

YOUNG, H. D.; FREEDMAN, R. A. **Física IV: ótica e física moderna 4.** 12 ed. São Paulo: Addison Wesley, 2009.

ZUR HAUSEN, H. Papilomavírus e câncer: de estudos básicos a aplicações clínicas. **Nat Rev Cancer.** , v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA-UNIVAP INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO-IP&D PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA PROGRAMA DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

#### QUESTIONÁRIO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Data: / /

1. **Participante número:**
2. **Idade:** \_\_\_\_\_ anos / **Peso:** \_\_\_\_\_ Kg / **Altura:** \_\_\_\_\_ cm / **Cintura:** \_\_\_\_\_ cm
3. **Data de nascimento:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
4. **Menarca:** \_\_\_\_\_ anos; **Sexarca:** \_\_\_\_\_ anos; **Última menstruação:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
5. **Cidade onde nasceu e onde vive:** \_\_\_\_\_
6. **Grupo étnico:** ( ) branco; ( ) pardo; ( ) negro; ( ) amarelo; ( ) indígena
7. **Qual a situação conjugal?** ( ) casada/companheiro ( ) separada/divorciada ( ) solteira  
( ) viúva
8. **Número de filhos naturais:** \_\_\_\_\_
9. **Até que série você completou com aprovação?**  
( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo  
( ) 2º grau incompleto ( ) 2º grau completo  
( ) superior incompleto ( ) superior completo  
( ) pós-graduação ( ) ignorado
10. **Qual o seu trabalho atual?** \_\_\_\_\_
11. **Há quanto tempo você exerce essa função?** \_\_\_\_\_
12. **Qual a sua jornada de trabalho semanal?** \_\_\_\_\_
13. **Quantas horas de sono você dorme em média por dia?** \_\_\_\_\_
14. **No seu trabalho atual já se expôs a alguma dessas substâncias?**  
( ) derivados do petróleo (horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) tintas/corantes (horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) solventes (horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) pesticida/herbicida(horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) mercúrio/vapores de outros metais pesados(horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) outras substâncias químicas – quais? \_\_\_\_\_(horas/semana: \_\_\_\_\_)
15. **No seu emprego anterior, já se expôs a alguma dessas substâncias?** (Informe tempo de exposição em horas/semana):  
( ) derivados do petróleo (horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) tintas/corantes (horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) solventes(horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) pesticida/ herbicida(horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) mercúrio/ vapores de outros metais pesados(horas/semana: \_\_\_\_\_)  
( ) outras substâncias químicas – quais? \_\_\_\_\_(horas/semana: \_\_\_\_\_)
16. **Você utiliza equipamento de segurança em seu trabalho? Com qual frequência?**  
( ) sim ( ) não ( ) sempre ( ) quase sempre ( ) pouco
17. **Você pratica algum exercício físico?** ( ) sim ( ) não
18. **Se sim, qual?**  
( ) musculação ( ) corrida ( ) pilates ( ) futebol/vôlei ( ) outro: \_\_\_\_\_
19. **Qual a frequência?**  
( ) 1vez/ semana ( ) 2 vezes/ semana ( ) 3 vezes/ semana ( ) 4 vezes/ semana ou mais
20. **Você fuma ou já fumou?** ( ) sim ( ) não - **Se não, vá para a questão 25**
21. **Se sim, quantos cigarros fuma por dia e há quanto tempo?** \_\_\_\_\_ (número de ciga  
\_\_\_\_\_ ( ) meses / ( ) anos

22. **Fuma também:** ( ) cigarro de palha ( ) cachimbo ( ) outros: \_\_\_\_\_ Quantas vezes ao dia?  
\_\_\_\_\_

23. **Se parou, durante quanto tempo você fumou?** \_\_\_\_\_ (número de cigarros)

24. **Quantos cigarros fumava por dia?** \_\_\_\_\_ (número de cigarros)

