



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**COINFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E OUTRAS
INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM
AMOSTRAS CERVICAIS DE USUÁRIAS DA REDE SUS DE
SÃO LUÍS, MARANHÃO**

ANA PAULA ALMEIDA CUNHA

**São Luís - MA
2019**

ANA PAULA ALMEIDA CUNHA

Coinfecção por Papilomavírus Humano e outras infecções sexualmente transmissíveis em amostras cervicais de usuárias da rede SUS de São Luís, Maranhão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Saúde do Adulto, como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração:

Processos Biológicos em Saúde.

Linha de Pesquisa: HPV e Câncer; Doenças Infecciosas e Endêmicas no Maranhão.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal.

Coorientadora: Profa. Dra. Sally Cristina Moutinho Monteiro

Coordenadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Cunha, Ana Paula Almeida.

Coinfecção por Papilomavírus Humano e outras infecções sexualmente transmissíveis em amostras cervicais de usuárias da rede SUS de São Luís, Maranhão / Ana Paula Almeida Cunha. - 2019.

118 p.

Coorientador(a): Sally Cristina Moutinho Monteiro.

Orientador(a): Flávia Castello Branco Vidal.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, 2019.

1. Infecção sexualmente transmissíveis. 2. Papilomavírus Humano. 3. Rastreamento do câncer de colo do útero. I. Monteiro, Sally Cristina Moutinho. II. Vidal, Flávia Castello Branco. III. Título.

ANA PAULA ALMEIDA CUNHA

Coinfecção por Papilomavírus Humano e outras infecções sexualmente transmissíveis em amostras cervicais de usuárias da rede SUS de São Luís, Maranhão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: ____ / ____ / ____ .

Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Sally Cristina Moutinho Monteiro (Coorientadora)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

São Luís - MA
2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Benevenuto Cunha e Ana Maria Almeida, com todo o meu amor e gratidão a eles que são a minha fortaleza e fonte de inspiração na busca por dias melhores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ser a minha fonte infinita de fé e esperança de dias melhores.

Aos meus pais Ana Maria Costa de Almeida e Benevenuto João Borges Cunha, pelo amor incondicional e por serem o meu porto seguro em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Benevenuto Cunha Júnior, Wallyson Cunha e Victor Cunha, pela amizade e apoio, e a certeza de que estaremos sempre juntos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal, pelo esforço e dedicação em fornecer ensinamentos e orientações, pela paciência e pela dedicação que me concedeu ao longo deste trabalho.

A minha coorientadora Sally Cristina Moutinho Monteiro pela orientação, apoio, dedicação e por sua disponibilidade em todos os momentos desta pesquisa.

Ao Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão, em especial a Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito, a Profa. Dra. Maria Bethânia Costa Chein e a Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista, pelo suporte técnico fornecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Francisco Pedro Belfort Mendes, Gerusinete Rodrigues Bastos e Ilka Kassandra Belfort, por seu companheirismo ao longo de todas as etapas deste trabalho.

A todos os amigos da Turma 15 do PPGSAD, em especial as amigas Jhessica Ivanilde Silva Gomes e Anne Caroline Silva e Silva pela amizade e apoio nas longas horas de estudo.

Aos companheiros de laboratório, em especial a Lucas Henrique Costa, Mariele Borges, Pablo Monteiro, Renata Gaspar, pelo auxílio na coleta e realização dos experimentos.

As amigas da turma 2010.2 do curso de Ciências Biológicas da UFMA, em especial a Elaine dos Santos Piancó e Marta Regina de Castro Belfort, pela amizade e pelo conforto em momentos difíceis.

A todos os amigos e familiares que, direta ou indiretamente, me dedicaram um pouco de seu tempo e dedicação para me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Centro de Estudos Superiores (CESC) da Universidade Estadual do Maranhão

(UEMA), em especial ao Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga e a Profa. Dra. Claudene Barros, pelo auxílio e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Luisa Lina Villa pela contribuição na realização de procedimentos experimentais importantes para a concretização deste trabalho.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo fomento concedido à pesquisa.

“Deus disse: Basta-te a minha graça, porque é na fraqueza que se revela totalmente a minha força. Portanto, prefiro gloriar-me de minhas fraquezas, para que habite em mim a força de Cristo”.

2 Coríntios 9 – 10.

RESUMO

Introdução: O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado o agente etiológico do câncer cervical, presente em mais de 70% dos casos. Estudos indicam que a infecção persistente pelo HPV é facilitada pela presença de outras infecções sexualmente transmissíveis. Essa associação pode favorecer inflamação crônica local e contribuir para a progressão de lesões precursoras do câncer. Em vista disso, objetivou-se estudar a associação entre infecção por HPV e a presença de coinfeções (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*) em mulheres atendidas na Atenção Básica (Sistema único de Saúde) no estado do Maranhão. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo descritivo e transversal, com 353 mulheres participantes de programas de saúde da mulher de Unidades Básicas de Saúde no período de março de 2018 a março de 2019. Todas aceitaram participar do estudo mediante assinatura do TCLE e responderam questionário sociodemográfico. Foi realizado exame de citologia oncológica para detecção de alterações celulares no colo do útero. Esfregaço cervical foi obtido para realização de exames de biologia molecular para detecção do HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*. Para a identificação do DNA do HPV foi utilizada a técnica de PCR Nested, utilizando-se os primers PGMY09/11 e GP5+/GP6+. Para a identificação dos outros agentes sexualmente transmissíveis utilizou-se os primers: KL1/KL2 (*Chlamydia trachomatis*), TVA5/TVA6 (*Trichomonas vaginalis*) e HO1/HO3 (*Neisseria gonorrhoeae*). Amostras positivas para o DNA-HPV foram submetidas a sequenciamento automatizado para identificação do tipo viral. **Resultados:** O perfil foi de mulheres pardas (61,61%), entre 35-44 anos de idade (22,2%), com renda inferior a 1 salário mínimo (84,83%), escolaridade até o ensino médio (51,66%) e casadas/união estável (51,66%). Houve elevada prevalência do HPV (59,7%), sendo que destas 147 (69,6%) apresentaram infecção por HPV e outras ISTs, e 64 (30,3%) apresentaram infecção isolada por HPV. O HPV 16 foi mais prevalente nos dois grupos, entretanto tipos virais de alto risco foram predominantes em mulheres com coinfeções, enquanto tipos virais de baixo risco foram predominantes em mulheres com infecção isolada por HPV. Dentre as mulheres que apresentaram infecção por *T. vaginalis*, 73,5% apresentaram também o HPV, indicando associação estatisticamente significativa entre estes dois patógenos ($p < 0.05$). Predominou-se mulheres que não apresentaram lesões cervicais no exame citológico. Entretanto, as que possuíam lesão também apresentaram coinfeção por HPV e outra IST. **Conclusão:** Os achados sugerem que a presença da IST *T. vaginalis* pode favorecer a infecção por HPV. Essa associação HPV/IST pode favorecer o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais precursoras do câncer de colo de útero. Os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância da implementação de estratégias de prevenção de comportamentos de risco na população maranhense.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano. Infecção sexualmente transmissíveis. Rastreamento do câncer de colo do útero.

ABSTRACT

Introduction: Human papillomavirus (HPV) is considered the etiological agent of cervical cancer, present in more than 70% of cases. Studies show that persistent HPV infection is facilitated by the presence of other sexually transmitted infections. This association contributes to local chronic inflammation and to the progress of cancer precursor lesions. Thus, the objective of this study was to study the association between HPV infection and the presence of co-infections (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*) in women attending the Primary Health Care (Single Health System) in the state of Maranhão. **Material and methods:** This is a descriptive and cross-sectional study of 353 women who were participating in women's health programs at Basic Health Units in the period of March/2018 to March/2019. All women agreed to participate in the study by signing an informed consent form and answered a sociodemographic questionnaire. Participants underwent oncotic cytology examination to detect cellular changes in the cervix. After the exam, a cervical swab was collected to perform molecular biology tests for HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. HPV DNA was identified using the nested PCR technique using the PGMY09 / 11 and GP5 + / GP6 + primers. Primers KL1 / KL2 (*Chlamydia trachomatis*), TVA5 / TVA6 (*Trichomonas vaginalis*) and HO1 / HO3 (*Neisseria gonorrhoeae*) were used for the identification of other sexually transmitted agents. HPV positive samples were subjected to automated sequencing for viral type identification. **Results:** Profile of brown women (61.61%), between 35-44 years old (22.2%), with income below 1 minimum wage (84.83%), education through high school (51.66%) and married/stable union (51.66%). There was a high prevalence of HPV (59.7%), of which 147 (69.6%) had HPV infection and other STIs, and 64 (30.3%) had an only HPV infection. In women with *T. vaginalis* infection, 73.5% had HPV, indicating a statistically significant association between these two pathogens ($p < 0.05$). HPV 16 was more prevalent in both groups; however, high-risk viral types were predominant in women with co-infections, and low-risk viral types were predominant in women with HPV infection only. Women who did not present cervical lesions in the cytological exam were predominant. However, those with lesions also had HPV and other STI coinfection. **Conclusion:** These findings suggest that the presence of the STI *T. vaginalis* may favor HPV infection. This HPV/STI association can contribute to the development of cervical intraepithelial lesions precursor of cervical cancer. The results obtained in this study reinforce the importance of the implementation of risk behavior prevention strategies in the population of Maranhão.

Keywords: *Human Papillomavirus. Sexually Transmitted Infections. Cervical cancer screening.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC-H	<i>Atypical squamous cell of undetermined significance</i> (Célula escamosa atípica de significado indeterminado quando não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau)
ASC-US	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
BTMA	Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão
CCU	Câncer do colo do útero
CESC	Centro de Estudos Superiores de Caxias
CE	Corpos elementares
CR	Corpos reticulares
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
GENBANK	Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus humano)
HSIL	<i>High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau)
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer)
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região de Controle Longa)
LSIL	<i>Low-Risk Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intra-epitelial escamosa de baixo risco)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas).
OMS	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
ORF	<i>Open Reading Frames</i> (Quadros de leitura aberta)

PB	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pRB	Proteína do Retinoblastoma
ERA	Espécies reativas de oxigênio
SUS	Sistema Único de Saúde
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Genoma do HPV.....	19
Figura 2. Prevalência do HPV por faixa etária em mulheres com citologia normal no mundo.....	22
Figura 3. Prevalência de HPV por capital – resultados preliminares.	23
Figura 4. Padrão de expressão dos genes E6 e E7 de acordo com a progressão do câncer.....	25
Figura 5. Incidência de novos casos de ISTs (gonorreia, clamídia, sífilis e tricomoníase) por região mulheres entre 15 – 49 anos.	34
Figura 7. Fluxograma das participantes incluídas neste estudo. São Luís – Maranhão. 2017-2019.....	50
Figura 8. Prevalência do HPV e coinfeção por outras ISTs. São Luís/Maranhão. 2017-2019.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do HPV de acordo com o potencial oncogênico pela <i>International Agency for Research on Cancer</i>	21
Tabela 2. Sequências de primers utilizados para a reação de PCR Nested para a identificação do DNA do HPV.	45
Tabela 3. Sequências de primers utilizados para a reação de PCR Nested para a identificação do DNA de agentes sexualmente transmissíveis.	46
Tabela 4. Características sociodemográficas das participantes de acordo com a presença de HPV e ISTs. São Luís/Maranhão. 2017-2019.	51
Tabela 5. Associação entre a presença de HPV e coinfeção por <i>T.vaginalis</i> , <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> . São Luís/Maranhão. 2017-2019.	52
Tabela 6. Associação entre a infecção por HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis associadas. São Luís/Maranhão. 2017-2019.	53
Tabela 7. Tipos virais de HPV em mulheres com coinfeções HPV/ISTs e mulheres somente com HPV. São Luís/Maranhão. 2017-2019.	55
Tabela 8. Associação entre infecção por HPV e outras ISTs com a presença de lesões cervicais identificadas no exame preventivo. São Luís/Maranhão. 2017-2019.	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Papilomavírus Humano (HPV)	19
2.1.2 Classificação do HPV	20
2.1.3 Epidemiologia do HPV	21
2.1.4 HPV e a progressão de lesões cervicais e câncer	24
2.2 Infecções sexualmente transmissíveis (ISTs)	26
2.3 <i>Chlamydia trachomatis</i>	27
2.3.1 Biologia e ciclo de vida	27
2.3.2 Sintomas e diagnóstico.....	28
2.4 <i>Trichomonas vaginalis</i>	29
2.4.1 Biologia e ciclo de vida	29
2.4.2 Sintomas e diagnóstico.....	30
2.5 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31
2.5.1 Biologia e ciclo de vida	31
2.5.2 Sintomas e diagnóstico.....	33
2.6 Epidemiologia e Fatores de Risco associados a ISTs	33
2.7 HPV e outras ISTs na progressão de lesões precursoras do CCU	36
3. OBJETIVOS	40
3.1. Geral	40
3.2. Específicos	40
4. METODOLOGIA	41
4.1. Tipo de Estudo	41
4.2. Período e Local do estudo	41
4.3. Amostra	41
4.3.1. Critério de inclusão	42
4.3.2. Critério de exclusão	42
4.4 Instrumentos de coleta e avaliação de dados	42

4.4.1	Questionário sociodemográfico e de estilo de vida	42
4.4.2	Coleta de material biológico.....	43
4.4.3	Exame de citologia oncótica	43
4.5	Procedimentos experimentais	43
4.5.1	Extração do DNA	43
4.5.2	Quantificação de DNA e Nível de Pureza	44
4.5.3	Detecção do DNA do HPV por PCR Nested	44
4.5.4	Detecção de ISTs por PCR Convencional	46
4.5.5	Eletroforese em gel de agarose	47
4.5.6	Purificação de produtos de PCR para HPV.....	47
4.5.7	Genotipagem dos tipos de HPV	47
4.6	Análise estatística.....	48
4.7	Aspectos Éticos	48
5.	RESULTADOS	49
5.1	Características sociodemográficas e fatores de risco	49
5.2	Análise HPV e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs).....	52
5.3	Tipos de HPV e a presença de ISTs.....	54
5.4	Associação entre coinfeção por HPV/ISTs e lesões cervicais	55
6.	DISCUSSÃO.....	57
7.	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	APÊNDICES	77
	Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77
	Apêndice B: Questionário Sociodemográfico	80
	ANEXOS.....	83
	Anexo A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	83
	Anexo B: Artigo submetido na revista <i>BMC Infectious Disease</i>	92
	Anexo C: Normas da <i>BMC Infectious Disease</i> para submissão de artigo	109

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais prevalentes mundialmente, tanto em homens como em mulheres (MARTEL et al., 2017). Está associado ao desenvolvimento de doenças que vão desde verrugas benignas até o câncer invasivo (DOORBAR et al., 2016). Mais de 150 tipos de HPV já foram identificados e são classificados de acordo com o seu potencial oncogênico pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e Organização Mundial da Saúde (OMS).

Apesar da maioria dos casos de infecção por HPV serem assintomáticas e transientes, alguns tipos virais, de alto risco oncogênico, como o HPV 16 e 18, estão associados ao aumento no risco de desenvolvimento de câncer anogenital em homens e mulheres, incluindo o câncer do colo do útero e o câncer peniano (DE VILLIERS et al., 2004; ZUR HAUSEN, 2002). Entretanto, a infecção por HPV de alto risco não é causa suficiente para o seu desenvolvimento do processo carcinogênico. Outros fatores, tanto biológicos, comportamentais e ambientais, podem contribuir para a progressão do câncer (ZUR HAUSEN, 2009).

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) podem ser vírus, bactérias e outros microrganismos que são transmitidos, principalmente, pelo contato sexual (oral, vaginal ou anal). Estas infecções continuam representando um problema de saúde pública, com mais de 1 milhão de pessoas infectadas diariamente no mundo. Elas podem causar uma diversidade de sintomas em mulheres, e estão associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos sexualmente ativos (DEL PRETE et al., 2017).

Atualmente, tem-se estabelecido que o HPV de alto risco é considerado fator essencial, mas não suficiente para o desenvolvimento de lesões cervicais e câncer (DOORBAR, 2006). Entretanto, a relação entre a infecção por HPV e outros microrganismos exerce papel importante na progressão de lesões cervicais para o câncer (KONE et al., 2017). ISTs como *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae* estão entre os principais agentes, por favorecer inflamação crônica local e, associada a coinfeção por HPV, pode contribuir para a progressão

de lesões precursoras do câncer (ACHARYA PANDEY; KARMACHARYA, 2017; SSEDYABANE et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A inflamação crônica causada por estas coinfeções pode atuar como facilitador da carcinogênese cervical através do aumento de células inflamatórias no epitélio infectado (COMAR et al., 2017; KONE et al., 2017). O principal fator associado a presença de coinfeções é a inflamação crônica causada por estes microrganismos (DEIVENDRAN; MARZOOK; PILLAI, 2014). Assim, pode atuar como um promotor da carcinogênese por induzir a proliferação, o recrutamento de células inflamatórias, e posteriormente a danos no DNA e inibição da reparação do DNA (KONE et al., 2017; DEIVENDRAN; MARZOOK; PILLAI, 2014; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003). A presença de múltiplas infecções também pode impedir a eliminação da infecção por HPV e a reativação de infecções latentes, por dificultar a atividade do sistema imune na eliminação da infecção (MENEZES et al., 2018; PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016).

O Maranhão é o segundo estado com menor IDH (índice de desenvolvimento humano), apresentando condições socioeconômicas, educacionais e de saúde inferiores a outros estados do Brasil e elevadas taxas de infecção por HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis (PRETE et al., 2019; SERRANO et al., 2018). Além disso, é o estado com segunda maior prevalência de câncer de colo de útero, com um risco aproximado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2017).

Estudos sobre o HPV e a presença de outras ISTs vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de compreender a associação das mesmas no potencial de desenvolvimento de lesões cervicais precursoras do câncer de colo de útero. Dessa forma, buscou-se avaliar a associação entre infecção por HPV e a presença de coinfeções em mulheres atendidas na Atenção Básica (Sistema único de Saúde) no estado do Maranhão.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é um vírus não envelopado pertencente à família *Papillomaviridae*, apresenta dupla fita de DNA circular com 8.000pb e capsídeo icosaédrico de até 55nm (Figura 1) (ZUR HAUSEN, 1999). Seu genoma é composto por duas principais regiões, sendo elas: região aberta de leitura (do inglês, *Open Reading Frames* ou ORF), onde estão localizados os genes codificantes de proteínas; e a região longa controladora (do inglês, *Long Control Region* ou LCR), que representa cerca de 10% do genoma e atua na regulação da replicação viral (BURD, 2003). A estrutura do genoma viral demonstra similaridades entre os diferentes grupos de HPV.

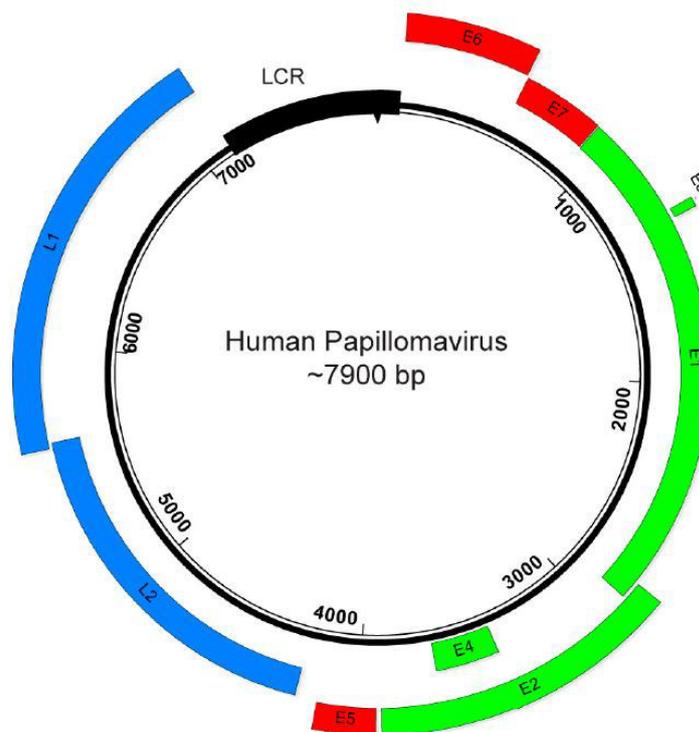


Figura 1. Genoma do HPV.

Fonte: SPURGEON; LAMBERT, 2017.

As ORFs são formadas por duas regiões, sendo elas: região E (E = *Early*, precoce) onde são encontrados os genes expressos na fase inicial do ciclo de vida do vírus e apresentam função regulatória, atuando sobre a persistência do genoma e a replicação do DNA viral (PINIDIS et al., 2016). A região L (L= *Late*, tardio), é composta por genes que são expressos no final do ciclo de vida do vírus (PINIDIS et al., 2016; SPURGEON; LAMBERT, 2017).

2.1.2 Classificação do HPV

Os Papilomavírus humanos são divididos em cinco gêneros e classificados de acordo com diferenças na sequência de DNA, devendo apresentar pelo menos 10% de diferenças entre os tipos (BANSAL; SINGH; RAI, 2016; FELLER et al., 2009). A região L1 é considerada a mais conservada e fornece as principais informações para a genotipagem do vírus. Os tipos de HPV que infectam humanos são classificados em Alfa, Beta, Gama, Nu e Mu, sendo os gêneros Alfa, Beta e Gama os grupos com maior número de tipos virais identificados (BURD, 2016; BURK et al., 2011).