25. **Medicamentos utilizados rotineiramente** (indicar a frequência em vezes/dia):

( ) hormônios \_\_\_\_\_

( ) vitaminas e/ou suplementos \_\_\_\_\_

( ) comprimidos para pressão \_\_\_\_\_

( ) antibióticos \_\_\_\_\_

( ) insulina \_\_\_\_\_

( ) tranquilizantes \_\_\_\_\_

( ) relaxantes musculares \_\_\_\_\_

( ) outros – quais? \_\_\_\_\_

26. **Está fazendo algum tratamento de saúde?** (por ex: coluna, gripe, alergia, dores, etc...)

( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_ Tempo do tratamento: \_\_\_\_\_

27. **Fez algum raio X no último ano?** ( ) sim ( ) não- Quanto tempo? \_\_\_\_\_

28. **Com que frequência você consome bebidas alcoólicas?**

( ) nunca- vá para a questão 32 ( ) uma vez ou por mês ou menos ( ) 2 a 4 vezes ao mês

( ) 2 a 3 vezes por semana ( ) 4 ou mais vezes por semana

29. **Quais bebidas você consome?** ( ) somente cerveja ( ) somente vinho ( ) somente destilados

( ) cerveja e vinho ( ) cerveja e destilados ( ) vinho e destilados ( ) cerveja, vinho e destilados

30. **Nas ocasiões em que bebe, quantas doses** ( ), copos ( ), ou garrafas ( ). Você costuma tomar? ( ) 1 ou 2 ( ) 3 ou 4 ( ) 5 ou 6 ( ) 7 a 9 ( ) 10 ou mais

31. **Com que frequência você toma seis ou mais doses em uma ocasião?**

( ) nunca ( ) menos de uma vez ao de mês ( ) uma vez ao mês ( ) uma vez por semana

( ) todos os dias ou quase todos

32. **Quantas e quais refeições você faz por dia?** \_\_\_\_\_

33. **Ingere frutas e verduras? Se sim, indique a frequência** (em dias/ semana)

( ) não ( ) sim ( ) 1 a 2 ( ) 3 a 4 ( ) 5 a 6 ( ) todos os dias

34. **Ingere carnes?** ( ) sim ( ) não/ Se sim, com que frequência você come:

Dias por semana				
	1 a 2	3 a 4	5 a 6	Todos os dias
Carne Bovina	( )	( )	( )	( )
Peixe	( )	( )	( )	( )
Frango	( )	( )	( )	( )
Porco	( )	( )	( )	( )
Outras	( )	( )	( )	( )

35. **Você já teve/tem alguma dessas doenças?**

( ) câncer- Qual? \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

( ) AIDS ( ) anemias ( ) doenças cardíacas – Idade: \_\_\_\_\_ ( ) esclerose múltipla – Idade:

\_\_\_\_\_ ( ) diabetes- Idade: \_\_\_\_\_ ( ) outras – quais e que idade apresentou? \_\_\_\_\_

36. **Alguém da sua família já teve/tem alguma dessas doenças?** (indicar o grau de parentesco ao lado): \_\_\_\_\_

( ) doenças cardíacas \_\_\_\_\_ ( ) esclerose múltipla \_\_\_\_\_ ( ) diabetes

\_\_\_\_\_ Em que idade? \_\_\_\_\_ ( ) outras – quais?