Apesar de estarem divididos em diferentes gêneros, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou o HPV de acordo com seu potencial de desenvolver o câncer, podendo ser de baixo risco ou alto risco oncogênico. Mais de 200 genótipos do vírus foram identificados, entretanto, somente alguns estão associados a progressão do câncer (AWUA et al., 2017). Os principais tipos virais associados ao desenvolvimento de lesões anogenitais precursoras do câncer estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 1. Classificação do HPV de acordo com o potencial oncogênico pela *International Agency for Research on Cancer*.

Fonte: Adaptado de SERRANO et al., 2018.

Classificação	HPV
Alto Risco	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82.
Baixo Risco	HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89.
Risco Intermediário	HPV 26, 53 e 66.

Dentre os tipos de baixo risco estão o HPV 6 e 11, associados ao desenvolvimento de verrugas nas mãos e outras lesões papilomatosas, mas raramente encontrados em lesões malignas (GANGULY; PARIHAR, 2009; ZUR HAUSEN, 1999). Dentre os tipos de alto risco oncogênico, o HPV 16 e 18 estão associados a 99% dos casos de câncer do colo do útero (SERRANO et al., 2018; SONGOCK; KIM; BODILY, 2017; WENTZENSEN et al., 2016).

2.1.3 Epidemiologia do HPV

O Papilomavírus Humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns em todo o mundo, tanto em homens como em mulheres (MARTEL et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência do HPV chega a ser maior que 528.000 casos, sendo mais de 270.000 das mortes causadas pelo câncer do colo do útero (SERRANO et al., 2018).

A prevalência global do HPV em mulheres com citologia normal é estimada em 11,7% (IC 95%: 11.6 – 11.7), apesar de haver variações regionais significativas (SERRANO et al., 2018; BRUNI et al., 2017). Oceania e África apresentam maior prevalência de HPV, entretanto na maioria delas (70 – 90%) a infecção é assintomática, sendo eliminada em até 1 – 2 anos pelo próprio sistema imune (SERRANO et al., 2018).

Com relação a idade, a maior prevalência do HPV é observada em mulheres

com menos de 25 anos de idade mundialmente, com um declínio na prevalência em idades avançadas (SERRANO et al., 2018). Isto pode estar associado ao início da atividade sexual e ao comportamento sexual de risco, como o não uso do preservativo e o elevado número de parceiros, que pode favorecer o contato com o vírus.

Em regiões como Europa e as Américas, observa-se um declínio do HPV com o aumento da idade, ao contrário do que se observa na África Ocidental e América do Sul, onde ocorre um segundo pico de infecção em idades mais avançadas (a partir dos 35 anos de idade) (SERRANO et al., 2018) (Figura 2). O número reduzido de infecções em mulheres acima de 60 anos pode estar associado a diminuição da atividade sexual; entretanto, mudanças hormonais decorrentes da menopausa podem favorecer a reativação de infecções latentes ou, em casos de mulheres com vida sexual ativa, favorecer o contato com uma nova infecção (KASAMATSU et al., 2019; BRUNI et al., 2010). No Brasil, a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com citologia normal pode chegar a 55.4% (WENDLAND et al., 2018).

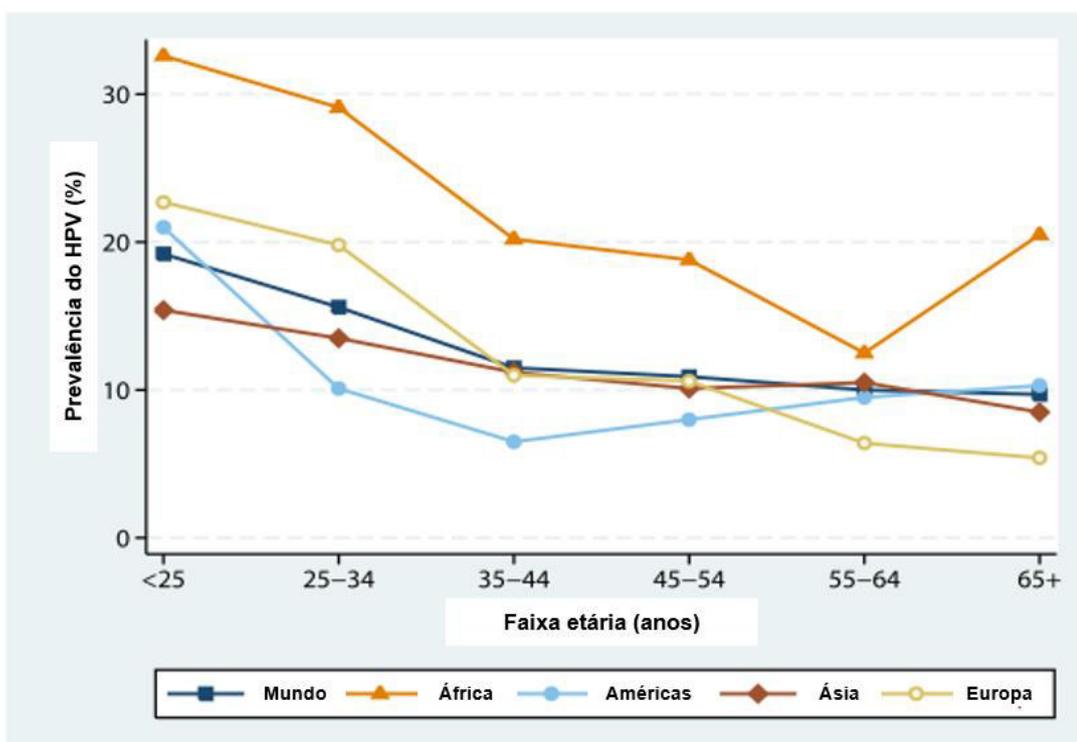


Figura 2. Prevalência do HPV por faixa etária em mulheres com citologia normal no mundo.

Fonte: SERRANO et al., 2018.

A prevalência do HPV tende a ser elevada de acordo com a severidade das lesões cervicais, visto que são causadas, principalmente, por infecções persistentes de alto risco oncogênico (BRUNI et al., 2010). Um estudo desenvolvido pelo ICO/IARC (*Information Centre on HPV and Cancer*) identificou a presença do HPV em 52.5% (51.6 - 53.3) de lesões ASCUS, 74.8% (74.3 - 75.3) em mulheres com lesões cervicais de baixo grau, e 88.9% (88.5 - 89.3) em mulheres com lesões cervicais de alto grau (WENDLAND et al., 2018). O estudo realizado por Brasil (2017) em 26 capitais brasileiras e o Distrito Federal buscou-se determinar a prevalência nacional da infecção pelo HPV e seus tipos no Brasil e nas diferentes regiões do país (Figura 3). Em todas as capitais analisadas, observou-se uma elevada prevalência do HPV, com uma prevalência nacional de 54,6%, sendo 38,4% destas infecções por HPV de alto risco oncogênico. A maior taxa de HPV foi identificado em Salvador (BA), com uma prevalência de 71,9% de casos positivos, seguido por Palmas (TO) com 61.8%, Cuiabá (MT) com 61.5% e Macapá (AM) com 61.3%. Em São Luís (MA), o HPV esteve presente em 59.1% dos indivíduos analisados, sendo que 38.6% destes apresentaram infecção por HPV de alto risco e 43.2% apresentaram infecções múltiplas (BRASIL, 2017).

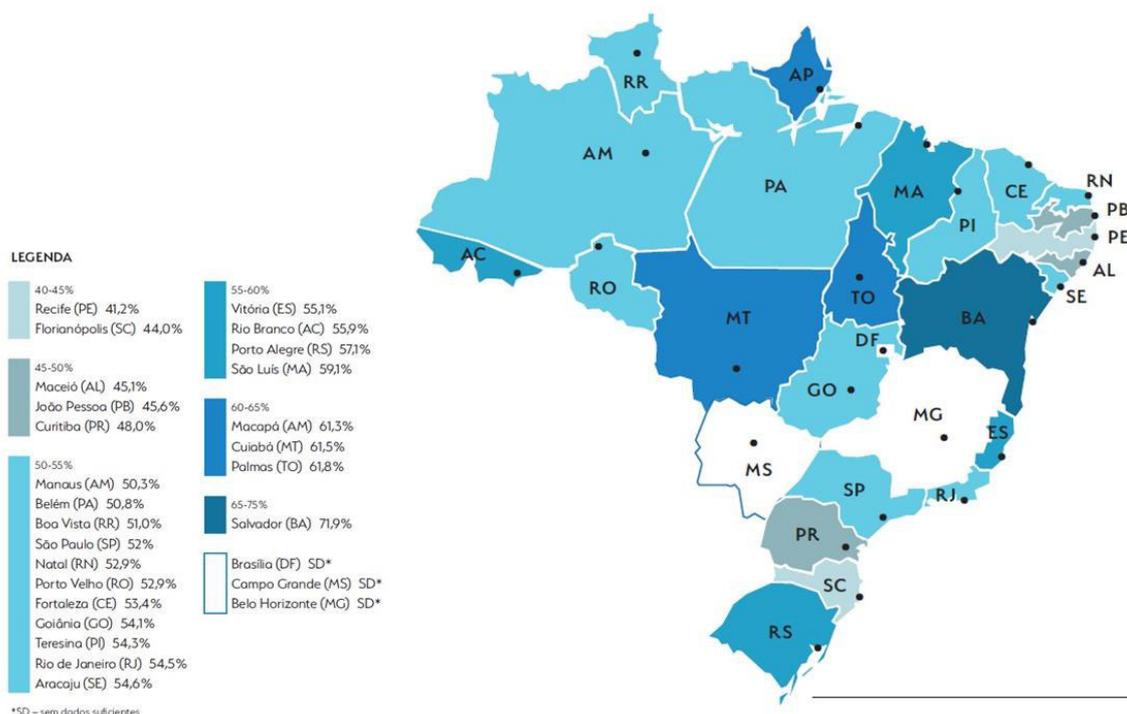


Figura 3. Prevalência de HPV por capital – resultados preliminares.

Fonte: BRASIL, 2017.

O HPV 16 é o tipo oncogênico mais prevalente no mundo em mulheres com citologia normal, seguido pelo HPV 18, HPV 52, HPV 31 e HPV 58, podendo haver variações na prevalência de acordo com a região analisada (PRETE et al., 2019; BRUNI et al., 2017). O mesmo padrão é observado em mulheres com lesões precursoras e o câncer do colo do útero, predominando os tipos HPV 16 e 18, confirmando o seu alto potencial oncogênico, comparado com outros tipos de HPV (MASROUR-ROUDSARI; EBRAHIMPOUR, 2017; VIDAL et al., 2016).

2.1.4 HPV e a progressão de lesões cervicais e câncer

O HPV possui tropismo por células epiteliais, infectando principalmente pele e mucosas (ZUR HAUSEN, 2002). Entretanto, ele precisa alcançar as células da camada basal do epitélio, pois são células menos diferenciadas e que ainda conseguem se proliferar (ZUR HAUSEN, 2002). O vírus atinge a camada basal a partir de microabrasões encontradas nessas células; uma vez dentro das células, o DNA viral é liberado do capsídeo e transportado até o núcleo para que seja replicado (HONG; LAIMINS, 2017). Estas células infectadas funcionam como um reservatório de infecção, com a permanência de várias cópias de DNA viral na forma episomal (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Essas células vão se dividindo, e as células filhas alcançam as camadas suprabasais do epitélio. Ao alcançar as células da camada suprabasal, inicia-se a fase proliferativa e a síntese proteica do vírus, onde o DNA viral continua a ser replicado (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

Após a maturação de células suprabasais, o ciclo do HPV passa a expressar os genes E6 e E7 (HONG; LAIMINS, 2017; GANGULY; PARIHAR, 2009). Eventualmente, os genes L1 e L2 passam a ser expressos e estão associados a produção de proteínas estruturais, que irão encapsular o genoma viral para formar novos vírions (DOORBAR, 2006). Assim, os vírus formados conseguem escapar das células epiteliais e iniciar um novo ciclo de infecção.

O mecanismo pelo qual o HPV leva a transformação maligna está associado tanto a carga viral, ao sítio e persistência da infecção, e a interação dos oncogenes virais E6 e E7 (Figura 4) (DOORBAR, 2016). Tais genes são considerados oncogenes por exercer diversas funções que contribuem para o processo de carcinogênese,

exercendo papel importante na proliferação celular, por atuar sobre fatores de regulação do ciclo celular (PINIDIS et al., 2016; DOORBAR et al., 2012). Estudos indicam que o gene E6 interage com a proteína p53, enquanto E7 interage com a pRB (retinoblastoma) para bloquear a ação dessas proteínas supressoras de tumor (ZUR HAUSEN, 2009).

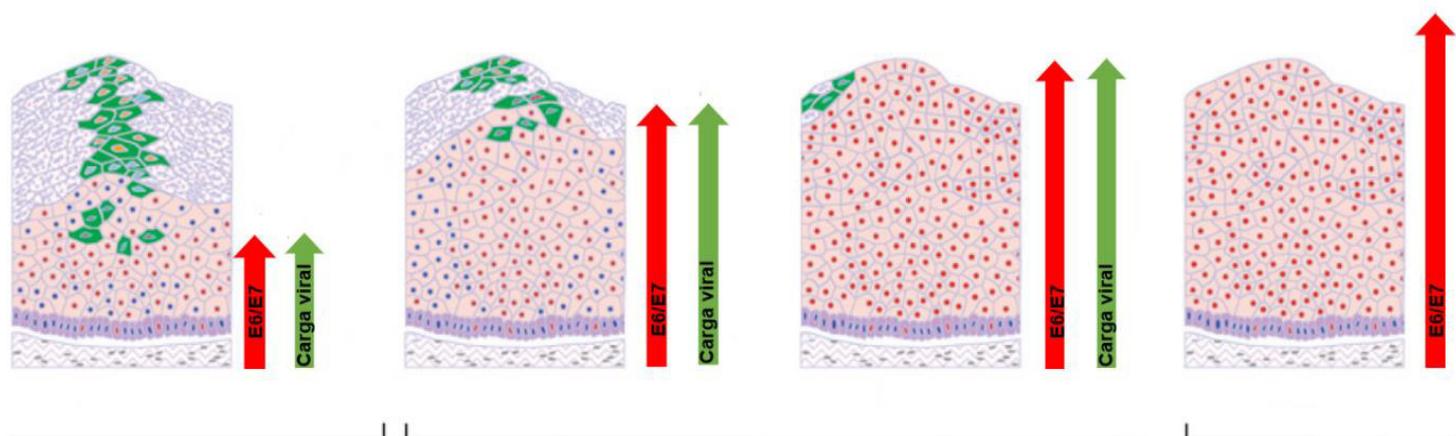


Figura 4. Padrão de expressão dos genes E6 e E7 de acordo com a progressão do câncer.

Fonte: Adaptado de DOORBAR, 2006.

Em lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau (LSIL) ocorre a replicação e produção de novos vírus. Os genes E6 e E7 são expressos e estimulam o início do ciclo celular, mas não a proliferação celular, nas camadas epiteliais superiores, mantendo a amplificação do genoma viral em menores concentrações (DOORBAR et al., 2012).

Em infecções por tipos virais de alto risco oncogênico, a expressão de E6 e E7 estimulam o ciclo celular e a proliferação de células em todas as camadas de células infectadas, capazes de progredir rapidamente para lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) (DOORBAR et al., 2012). Essas lesões, quando não tratadas, podem levar a progressão para o câncer invasivo e está associado a integração do DNA do HPV no genoma da célula do hospedeiro, e a subsequente super regulação dos oncogenes virais E6 e E7 (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Tipos virais como HPV 16 e 18, quando encontrados de forma integrada ao genoma do hospedeiro, estão associados a presença de lesões de alto grau e ao câncer invasivo; quando o DNA

viral se encontra na forma epissomal, as lesões são geralmente de baixo grau (DOORBAR et al., 2012; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

2.2 Infecções sexualmente transmissíveis (ISTs)

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) são microrganismos transmitidos, principalmente, pelo contato sexual (oral, vaginal ou anal). Estas infecções continuam representando um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (GININDZA et al., 2017). Elas podem causar uma diversidade de sintomas em mulheres, e estão associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos sexualmente ativos (DEL PRETE et al., 2017).

Existem mais de 30 tipos diferentes de agentes sexualmente transmissíveis incluindo bactérias, vírus e parasitas (GIMENES *et al.*, 2014; WOHLMEISTER *et al.*, 2016). Dentre as principais ISTs estão: infecções causadas por bactérias (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e sífilis); infecções parasitárias (*T. vaginalis*) e; infecção viral (HPV - papilomavírus humano, HIV – vírus da imunodeficiência adquirida, herpes e hepatite B) (SSEDYABANE et al., 2019).

Várias ferramentas e intervenções de prevenção de ISTs estão disponíveis há anos, mas em algumas regiões, principalmente países em desenvolvimento, os recursos são escassos e apresentam barreiras na aplicação das mesmas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Testes diagnósticos precisos para a detecção de ISTs são amplamente utilizados em países desenvolvidos, como Estados Unidos e Canadá, tanto para o diagnóstico como para o tratamento de infecções assintomáticas. Em países em desenvolvimento, como Brasil e países da África, dificuldades como infraestrutura inadequada e ausência de mão-de-obra qualificada ainda são encontradas. Além disso, algumas vezes o teste está acessível, mas possui elevado custo, tornando-se inacessível para a população de baixa renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

2.3 *Chlamydia trachomatis*

2.3 1 Biologia e ciclo de vida

A *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Chlamydiaceae* (BEBEAR; BARBEYRAC, 2009). É uma bactéria intracelular obrigatória, dependendo do aparato energético da célula hospedeira para o desenvolvimento do seu ciclo biológico. Apresenta um ciclo de vida complexo e um período longo de latência (mais de 30 dias) (BUDAI, 2007). Ela infecta células epiteliais humanas do trato genital e ocular, atuando no desenvolvimento de distúrbios celulares, incluindo lesões cervicais. Cerca de 19 sorotipos já foram descritos. Dentre os principais, os sorotipos que vão de D até K (incluindo Da, Ga e Ia) estão relacionados a infecções urogenitais, e os sorotipos A, B, Ba e C estão relacionados ao tracoma ocular (BEBEAR; BARBEYRAC, 2009).

A *C. trachomatis* apresenta ciclo de vida bifásico de reprodução, adaptável tanto ao ambiente extracelular quanto ao intracelular, com a formação dos corpúsculos elementares (CE) e dos corpúsculos reticulares (CR). Os CE representam a forma extracelular infectante, responsável pela invasão de células epiteliais (BANHART et al., 2017). Os CR são considerados como forma intracelular metabólica ativa, replicante e não infecciosa da bactéria, responsáveis pela cronicidade e persistência da infecção no epitélio infectado (BANHART et al., 2017).

O ciclo de vida se inicia com a aderência e invasão célula hospedeira pelos corpos elementares (CE). Após a aderência, os CEs são endocitados, formando um endossoma/inclusão no citoplasma, mantendo-se protegidos dos lisossomos (BEBEAR; BARBEYRAC, 2009). Entre 6 e 8 horas após a infecção, estes CEs aumentam de tamanho (de 3 μ para 5 μ), se reorganizam e se tornam metabolicamente ativos na forma de CRs; a partir daí, os CRs iniciam sua replicação por divisão binária exponencial, utilizando os metabólitos da célula hospedeira (BANHART et al., 2017). O pico de replicação ocorre em, aproximadamente, 18 a 24 horas. Em seguida, os CRs retornam a forma de CE, gerando vacúolos dentro do citoplasma. Quando estes vacúolos substituem praticamente todo o citoplasma da célula infectada, ocorre a lise

da mesma, com a liberação de CE infectantes para o meio celular, dando início a um novo ciclo de infecção (BANHART et al., 2017).

2.3.2 Sintomas e diagnóstico

A infecção por *C. trachomatis* é assintomática em até 50% e 70% dos homens e mulheres infectados, respectivamente (DEL PRETE et al., 2017). Os sinais e sintomas de infecção aparecem com cerca de 6 a 15 dias de incubação, sendo o foco principal os órgãos genitais inferiores, principalmente a endocérvice uterina (NALDINI et al., 2019).

A não realização do diagnóstico e a falta de tratamento adequado pode permitir a ascensão da bactéria, comprometendo órgãos genitais superiores. Dessa forma, as manifestações clínicas são variáveis, podendo apresentar corrimento vaginal, disúria e sangramento após relações sexuais (CORTINA et al., 2016). A infecção ascendente pode resultar em salpingite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica e infertilidade (YAN et al., 2019; BEBEAR; BARBEYRAC, 2009).

Em gestantes, a infecção pode causar parto prematuro, baixo peso ao nascer, óbito neonatal e doença inflamatória pélvica pós-parto (BEBEAR; BARBEYRAC, 2009). Em homens, os sintomas incluem disúria e corrimento uretral após 7 a 21 dias de incubação, mas não existem evidências de casos de infertilidade masculina associado a infecção por *C. trachomatis* (YAN et al., 2019).

É comum a recorrência da infecção, principalmente em indivíduos que se infectam antes dos 20 anos de idade, com o desenvolvimento de imunidade parcialmente protetora (BEBEAR; BARBEYRAC, 2009). Episódios subsequentes de infecção aumentam as chances de sequelas e aumentam o risco de contrair a infecção pelo HIV (DREYER, 2018).

Várias técnicas têm sido utilizadas para o diagnóstico de *C. trachomatis*. Atualmente, mesmo com os avanços do diagnóstico laboratorial, estes são de difícil execução e têm aplicação limitada. Dentre os principais métodos utilizados estão a cultura, o exame sorológico por imunofluorescência direta, a sonda de DNA e as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NALDINI et al., 2019).