37. **Casos de câncer na família:** ( ) não ( ) sim

38. **Quais os tipos de câncer?** (indicar o grau de parentesco ao lado):

( ) pele: \_\_\_\_\_ ( ) mama: \_\_\_\_\_ ( ) leucemia: \_\_\_\_\_

( ) esôfago: \_\_\_\_\_

( ) outros: \_\_\_\_\_

**39. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos ou cônjuges?**

não  sim – qual? \_\_\_\_\_

**40. Histórico de aborto espontâneo?**  não  sim – quantas vezes? \_\_\_\_\_

**APÊNDICE 2**

**TABELA DE CONCENTRAÇÕES DE DNA EXTRAÍDO E RAZÕES DE PUREZA DAS AMOSTRAS DE DNA**

<b>AMOSTRA</b>	<b>[ ] ng/ul</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
1	108.91	2.37	0.39
2	97.72	2.89	0.41
3	142.74	2.42	0.3
4	112.72	2.39	0.44
5	133.47	2.56	0.51
6	327.56	3.19	1.36
7	58.41	2.79	0.16
8	117.06	2.48	0.36
9	62.85	3.13	0.33
10	104.60	2.41	0.56
11	108.16	2.19	0.51
12	92.52	2.29	0.43
13	111.40	2.4	0.45
14	163.80	3.21	0.85
15	37.24	3.48	0.13
16	91.70	2.05	0.39
17	125.85	2.38	0.49
18	156.40	1.76	0.68
19	129.69	2.85	0.65
20	15.00	2.61	0.09
21	113.23	2.35	0.35
22	651.85	2.06	1.57
23	124.55	2.16	0.6
24	103.02	2.58	0.53
25	297.38	2.82	1.14
26	113.27	2.13	0.53
27	118.81	2.48	0.57
28	117.45	3.03	0.38
29	106.11	3.25	0.45
30	190.53	1.38	0.65
31	104.00	2.69	0.29
32	117.25	2.69	0.58
33	342.90	2.65	1.28
34	322.60	2.74	1.15

---

35	266.89	3.08	1.13
36	97.76	2.56	0.39
37	119.62	2.54	0.39
38	180.60	2.03	0.72
39	49.66	2.89	0.2
40	324.68	3.24	1.25
41	72.84	3.15	0.19
42	68.31	2.26	0.49
43	37.66	3.48	0.12
44	117.35	2.8	0.47
45	117.03	2.81	0.38
46	124.03	2.55	0.61
47	175.63	2.82	0.68
48	94.03	2.7	0.27
49	160.50	2.26	0.7
50	404.01	3.25	1.48

---

Fonte: o autor

**ANEXOS**

## ANEXO 1

CENTRO UNIVERSITÁRIO DA  
FACULDADE DE SAÚDE,  
CIÊNCIAS HUMANAS E



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE O DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS VIA TESTE MOLECULAR COM A ESPECTROSCOPIA FT-IR E TESTE DO MICRONÚCLEO

**Pesquisador:** Magda Rogéria Pereira Viana

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 80738217.1.0000.5210

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE DE ENSINO SUPERIOR E TECNOLÓGICO DO PIAUI LTDA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.434.076

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo experimental, com mulheres com idade entre 25 e 65 anos. A coleta das amostras será realizada nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) da Estratégia Saúde da Família (ESF), após ter sido especificadas informações sobre a pesquisa a cada paciente e esta manifestar espontaneamente o aceite em participar, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e da autorização da instituição coparticipante, no período de janeiro a março de 2018. O teste do MN será realizado no Laboratório da Faculdade Santo Agostinho. O material destinado à análise molecular e espectroscopia FT-IR serão analisados no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer e Laboratório de Nanosensores pertencentes ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do vale do Paraíba. O teste de Micronúcleo será feito a partir da análise citológica, que será realizada sob microscopia óptica (200X) e em teste cego em relação aos dados obtidos no questionário. Serão analisadas 2.000 células por paciente. Os critérios de identificação de micronúcleo adotados foram os descritos por Tolbert; Shy; Allen (1991; 1992). Serão considerados micronúcleos estruturas arredondadas e distintamente separadas do núcleo, com limites bem definidos, medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo e apresentados em relação a este, estrutura cromatinica e coloração similar, além de serem visualizados no mesmo plano. Os dados coletados serão transferidos da ficha de captação dos dados para a planilha Microsoft Excel para em seguida ser exportada para o programa IBM SPSS Statistics 20. A análise estatística será pela leitura das frequências absolutas (N) e relativa (%) quando se tratar de variável