2.4 *Trichomonas vaginalis*

2.4.1 Biologia e ciclo de vida

O *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) é um protozoário pertencente à família *Trichomonadidae*. Sua transmissão é essencialmente por via sexual, apesar de alguns estudos reportarem casos raros de transmissão via fomites (EDWARDS et al., 2014). É um organismo anaeróbico facultativo parasita do trato genital humano, com média de comprimento e largura de 10 e 7 μm , respectivamente. Apresenta forma alongada, ovóide ou piriforme; não apresenta estágio cístico em seu ciclo de vida, apresentando apenas forma de trofozoíto e sua multiplicação ocorre por divisão binária (MERCER; JOHNSON, 2018). Cresce bem na ausência de oxigênio na faixa de pH entre 5,0 e 6,5 e em temperaturas entre 20°C e 40°C (MERCER; JOHNSON, 2018).

Apresenta cinco flagelos, quatro localizados na porção anterior e o quinto incorporado a membrana ondulante do parasito e apoiado por uma estrutura denominada costa não contrátil, permitindo a mobilidade; também podem formar pseudópodes que são utilizados para capturar alimentos e atacar células epiteliais vaginais. (MERCER; JOHNSON, 2018). *T. vaginalis* possui habilidade de transitar entre a forma amebóide e flagelada a depender da disponibilidade de suprimentos alimentares, que são ingeridos por fagocitose (EDWARDS et al., 2014). A capacidade de *T. vaginalis* de se apresentar em formas variáveis permite que o parasito se preserve durante alterações que podem ocorrer no ambiente vaginal e por conseguir armazenar glicogênio como forma de energia (EDWARDS et al., 2014). Estudos também indicam que a maior patogenicidade de *T. vaginalis* está associada a forma amebóide devido a elevada toxicidade causada pelo citoesqueleto de actina (NORENHAG et al., 2019). O ciclo de vida deste parasita é simples, com o trofozoíto se dividindo por fissão binária, formando uma população no lúmen, na superfície da mucosa e no trato genital humano (NORENHAG et al., 2019).

A atividade de *T. vaginalis* está diretamente associada ao aumento do pH vaginal, considerado pH ótimo entre 6,0 e 6,3 (GRAVES et al., 2019). A internalização do parasita corre através da interação entre componentes associados a superfície

celular do hospedeiro e componentes encontrados nas secreções vaginal e uretral (GRAVES et al., 2019; EDWARDS et al., 2014). O parasita se adere as células hospedeiras, com a liberação de citotoxinas na superfície da mucosa e desempenham papel na adesão e multiplicação do parasito; logo, dão origem a colônias que reiniciam o ciclo de infecção (GRAVES et al., 2019; NORENHAG et al., 2019). O período de incubação de *T. vaginalis* varia entre 3 e 20 dias (EDWARDS et al., 2014).

2.4.2 Sintomas e diagnóstico

Cerca de 75% das mulheres portadoras de *T. vaginalis* não apresentam sinais clínicos de infecção e pode passar por fase de remissão espontânea. Ela apresenta uma variedade de manifestações clínicas. Em mulheres que apresentam sintomas, eles podem variar desde corrimento vaginal abundante, odor, prurido, disúria, dispareunia e inflamação vaginal severa (vaginite) (GRAVES et al., 2019).

T. vaginalis também está associado a condições mais sérias como a doença inflamatória pélvica, parto prematuro e baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas. Em homens pode causar uretrites e prostatites, mas a infecção é geralmente assintomática, favorecendo o subdiagnóstico e a propagação desse patógeno (GRAVES et al., 2019). A infecção por *T. vaginalis* também tem sido associada a condições mais sérias, como o câncer de próstata, câncer do colo do útero e um aumento no risco de infecção por HIV (BRISTOW et al., 2017; GININDZA et al., 2017).

A patologia da *T. vaginalis* resulta em dano ao epitélio, causado através da modificação da microbiota vaginal, resultando em vaginose bacteriana, contribuindo para o aumento dos sintomas da infecção (GRAVES et al., 2019); também pode sofrer influência da microbiota comensal e simbiotes associados, que podem contribuir para o aumento dos distúrbios no epitélio infectado (BRISTOW et al., 2017). A infecção por *T. vaginalis* promove uma resposta imune celular agressiva, causada pela resposta inflamatória no epitélio vaginal e da uretra nos homens. Com isso, ocorre o enfraquecimento da integridade da barreira epitelial, facilitando a entrada de outros microrganismos como HPV e HIV (GININDZA et al., 2017). Além disso, a tricomoníase

está diretamente associada a displasias e metaplasias identificadas em exames citopatológicos (NORENHAG et al., 2019).

Tendo em vista o elevado número de infecções assintomáticas e os sintomas se assemelharem ao observado em outras infecções sexualmente transmissíveis, os exames laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico de *T. vaginalis*. Dentre os principais métodos utilizados estão: a cultura de secreção; a observação microscópica de secreção vaginal e; técnicas moleculares com a reação em cadeia da polimerase (PCR) (GRAVES et al., 2019; GININDZA et al., 2017).

2.5 *Neisseria gonorrhoeae*

2.5.1 Biologia e ciclo de vida

A *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) é o agente etiológico da gonorreia, uma infecção altamente contagiosa e de transmissão por via quase exclusivamente sexual. É uma bactéria cocácea gram-negativa pertencente à família *Neisseriaceae* (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). O gênero *Neisseria* apresenta cerca de 11 espécies associadas a humanos, mas somente duas são patogênicas: *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (FERNANDES et al., 2018).

É considerado um patógeno humano obrigatório, colonizando o trato genital de homens e mulheres, mas também pode ser encontrado na mucosa orofaríngea e colorretal (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Apresenta período de incubação geralmente de 2 a 5 dias e o período de transmissibilidade pode durar de meses a anos se o paciente não for tratado (FERNANDES et al., 2018).

N. gonorrhoeae apresenta morfologia de coco com extremidades adjacentes e frequentemente encontram-se em número par (diplococos), são não flagelados, não formadores de esporos, aeróbios, com diâmetro entre 0,6 a 1,0⁶ μ (STEVENS; CRISS, 2017). Crescem a partir da presença de certa percentagem de CO₂ (3-7%) e com temperaturas de incubação entre 35°C e 37°C (STEVENS; CRISS, 2017). *N. gonorrhoeae* possui capacidade de modular os antígenos de superfície com elevada

rapidez; essa variação de superfície dificulta o desenvolvimento de vacina eficaz contra esse patógeno (FERNANDES et al., 2018).

N. gonorrhoeae possui afinidade às células da uretra e colunares da endocérvice. Para que a adesão a essas células ocorra, o microrganismo deve resistir à remoção mecânica pelo fluxo urinário e da secreção cervical (FERNANDES et al., 2018). A replicação de *N. gonorrhoeae* está associada a estruturas envolvidas na adesão ao epitélio do hospedeiro. Os *pili*, ou fímbrias, exercem papel importante na adesão gonocócica ao epitélio do trato genital inferior do hospedeiro (STEVENS; CRISS, 2017). A movimentação do *pili* confere capacidade de invasão ao epitélio e aquisição de material genético endógeno; estas estruturas estão relacionadas tanto com a motilidade, como a transformação, aderência e sinalização celular (FERNANDES et al., 2018; STEVENS; CRISS, 2017).

A ausência de *pili* impede a formação de colônias gonocócicas, pois o principal mecanismo de agregação das mesmas é por meio do contato *pili-pili* (FERNANDES et al., 2018). Dessa forma, influencia diretamente na perda da infectividade de *N. gonorrhoeae* sobre as células do hospedeiro (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Após a adesão as células do hospedeiro, o microrganismo inicia seu processo de invasão tecidual pelo processo de transcitose mediada pelas proteínas Opas (STEVENS; CRISS, 2017; UNEMO; SHAFER, 2014). Dessa forma, a infecção consegue atingir células intraepiteliais, onde será reconhecido pelas células inflamatórias e ativando a liberação de fator de necrose tumoral (TNF-alfa). A liberação desse mediador leva a apoptose de células epiteliais, levando a formação de lesão tecidual local (FERNANDES et al., 2018). Assim, instala-se um processo infeccioso local.

N. gonorrhoeae demonstra uma grande capacidade de desenvolver resistência a antimicrobianos. Isto se deve a habilidade deste patógeno em alterar o seu material genético, uma vez que é capaz de realizar transformação durante todo o seu ciclo de vida e, também pode ter seu genoma alterado por mutações (FERNANDES et al., 2018; UNEMO; SHAFER, 2014). Essa grande plasticidade genética desse microrganismo contribui para a aquisição de genes que atuam sobre sítios-alvos de antimicrobianos e, com isso, adquiriram mecanismos fisiológicos conhecidos de resistência a antimicrobianos recomendados e utilizados para o tratamento deste patógeno (FERNANDES et al., 2018; STEVENS; CRISS, 2017).

2.5.2 Sintomas e diagnóstico

Os sintomas associados a infecção por *N. gonorrhoeae* são decorrentes da inflamação dos epitélios uretrais e endocervicais. Em mulheres a infecção é essencialmente assintomática, visto que o corrimento endocervical é frequentemente interpretado como corrimento vaginal inespecífico (FERNANDES et al., 2018). Outros sintomas incluem cervicite, uretrite e disúria (STEVENS; CRISS, 2017).

O não reconhecimento e a demora no início do tratamento pode levar a evolução para quadros mais graves como doença inflamatória pélvica, infertilidade e infecção gonocócica disseminada (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Na gravidez, *N. gonorrhoeae* está associado a um risco elevado de aborto espontâneo, parto prematuro e mortalidade fetal; a conjuntivite gonocócica do recém-nascido também é comumente relatada, transmitido de mães infectadas (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

No homem, os sintomas mais frequentes são a uretrite aguda, corrimento uretral e disúria. Entretanto, a maioria dos casos de uretrite gonocócica não tratada evolui para cura espontânea em algumas semanas (COSTA-LOURENÇO et al., 2017; STEVENS; CRISS, 2017). Uma porcentagem menor de homens é assintomática, não apresentando sinais de uretrite (FERNANDES et al., 2018).

Os critérios laboratoriais recomendados pela Organização Mundial de Saúde para confirmação do agente etiológico são o isolamento em cultura de diplococos Gram-negativo ou a detecção de DNA específico de *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas pela técnica de amplificação de ácidos nucleicos (FERNANDES et al., 2018).