**Endereço:** Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123

**Bairro:** Bairro do Uruguai

**CEP:** 64.073-505

**UF:** PI

**Município:** TERESINA

**Telefone:** (86)2106-0738

**Fax:** (86)2106-0740

**E-mail:** cep@uninovafapi.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DA  
FAÇULDADE DE SAÚDE,  
CIÊNCIAS HUMANAS E**



Continuação do Parecer: 2.434.076

categórica e quando for uma variável quantitativa serão calculadas as medidas de posição, média, e de dispersão, desvio padrão. Espera-se identificar correlação do teste Molecular (PCR), em fluido cervical de pacientes submetidas ao exame citopatológico, com os resultados obtidos pelo teste do micronúcleo e pela técnica de FT-IR para diagnóstico o Papilomavírus Humano.

**Objetivo da Pesquisa:**

Comparar resultados do teste Molecular, em fluido cervical de pacientes submetidas ao exame citopatológico, com os resultados obtidos pelo teste do micronúcleo e pela técnica de FT-IR.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios foram apresentados conforme item V da resolução 466/12 do C.N.S.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa de grande relevância social pois o câncer no Brasil é uma doença que ganhou relevância devido ao seu perfil epidemiológico apresentado, com crescente aumento do número de casos anualmente. Com o maior conhecimento da etiologia e biologia desta doença é possível estabelecer prioridades e designar recursos que sejam direcionados para a mudança positiva desse cenário na população brasileira. A estimativa de morte em mulheres por câncer de colo uterino evidencia uma incidência de 19,18/100.000 mulheres no Brasil. A infecção pelo vírus HPV é citada como um dos principais fatores de risco que contribuem para o câncer cervical, assim, o desenvolvimento de métodos que detectem a infecção por este vírus são importantes para a prevenção e diagnóstico do câncer cervical. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos alternativos, tais como o teste molecular por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), o teste de micronúcleo (MN) e a técnica de espectroscopia infravermelho de transformada de Fourier (FT-IR) para detectar com maior precisão e confiabilidade as alterações que esse vírus pode causar nas células do colo uterino.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados conforme a resolução 466/12 do C.N.S.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclui-se que o protocolo de pesquisa encontra-se APROVADO, porque está elaborado de acordo com as recomendações éticas da Resolução CNS 466/12.

**Endereço:** Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123  
**Bairro:** Bairro do Uruguai **CEP:** 64.073-505  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)2106-0738 **Fax:** (86)2106-0740 **E-mail:** cep@uninovafapi.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DA  
FACULDADE DE SAÚDE,  
CIÊNCIAS HUMANAS E**



Continuação do Parecer: 2.434.076

**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_1023147.pdf	04/12/2017 18:13:11		Aceito
Outros	cartaapresentacao.pdf	04/12/2017 18:10:55	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	cartaaocpep.PDF	04/12/2017 18:09:30	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	lattesrenata.PDF	04/12/2017 18:00:18	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	lattesleandro.pdf	04/12/2017 17:57:05	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	lattesmagda.pdf	04/12/2017 17:56:08	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	TCUD.pdf	04/12/2017 17:54:34	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisadores.pdf	04/12/2017 17:53:21	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.PDF	04/12/2017 17:07:39	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoatualoriginalesteatual.doc	04/12/2017 17:00:19	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	Instituicaocoparticipante.PDF	08/11/2017 17:15:16	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Outros	questionariodeentrevista.PDF	08/11/2017 17:10:59	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.PDF	08/11/2017 17:05:58	Magda Rogéria Pereira Viana	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123  
**Bairro:** Bairro do Uruguai **CEP:** 64.073-505  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)2106-0738 **Fax:** (86)2106-0740 **E-mail:** cep@uninovafapi.edu.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DA  
FAÇULDADE DE SAÚDE,  
CIÊNCIAS HUMANAS E



Continuação do Parecer: 2.434.076

TERESINA, 13 de Dezembro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Theonas Gomes Pereira**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123  
**Bairro:** Bairro do Uruguai **CEP:** 64.073-505  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)2106-0738 **Fax:** (86)2106-0740 **E-mail:** cep@uninovafapi.edu.br

## ANEXO 2

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA-UNIVAP  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO-IP&D  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Correlação entre o diagnóstico do Papilomavírus via teste Molecular com a Espectroscopia FT-IR e teste do Micronúcleo.

**Pesquisador Responsável:** Magda Rogéria Pereira Viana

**Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável:** Universidade do Vale do Paraíba  
Telefones para contato: (86) 9 99878400

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos R.G. \_\_\_\_\_

A Sra. está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa tendo como título “Correlação entre o diagnóstico do Papilomavírus via teste Molecular com a Espectroscopia FT-IR e teste do Micronúcleo”, de responsabilidade da pesquisadora Magda Rogéria Pereira Viana.

Antes de concordar em participar e responder esta entrevista, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de você se decidir a participar. Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

O câncer de colo uterino é um problema de saúde pública em que os dados estatísticos evidenciam o aumento da incidência do contágio pelo vírus HPV e dos casos diagnosticados de câncer de colo uterino, consequência, dentre outros fatores, do início da vida sexual cada vez mais precoce, do grande número de parceiros sexuais e pela prática do sexo desprotegido.

A infecção por tipos oncogênicos de HPV é o principal fator de risco associado ao câncer cervical, suas lesões precursoras e lesões intra-epiteliais escamosas de baixo e alto grau. O teste citopatológico do Papanicolaou é preconizado pelo MS para detecção de lesões causadas pela presença do HPV, sendo altamente subjetivo e incapaz de identificar o tipo do vírus presente na amostra, além disso em muitos casos, este teste apresenta baixa sensibilidade e especificidade. Deste modo, novas técnicas de diagnóstico, tais como o teste de Micronúcleo e a técnica de PCR e FT-IR, tem sido pesquisadas com o objetivo de auxiliar a análise citopatológica e melhorar a qualidade do rastreamento do câncer cervical. Embora haja relatos na literatura que utilizaram estas técnicas para a identificação da infecção pelo HPV, não há estudos que associam o uso de ambas para a identificação deste vírus e em um grande tamanho amostral.

A avaliação da frequência de MN em células cervicais pode ser um critério adicional para estabelecer o risco de câncer cervical, porque a detecção do aumento da frequência de MN pode indicar a presença de lesão intraepitelial. A aplicação da técnica de PCR irá detectar a presença do vírus HPV no fluido cervical e FT-IR para estudar as características de cepas de HPV é importante, porque a presença deste vírus pode causar alteração vibracional nos



espectros. Vale ressaltar que ambas as técnicas não são caras, são rápidas e possíveis de serem desenvolvidas em um laboratório de análise clínicas.

O objetivo geral do estudo é comparar resultados de PCR, em fluido cervical de pacientes submetidas ao exame citopatológico, com os resultados obtidos pelo teste do micronúcleo e pela técnica de FT-IR.

Trata-se de um estudo experimental, que seguirá as normas de Biossegurança e somente será realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba que segue a Resolução CNS/MS 466/2012. A coleta das amostras será realizada nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) da Estratégia Saúde da Família (ESF) de Teresina (PI), após ter sido especificadas informações sobre a pesquisa a cada paciente e esta manifestar espontaneamente o aceite em participar, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e da autorização da instituição coparticipante, no período de janeiro a março de 2018.