2.6 Epidemiologia e Fatores de Risco associados a ISTs

Estima-se que um milhão de infecções sexualmente transmissíveis sejam adquiridas por dia no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde. Embora sejam tratáveis, as infecções por *C. trachomatis*, *T. pallidum*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae* são responsáveis por 357 milhões de novos casos de IST anualmente

no mundo, com cerca de 64 milhões de casos ocorrendo nas Américas e 128 milhões no Sudoeste da Ásia. O impacto destas IST tende a ser elevado em regiões de baixo índice socioeconômico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Em 2012, a prevalência global estimada de clamídia, gonorreia e tricomoníase em mulheres entre 15 e 49 anos foi de 4,2%, 0,8% e 0,5%, respectivamente. Juntas, estas infecções podem chegar a mais de 190 milhões de casos no mundo (GININDZA et al., 2017). Dentre os 357 milhões de casos de ISTs mundialmente, 131 milhões são por *C. trachomatis*, 78 milhões são por *N. gonorrhoeae* e 143 milhões são por *T. vaginalis* (LIMA et al., 2018; NEWMAN et al., 2015).

As ISTs representam uma epidemia global, mas apresentam variações regionais significativas (Figura 5). As maiores incidências se concentram na região africana e na região das Américas. Em todas as regiões, a incidência estimada de clamídia e tricomoníase foi maior do que a de gonorreia ou sífilis. Esta elevada incidência pode estar associada a maior parte destas infecções por estes microrganismos serem assintomáticas e se manterem sem tratamento por longos períodos, contribuindo para a transmissão destes patógenos (MENEZES et al., 2018).

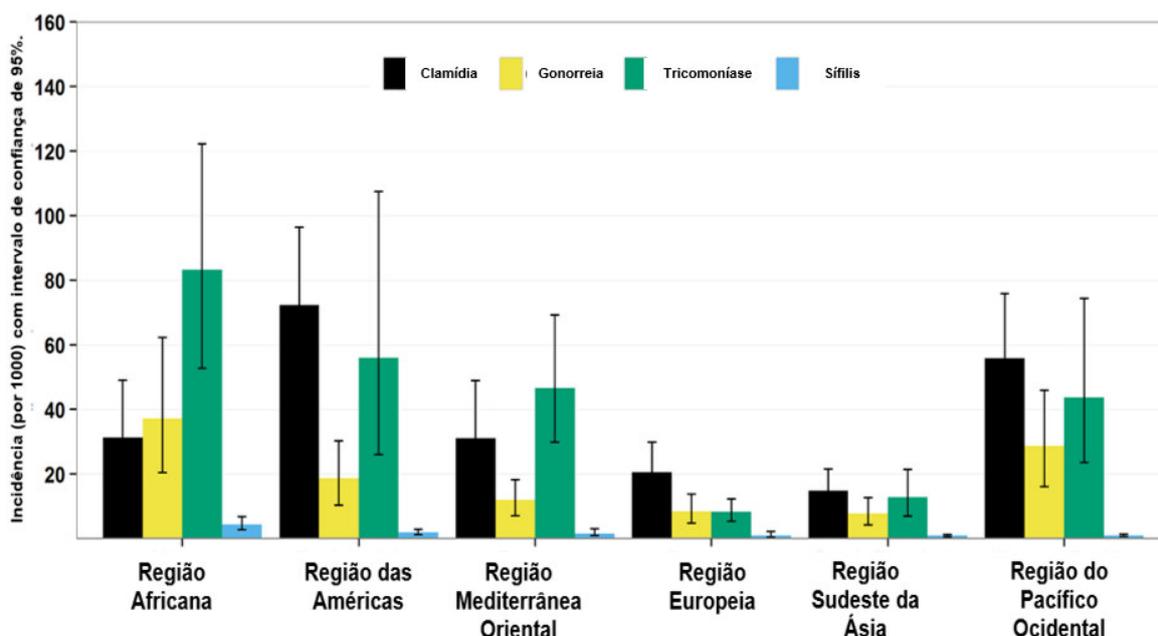


Figura 5. Incidência de novos casos de ISTs (gonorreia, clamídia, sífilis e tricomoníase) por região mulheres entre 15 – 49 anos.

Fonte: Adaptado de Newmann et al., 2015.

Dentre as infecções bacterianas, o primeiro lugar é ocupado pela *C. trachomatis*, em segundo lugar está a infecção por *N. gonorrhoeae*. A infecção por *T. vaginalis* é considerada a infecção não viral mais comum, com uma prevalência global de 170 milhões de casos, número superior ao número de gonorreia, sífilis e clamídia somados (GININDZA et al., 2017). No Brasil, as infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* não são de notificação compulsória, o que dificulta a mensuração desses agravos. As únicas IST que fazem parte da lista nacional de doenças de notificação compulsória são a infecção pelo HIV e a sífilis.

Em virtude das diferenças nos sistemas de vigilância e nos métodos de diagnóstico utilizados, além da proporção de infecções assintomáticas, a incidência assume taxas distintas dependendo da população estudada, observando-se maior incidência de infecção na população mais jovem. Diversos fatores de risco e indicadores estão associados com diferentes taxas de prevalência de ISTs, incluindo sexo, idade, características geográficas, pertencimento a grupos vulneráveis, comportamento sexual de risco e fatores biológicos e epidemiológicos (PILLAY et al., 2018).

Observa-se uma relação estreita entre a idade e a infecção por ISTs, com maiores taxas em mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 25 anos (MIRALPEIX et al., 2019; SALFA; SULIGOI, 2015). Mulheres entre 15 e 25 anos apresentam risco elevado de infecção por agentes sexualmente transmissíveis, devido a comportamentos de risco adotados por indivíduos nesta faixa etária (GININDZA et al., 2017). Dentre eles estão: número de parceiros sexuais, uso de camisinha, preferência sexual, e mobilidade populacional (TADELE; HUSSEN; SHIMELIS, 2019).

Fatores econômicos e culturais também podem estar associados a infecção por ISTs, como a falta de conhecimento sobre saúde sexual e a busca tardia por serviços de saúde, contribuindo para a permanência da infecção e a transmissão para outros parceiros sexuais (PILLAY et al., 2018). Regiões de baixo nível socioeconômico, onde o acesso aos serviços de saúde é precário, contribuem para a manutenção deste cenário (MUSSELWHITE et al., 2016).

Mulheres profissionais do sexo apresentam risco elevado por apresentarem vulnerabilidade social e fatores associados ao trabalho exercido, como o número elevado de parceiros, uso inconsistente de preservativo e histórico prévio de ISTs

(TADELE; HUSSEN; SHIMELIS, 2019). Além destes, mulheres deste grupo podem fazer uso de drogas ilícitas que contribuem para a prática sexual desprotegida e pela dificuldade no acesso aos serviços de saúde (PILLAY et al., 2018). O comportamento sexual de risco também favorece a reinfecção por ISTs, com taxas de 10 a 30% de reinfecção em adolescentes jovens com múltiplos parceiros sexuais (MENON et al., 2015).

A maioria das ISTs apresentam maior prevalência no sexo feminino e devem estar associadas às características anatômicas que favorecem a persistência das ISTs, como a presença do epitélio colunar no colo do útero e a microbiota vaginal favorecer o crescimento de patógenos (MENON et al., 2016a). O uso de contraceptivos orais também pode levar a mudanças na superfície do endométrio, tornando-o mais suscetível a infecções sexualmente transmissíveis (MENON et al., 2016a).

2.7 HPV e outras ISTs na progressão de lesões precursoras do CCU

As lesões intraepiteliais cervicais estão associadas a múltiplos fatores, sendo o Papilomavírus Humano (HPV) considerado o principal agente de progressão do câncer do colo do útero (ZUR HAUSEN, 2009; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Atualmente, tem-se estabelecido que o HPV de alto risco é considerado fator essencial, mas não suficiente para o desenvolvimento de lesões cervicais e câncer (DOORBAR, 2006). Outros fatores endógenos e exógenos atuam juntamente com o vírus, aumentando o risco de progressão para o câncer de colo de útero (RIBEIRO et al., 2015; SCHABATH et al., 2012; SICHERO et al., 2007).

O exame citopatológico continua sendo a principal estratégia para o rastreamento do câncer de colo de útero. Este teste é considerado um exame capaz de reduzir em até 50% as taxas de mortalidade, quando o realizado de forma correta e com cobertura populacional adequada, com taxas de três mortes para cada 100 mil mulheres por ano (LEW et al., 2017). Já em países com cobertura superior a 70%, essa taxa pode chegar a 2 mortes por 100 mil mulheres por ano. No Brasil, a reduzida cobertura da população alvo, que são mulheres entre 25 e 64 anos que já iniciaram a

vida sexual, contribui para as elevadas taxas de morte por câncer de colo de útero, com um risco estimado de 15,43 mulheres para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015). Em países desenvolvidos, como no Canadá e Austrália, o teste molecular para a detecção do HPV é o principal exame de rastreio utilizando e, aliado a elevada cobertura da vacinação contra o HPV, tem reduzido as taxas de incidência de verrugas genitais e de lesões precursoras do câncer de colo de útero (LEW et al., 2017).

Mais de 90% das mulheres com câncer de colo de útero também apresentam a infecção por HPV. Fatores como tipo viral, persistência e integração do DNA viral são importantes fatores (ROSILLON et al., 2019; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003; MARTINS et al., 2016). Coinfecções entre HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis também tem demonstrado interferir na evolução natural de lesões cervicais causadas pelo vírus (MENEZES et al., 2018; KONE et al., 2017). Estudos também indicam que anormalidades citológicas ocorrem com maior frequência em mulheres com microbiota vaginal anormal, quando comparados com mulheres com microbiota normal (CORTINA et al., 2016).

Especificamente, as infecções *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae* estão entre os principais agentes associados a coinfeção por HPV (ACHARYA PANDEY; KARMACHARYA, 2017; SSEDYABANE et al., 2019). O principal fator associado a presença de coinfeções é a inflamação crônica causada por estes microrganismos (DEIVENDRAN; MARZOOK; PILLAI, 2014). De acordo com alguns estudos, a inflamação pode atuar como um promotor da carcinogênese por induzir a proliferação, o recrutamento de células inflamatórias, e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERA), que pode levar a danos no DNA e inibição da reparação do DNA (KONE et al., 2017; DEIVENDRAN; MARZOOK; PILLAI, 2014; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

Estas alterações causadas pelo processo inflamatório induzido pelas ISTs torna o epitélio cervical mais susceptível a mutações pela ativação de oncogenes, inativação de proteínas supressoras de tumor, com pRB e p53, facilitando a ação do HPV na indução de lesões (KONE et al., 2017). A presença de múltiplas infecções também pode impedir a eliminação da infecção por HPV e a reativação de infecções latentes, por dificultar a atividade do sistema imune na eliminação da infecção (MENEZES et al., 2018; PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016).