A participação, de caráter estritamente voluntário, dar-se-á mediante o consentimento livre e esclarecido das mulheres, tendo sido assegurado a todas sigilo dos dados obtidos. Será garantido o anonimato e as participantes serão identificadas como “participante número”. Será aplicado um questionário para caracterização das pacientes para coleta de dados. Participarão do estudo mulheres com idade entre 25 e 65 anos de idade, conforme preconiza o MS, com vida sexual ativa, cadastradas no Sistema Único de Saúde (SUS); mulheres com suspeita clínica de HPV e/ou com lesão cervical; bem como pacientes sem nenhum problema ginecológico. Um total de 100 amostras cervicais serão obtidas de pacientes que realizarão exame ginecológico de rotina no período de janeiro a março (2018), mediante a autorização da Comissão de Ética e Pesquisa da Fundação Municipal de Saúde da cidade de Teresina.

Haverá risco mínimo às participantes, entretanto existe a possibilidade de ocorrer danos emocionais decorrentes de perguntas direcionadas às participantes e coleta da citologia, que poderão causar desconforto, constrangimento e medo da possibilidade de vazamento de dados. Ressalta-se que a possibilidade é mínima, devido à característica da pesquisa em que preservará o anonimato. Para minimizar este risco as participantes serão entrevistadas e o exame será feito em um local reservado e confortável de forma individual, segura para garantir todo o sigilo das informações coletadas, além disso, serão esclarecidos à mesma os objetivos do estudo, bem como a forma de coleta do material. Todas as participantes terão seu anonimato assegurado, e serão esclarecidas quanto ao direito de retirar o consentimento a qualquer tempo sem qualquer ônus.

Os benefícios diretos se apoiam na possibilidade que no momento do questionário e exame, a participante possa ser ouvida atentamente, promovendo um conforto e bem-estar para a mesma, pois somente com perguntas feitas com profundidade é possível chegar mais próximo do que a participante pensa e assim poder confortá-la ainda mais. Acredita-se que este estudo poderá trazer também benefícios, que irão enriquecer a literatura científica acerca da temática e permitirá ter uma visão mais ampla de um cenário. E ainda os resultados finais desta pesquisa irão enriquecer a literatura científica acerca da temática através da divulgação dos resultados ao público em revistas científicas, contribuindo assim, para a construção de novos conhecimentos.

As entrevistas serão transcritas e armazenadas, em arquivos digitais, mas somente terão acesso a estes os pesquisadores. É garantida a indenização relacionada a qualquer dano associado ou decorrente da pesquisa - agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa. Os dados obtidos a partir da participante do estudo não poderão ser usados para outras finalidades não previstas neste protocolo e/ou consentimento. Ao final da pesquisa todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12.

Caso aceite participar do estudo, por favor, assine este documento, autorizando sua participação na pesquisa, que está em duas vias (uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável) do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Durante todas as etapas do estudo todos os pesquisadores respeitarão impreterivelmente a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que trata da ética de pesquisas que incluem, sejam de forma direta ou indiretamente os seres humanos.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do UNINOVAFAPI, no endereço: Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 – Uruguai, CEP: 64073-505 - Teresina – Piauí, Tel - (086) 2106-0738, e-mail: cep@uninovafapi.edu.br. O Comitê de Ética em Pesquisa é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade”.

**Contato com o (a) pesquisador(a) responsável: Telefone Institucional:**  
(86)99878400 **e-mail:** [magdarogeria@hotmail.com](mailto:magdarogeria@hotmail.com)



---

Magda Rogéria Pereira Viana



---

Renata de Azevedo Canevari



---

Leandro José Raniero

Teresina, 04 de Dezembro de 2017.



## ANEXO 3



## DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE

Declaro estar ciente dos objetivos do Projeto de Pesquisa “CORRELAÇÃO ENTRE O DIAGNOSTICO DO PAPILOMAVIRUS VIA TESTE MOLECULAR COM A ESPECTROSCOPIA FT-IR E TESTE DO MICRONÚCLEO” e concordo em autorizar a execução da mesma nesta instituição. Esta Instituição está ciente de suas coresponsabilidades como instituição coparticipante do presente Protocolo de Pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos participantes da pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança.