A infecção por *C. trachomatis* parece atuar em sinergismo com o HPV,

umentando o risco de desenvolvimento do câncer. O estudo de Naldini et al., (2019) sugere que HPV e *C. trachomatis* atuam como cofatores recíprocos; a infecção por *C. trachomatis* ou o histórico previo de infecção por este microrganismos estavam positivamente associados ao HPV, ou seja, mulheres com *C. trachomatis* apresentaram risco elevado de infecção por HPV de alto risco em mulheres até 36 anos de idade. Resultado semelhante foi observado por Abreu et al., (2016), que evidenciou que a coinfeção por HPV de alto risco e *C. trachomatis* exibiu um risco cinco vezes maior de desenvolver lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL). Estes estudos suportam a hipótese de que este microrganismo facilita o acesso do HPV a camada basal do epitélio ao induzir a inflamação, a hipertrofia cervical e a metaplasia. Estes efeitos podem aumentar o risco de transformação das células cervicais e a persistência da infecção por tipos de HPV de alto risco oncogênico (NALDINI et al., 2019; KONE et al., 2017; DEIVENDRAN; MARZOOK; PILLAI, 2014).

De modo semelhante, o processo inflamatório causado por *T. vaginalis* está associado a um aumento no risco de lesão intraepitelial cervical. Hipotetiza-se que este patógeno produza nitrosaminas que causam inflamação. Com isso, o epitélio cervical sofre rupturas que permitem a penetração do HPV na camada basal do epitélio (MERCER; JOHNSON, 2018; LAZENBY et al., 2014).

A vaginose causada por *T. vaginalis* leva a redução dos fluidos vaginais pela liberação de enzimas líticas liberadas por este microrganismo, que leva a diminuição da camada de muco protetor da parede da vagina. Isto pode levar a microabrasões no epitélio, aumentando a virulência e entrada do HPV, promovendo a integração do DNA viral na célula infectada (MERCER; JOHNSON, 2018; SUTTON et al., 2007). Estudos também reportam que a incidência de lesões cervicais aumentam na presença de *T. vaginalis*, apesar da dificuldade de identificação no exame citológico (MENON et al., 2016a ; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003). O estudo de Kone et al., (2019) observou uma forte associação entre a coinfeção por HPV e *T. vaginalis* e lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL).

Coinfecções por HPV de alto risco e *N. gonorrhoeae* também apresentam risco aumentado de lesões intraepiteliais cervicais, principalmente ASC-US e HSIL (DISCACCIATI et al., 2015). A possibilidade deste microrganismo e o HPV atuar de modo sinérgico no desenvolvimento de lesões cervicais é possível, visto que apresenta elevada prevalência mundial e por também levar ao desenvolvimento de

cervicites (SUTTON et al., 2007). Dessa forma, o mecanismo é semelhante ao de *C. trachomatis*, ou seja, o processo inflamatório induzido por este patógeno pode favorecer a persistência e progressão de lesões mediadas por HPV no epitélio cervical (NALDINI et al., 2019; SUTTON et al., 2007).

Assim, evidencia-se que estas infecções sexualmente transmissíveis podem ajudar o HPV a desenvolver lesões cervicais. Entretanto, novos estudos precisam ser desenvolvidos no intuito de compreender o real impacto que cada microrganismo desempenha no processo carcinogênico quando associado a infecção pelo HPV.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a associação entre HPV e os agentes sexualmente transmissíveis, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis*, em mulheres atendidas em Unidades Básicas de Saúde (UBS) de São Luís, Maranhão.

3.2. Específicos

- Descrever as características sociodemográficas das participantes;
- Identificar a presença de fatores de risco para a infecção pelo HPV e outras ISTs;
- Avaliar a prevalência do HPV, bem como os tipos mais prevalentes;
- Correlacionar a presença de coinfeções sexualmente transmissíveis com a presença do HPV;
- Avaliar a associação entre a infecção por HPV e outras ISTs com a presença de lesões cervicais.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, analítico e transversal.

4.2. Período e Local do estudo

O estudo foi realizado nas Unidades Básicas de Saúde do Distrito Coroadinho, localizado na região urbana de São Luís - MA. Estão incluídas: Unidade Mista do Coroadinho, Unidade de Saúde Familiar João Paulo, Centro de Saúde Carlos Macieira, Centro de Saúde Nossa Senhora de Fátima, Centro de Saúde J. A. Farina e Unidade de Saúde Familiar Antônio Guanaré.

Os procedimentos experimentais foram realizados no Banco de Tumores e DNA do Maranhão do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (BTMA – HUUFMA) e no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão localizado no Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC - UEMA) durante o período de março/2018 a março/2019.

4.3. Amostra

Participaram do estudo 353 mulheres participantes de programas de saúde da mulher em Unidades Básicas de Saúde de São Luís – MA (Figura 6). A amostra foi obtida de forma não aleatória por livre demanda.

As participantes foram categorizadas em dois grupos: somente HPV, que incluíram as mulheres que apresentaram infecção isolada por HPV; e o grupo

HPV/ISTs, que incluíram mulheres que apresentaram HPV associada a outras infecções sexualmente transmissíveis avaliadas, sendo elas *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae*.

4.3.1. Critério de inclusão

Foram incluídas mulheres maiores de 18 anos, usuárias da Atenção Básica do Sistema Único de Saúde (SUS) de São Luís, que iniciaram atividade sexual há mais de 6 meses e que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4.3.2. Critério de exclusão

Foram excluídas mulheres previamente tratadas para patologia cervical, em uso de medicação vaginal nos três dias anteriores à consulta, gestantes ou puérperas com menos de 42 dias após parto, ou submetidas à histerectomia.

4.4 Instrumentos de coleta e avaliação de dados

4.4.1 Questionário sociodemográfico e de estilo de vida

Todas as participantes responderam questionário para obtenção de características sociodemográficas e possíveis fatores de risco para a infecção pelo HPV e outras ISTs (Apêndice B).

4.4.2 Coleta de material biológico

Foi realizada coleta de swab cervical para a realização de exames de biologia molecular para detecção do papiloma vírus humano, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis*. As amostras foram coletadas da região da endocérvice, utilizando escova estéril presente no kit *hc2 DNA Collection Device* (QIAGEN, Valencia, CA).

4.4.3 Exame de citologia oncótica

As participantes realizaram exame de citologia oncótica para detecção de alterações celulares no colo do útero. Esfregaço citológico foi obtido com espátula de Ayres (amostra ectocervical) e escova endocervical (amostra endocervical), estendidos em lâmina de vidro, fixados com etanol e corados pela técnica de Papanicolau. Os resultados foram relatados usando o 2001 *Bethesda Reporting System*.

4.5 Procedimentos experimentais

4.5.1 Extração do DNA

A extração foi realizada a partir de swab cervical utilizando-se o kit *Dneasy Blood and Tissue* (QIAGEN Ltda, UK), seguindo protocolo descrito pelo manual de uso do fabricante. A extração baseou-se no princípio da afinidade do DNA por membrana de sílica. O processo é realizado em quatro etapas: 1) lise celular, onde ocorre o rompimento celular e liberação dos ácidos nucleicos; 2) ligação seletiva do DNA em membrana de sílica; 3) lavagem para a remoção de restos celulares e impurezas residuais e; 4) remoção do DNA da membrana de sílica e obtenção do DNA puro.

4.5.2 Quantificação de DNA e Nível de Pureza

O DNA extraído foi quantificado através da leitura de absorvância em espectrofotômetro *Nanovue* (GE) utilizando comprimento onda igual a 260nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280nm, para a detecção de eventual contaminação da amostra por proteínas. Quando as relações entre as densidades ópticas, A260/A280, foi entre 1,6 e 1,9 o material foi considerado adequado.

4.5.3 Detecção do DNA do HPV por PCR Nested

Para a identificação do DNA do HPV foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do tipo Nested, utilizando o termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Califórnia, USA). A técnica consiste na amplificação do DNA de interesse em dois rounds e utilizando *primers* específicos para cada round (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O primeiro *round* utiliza os *primers* PGMY 09 e 11, amplificando sequências de 450pb da região L1 do DNA viral; no segundo *round* são utilizados os *primers* GP+5 e GP+6, que amplificam sequências de 190pb da região L1 do DNA viral (Tabela 2) (VIDAL *et al.*, 2016). Como controle positivo da reação, utilizou-se amostras sabidamente positivas para HPV e, como controle negativo, foi utilizada água ultra pura. Para minimizar a possibilidade de contaminação externa, as reações foram preparadas em capela de fluxo laminar exposta a luz ultravioleta por aproximadamente 15 minutos.

Para a reação de amplificação utilizando os *primers* PGMY09/11, a desnaturação inicial ocorreu por 2 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95°C, 40 segundos de anelamento a 55°C, 40 segundos de extensão a 72°C. A reação consistiu em um volume final de 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer*, tampão de reação 10X contendo 1 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 10 mM de dNTP, 1 U de *Taq Polimerase Platinum* (*Invitrogen*) e 100 ng de DNA genômico (COUTLÉE *et al.*, 2002).

Tabela 2. Sequências de primers utilizados para a reação de PCR Nested para a identificação do DNA do HPV.

Fonte: Adaptado COUtlÉE et al, 2002

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	
PGMY11	PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
	PGMY11-B	GCG CAG GGC CAT AAT AAT GG
	PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
	PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
	PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09	PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-Ia	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
	PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
	PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
	PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
	PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
	PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
	PGMY09-Pa	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
	PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
	PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
	HMB01b	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
	GP+5/6	GP+5
GP+6		GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C

O segundo *round* da reação de PCR Nested foi realizado com os *primers* GP5+/GP6+ com uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 40°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da reação obteve-se 25 µL de volume, contendo 10 pmol de cada *primer*, tampão de reação 10X, 1mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 10 Mm de dNTP, 2U de *Taq Polimerase Platinum* (Invitrogen), água miliQ e 100 ng de DNA genômico (COUtlÉE et al., 2002).

4.5.4 Detecção de ISTs por PCR Convencional

Para detecção dos agentes sexualmente transmissíveis *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis* o DNA foi amplificado através de PCR convencional utilizando *primers* específicos para cada agente, de acordo com a Tabela 3. Para a reação de amplificação utilizou-se o kit PCR *SuperMix* Brasil (Thermofisher, BR). A reação consistiu em um volume final de 50 μ L, sendo 41 μ L de *Supermix*, 10 pmol de cada primer e 100 ng de DNA genômico. Os ciclos de amplificação variaram de acordo com o *primer* utilizado.

Para amplificação de *T. vaginalis*, a reação ocorreu com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 47°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Para amplificação de *C. trachomatis*, a reação ocorreu com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Para amplificação de *N. gonorrhoeae*, a reação ocorreu com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 3. Sequências de primers utilizados para a reação de PCR Nested para a identificação do DNA de agentes sexualmente transmissíveis.

Fonte: Adaptado de AMORIM et al., 2017.