Conforme Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, a pesquisa só terá início nesta instituição após apresentação do Parecer de Aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP). Autorizo os pesquisadores: **MAGDA ROGERIA PEREIRA VIANA, RENATA DE AZEVEDO CANEVARI e LEANDRO JOSE RANIERO** acesso as mulheres entre 25 e 64 anos das Unidades Básicas de Saúde do município de Teresina-PI, para a coleta de amostra de material citológico, entrevista com as mesmas e prontuários.

Teresina, 26 de outubro de 2017.

*Ayla Maria Calixto de Carvalho*

Ayla Maria Calixto de Carvalho  
Comissão de Ética em Pesquisa da  
Fundação Municipal de Saúde

Ayla Maria Calixto de Carvalho  
Gerente de Ações Estratégicas  
GAE/FMS



## ANEXO 4

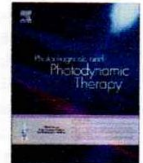
## ARTIGO 1

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 29 (2020) 101592



Contents lists available at ScienceDirect

## Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pdpdt](http://www.elsevier.com/locate/pdpdt)

## Molecular detection of HPV and FT-IR spectroscopy analysis in women with normal cervical cytology

Magda Rogéria Pereira Viana<sup>a</sup>, Igor Martins Alves Melo<sup>a</sup>, Breno Pupin<sup>a</sup>, Leandro José Raniero<sup>b</sup>, Renata de Azevedo Canevari<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi 2911, Urbanova, São José dos Campos, 12244-000, São Paulo, SP, Brazil<sup>b</sup> Laboratório de Nanosensores, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi 2911, Urbanova, São José dos Campos, 12244-000, São Paulo, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
HPV  
Diagnosis  
PCR  
FT-IR

## ABSTRACT

**Background:** The increase in the incidence of Cervical Cancer in the female population worldwide has been an issue that deserves further attention from the scientific community. Several studies have already proven the relationship of its development with the molecular mechanisms that Human Papillomavirus (HPV) induces in cervical cells. The gene amplification provided by molecular biology techniques has been used as the gold standard diagnostic method of this virus because of its high specificity and sensitivity. However, the high investments associated with the acquisition of reagents, equipment and labor demonstrate the need for the development of more accessible techniques that present the same accuracy. FT-IR spectroscopy has been studied as an inexpensive and easily accessible technology that can provide the differentiation of malignant and benign cells. This study aimed to demonstrate the effectiveness and sensitivity of molecular analysis by PCR in relation to cytological analysis and to evaluate the sensitivity of FT-IR spectroscopy in the diagnosis of HPV for cervical cancer prevention.

**Methods:** Cervical fluid samples obtained from 50 patients with absence of cellular lesion by cytological analysis were analyzed by molecular and spectroscopic analyzes. Oncotic colpopitology analysis was performed by the Papanicolaou staining, amplification of the L1 viral gene by PCR was performed using primers MY09 and MY11 and biochemical analysis of the fluids by FT-IR was performed using the Spectrum 400 system equipped with a microscope.

**Results:** Of the 50 patients without evident morphological alteration of the cells, seven were diagnosed by molecular analysis as positive for presence of HPV. Principal component analysis of spectroscopy was not able to separate the negative samples from the HPV positive samples and, therefore, did not present as an effective diagnostic technique.

**Conclusions:** We highlight the efficacy, sensitivity and specificity of molecular biology by PCR in the identification of the virus and we emphasize that more studies should be used for the application of FT-IR spectroscopy in the diagnosis of this infection and its application in the prevention of cervical cancer.

## 1. Introduction

The increase in the incidence of cervical cancer in Brazil, evidenced by the latest estimates published by the National Cancer Institute (INCA) is an epidemiological problem that has drawn the attention of the scientific community and health centers around the world [1,2]. This disorder is caused by the uncontrolled growth of genetically mutated cells that promote a clinical picture, often asymptomatic. In

addition to these alterations, the association of epigenetic factors that promote changes at a molecular level contribute to the lack of control of the cell cycle through interference in the most diverse signaling pathways [3]. Several studies have demonstrated the intrinsic relationship of neoplastic development in the uterine cervix with human papillomavirus (HPV) infection [4], which accounts for about 99.7% of diagnosed cases [5] and the types 16 and 18 are considered at higher oncogenic risk and responsible for about 70% of them [6]. This data

\* Corresponding author at: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, Avenida Shishima Hifumi 2911 - Urbanova, São José dos Campos, Brazil.

E-mail address: [rcanevari@univap.br](mailto:rcanevari@univap.br) (R. de Azevedo Canevari).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101592>

Received 9 July 2019; Received in revised form 21 October 2019; Accepted 24 October 2019

Available online 06 November 2019

1572-1000/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Become an Editorial Board Member

Register Here

(<http://www.eurekaselect.com/jms/ebm.php?param=CG>)

## BMS-CG-2020-3

Submission Type: Research Article

Title:

MICRONUCLEUS ANALYSIS AND FOURIER TRANSFORMED INFRARED SPECTROSCOPY AS SCREENING TESTS FOR HPV VIRUS DETECTION

Abstract:

[View Abstract](#)

Running Head Title:

Keyword: Micronucleus, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, HPV,women ,infections ,Early Diagnosis

Submitted Date: 2020-02-15



Funders:

### Author Details

First Name	Last Name	Email Address	Field of Expertise	ORCID	Affiliations	Action
Magda	Rogéria Pereira Viana	magdarogeria@hotmail.com	Mestra	0000-0003-3293-7095 ( <a href="https://orcid.org/0000-0003-3293-7095">https://orcid.org/0000-0003-3293-7095</a> )	<a href="#">Details</a>	<a href="#">associate</a>
Igor	Martins Alves Melo	igormartins74@gmail.com	Doutor	0000-0001-7823-4630 ( <a href="https://orcid.org/0000-0001-7823-4630">https://orcid.org/0000-0001-7823-4630</a> )	<a href="#">Details</a>	<a href="#">associate</a>
Nelson	Jorge Carvalho Batista	nelsonjcb@hotmail.com	Doutor	0000-0001-8326-1510 ( <a href="https://orcid.org/0000-0001-8326-1510">https://orcid.org/0000-0001-8326-1510</a> )	<a href="#">Details</a>	<a href="#">associate</a>
Leandro	José Raniero	Iraniero@univap.br	Doutor	0000-0002-1962-8346 ( <a href="https://orcid.org/0000-0002-1962-8346">https://orcid.org/0000-0002-1962-8346</a> )	<a href="#">Details</a>	<a href="#">associate</a>
Renata	de Azevedo Canevari	rcanevari@univap.br	Doutora	0000-0003-4375-3048 ( <a href="https://orcid.org/0000-0003-4375-3048">https://orcid.org/0000-0003-4375-3048</a> )	<a href="#">Details</a>	<a href="#">associate</a>

( [magdarogeria@hotmail.com](mailto:magdarogeria@hotmail.com) ) is a principal author for editorial correspondence.

### Files Details

Order	File Name	File Type	Upload Date	Uploaded By	
2	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2434076doutorado (1).pdf	Supplementary	2020-02-15	Magda Viana	
3	copyright_form.pdf	Copyright Letter	2020-02-15	Magda Viana	
4	artigo 2 MICRONUCLEUS14.02.2020.doc	Manuscript	2020-02-15	Magda Viana	

### Revision Emails

Revision	Subject	Sent on	Email

### QC Notes

DATE	TITLE	FILE ATTACHMENT	ACTION
<i>No Qc Notes</i>			