<i>Primer</i>	Sequência	Pares de bases	T. anelamento	Nº Ciclo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	KL1 - 5' TCCGGAGCGAGTTACGAAGA 3'	241	55°C	35
	KL2 - 5' ATTCAATGCCCGGGATTGGT 3'			
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TVA5 - 5' GATCATGTTCTATCTTTTCA 3'	102	47°C	45
	TVA6 - 5' GATCACCACCTTAGTTTACA 3'			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HO1 - 5' GCTACGCATACCCGCGTTGC 3'	390	55°C	40
	HO3 - 5' CGAAGACG1TCGAGCAGACA 3'			

4.5.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR, tanto para HPV como para os agentes *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis* foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. Uma alíquota de 5µL de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento (Sigma-Aldrich, USA) e corante 0,1% de *Gel Red*, sendo toda a mistura aplicada no gel. A eletroforese foi realizada por 60 minutos a 100 V/cm² em cuba horizontal (Life Technologies, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (BIO-RAD Laboratories, EUA).

4.5.6 Purificação de produtos de PCR para HPV

Os produtos de PCR, positivos para HPV, foram purificados com o kit *Genelute PCR Clean up kit* de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, USA). A cada microtubo foram adicionados 500 µL de tampão de captura a 100 µL de produto de PCR.

4.5.7 Genotipagem dos tipos de HPV

A determinação dos genótipos do HPV foi realizada por sequenciamento, a partir do produto da PCR purificado, utilizando o sequenciador ABI 3500 (*Life Technologies, Califórnia, EUA*).

O sequenciamento foi realizado através do método de Sanger, utilizando-se o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados, em cada reação, 2 µL do produto de PCR purificado, 40ng dos oligonucleotídeos específicos para a região do gene viral L1 (senso ou antisenso) e 2 µL de *Big Dye*.

Para a análise e alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas no

sequenciamento foi utilizado o programa Chromas, obtendo-se eletroferogramas de sequências de DNA do HPV presentes nas amostras. Para a confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada a comparação das sequências nucleotídicas das amostras sequenciadas, submetendo-as ao Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – Gene Bank, utilizando o programa BLAST (NCBI).

4.6 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva utilizando o programa IBM® SPSS *version 25*, sendo os dados apresentados na forma de figuras e tabelas.

Utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade dos dados; em seguida, utilizou-se os testes χ^2 (Qui-quadrado) ou Exato de Fisher para avaliar a associação entre a infecção por HPV e a presença de coinfeções por outros agentes sexualmente transmissíveis e lesões cervicais (IC: 95%), sendo considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$.

4.7 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEP-UFMA), sob Parecer Consubstanciado nº 2.392.728 (ANEXO A). Ressalta-se que foi garantido o sigilo, a confiabilidade e a dignidade dos sujeitos da pesquisa, bem como garantida sua autonomia e a defesa de sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 466/12.

5. RESULTADOS

5.1 Características sociodemográficas e fatores de risco

A população do estudo foi composta por 353 mulheres, atendidas em Unidades Básicas de Saúde (Figura 7). Dentre estas, 211 mulheres (59,7%) apresentaram infecção por HPV, sendo que destas 147 (69,6%) exibiram infecção por HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis (IST) e 64 (30,3%) tinham somente a infecção por HPV. No que concerne as mulheres que exibiram coinfeções, houve prevalência de 1 infecção associada ao HPV (Figura 7).

O perfil apresentado foi de mulheres autodeclaradas de cor parda (61,61%), na faixa etária de 35 a 44 anos de idade (22,2%), com renda inferior a um salário mínimo (84,83%), com escolaridade até o ensino médio completo ou incompleto (51,66%) e com companheiro (51,66%) (Tabela 4).

Com relação aos hábitos de vida e fatores de risco associados a ISTs, apresentado na tabela 4, predominou-se mulheres que reportaram ser não tabagistas (70,14%), terem tido a primeira menstruação antes dos 15 anos de idade (54,98%), a primeira relação sexual após os 15 anos de idade (64,45%), não fazer uso de camisinha durante a relação sexual (64,45%), apresentar até 3 parceiros sexuais durante a vida (61,14%), ausência de casos de ISTs prévias (81,04%) e já terem filhos (84,83%).

Também avaliou-se a associação entre variáveis sociodemográficas e de fatores de risco em mulheres que apresentaram infecção única por HPV e mulheres que apresentaram HPV e coinfeções. Não foi encontrado diferenças de idade em relação a mulheres que apresentaram somente HPV ou coinfeções. Similarmente, características sociodemográficas e associadas a fatores de risco foram semelhantes entre os dois grupos, não havendo associação significativa entre estas variáveis ($p < 0.05$).

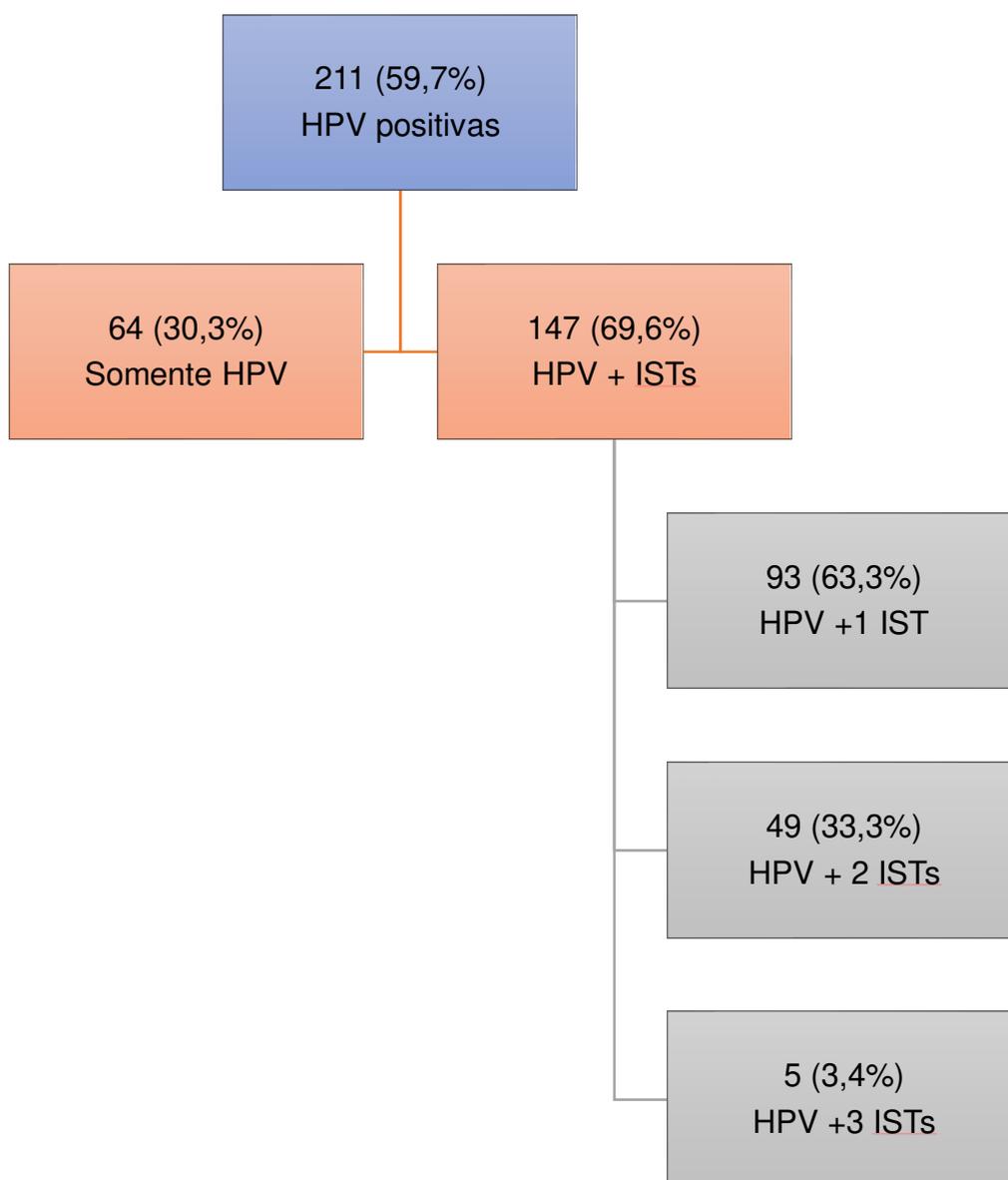


Figura 6. Fluxograma das participantes incluídas neste estudo. São Luís – Maranhão. 2017-2019.

HPV: Papilomavírus Humano; ISTs: infecções sexualmente transmissíveis. Dados apresentados em número e porcentagem.

Tabela 4. Características sociodemográficas das participantes de acordo com a presença de HPV e ISTs. São Luís/Maranhão. 2017-2019.

Variáveis	Total (N = 211)		Somente HPV (N = 64)		HPV/ISTs (N = 147)		P- valor	
	N	%	N	%	N	%		
Idade	< 25 anos	41	19,43	11	17,19	30	20,41	0.7741
	25 – 34 anos	41	19,43	10	15,63	31	21,09	
	35 – 44 anos	47	22,27	17	26,56	30	20,41	
	45 – 54 anos	39	18,48	12	18,75	27	18,37	
	≥ 55 anos	43	20,38	14	21,88	29	19,73	
Renda mensal	< 1 salário	179	84,83	53	82,81	126	85,71	0.5890
	> 1 salário	32	15,17	11	17,19	21	14,29	
Escolaridade	Fundamental completo/incompleto	73	34,60	18	28,13	55	37,41	0.4949
	Médio completo/incompleto	109	51,66	38	59,38	71	48,30	
	Superior completo/incompleto	23	10,90	6	9,38	17	11,56	
	Analfabeta	6	2,84	2	3,13	4	2,72	
Cor	Branca	15	7,11	5	7,81	10	6,80	0.9122
	Parda	130	61,61	38	59,38	92	62,59	
	Preta	64	30,33	20	31,25	44	29,93	
	Amarela	2	0,95	1	1,56	1	0,68	
Estado conjugal	Com companheiro	109	51,66	28	43,75	81	55,10	0.1299
	Sem companheiro	102	48,34	36	56,25	66	44,90	
Menarca	Antes dos 13 anos de idade	116	54,98	38	59,38	78	53,06	0.3967
	Depois dos 13 anos de idade	95	45,02	26	40,63	69	46,94	
Sexarca	Antes dos 15 anos de idade	75	35,55	20	31,25	55	37,41	0.3897
	Depois dos 15 anos de idade	136	64,45	44	68,75	92	62,59	
Uso de camisinha	Sim	75	35,55	24	37,50	51	34,69	0.6954
	Não	136	64,45	40	62,50	96	65,31	
Número de parceiros	Até 3	129	61,14	38	59,38	91	61,90	0.7289
	> 3	82	38,86	26	40,63	56	38,10	
IST prévia	Sim	40	18,96	12	18,75	28	19,05	0.9595
	Não	171	81,04	52	81,25	119	80,95	
Gestações	Sim	179	84,83	54	84,38	125	85,03	0.9023
	Não	32	15,17	10	15,63	22	14,97	
Uso de tabaco	Sim	18	8,53	3	4,69	15	10,20	0.2056
	Não	148	70,14	50	78,13	98	66,67	
	Ex-fumante	45	21,33	11	17,19	34	23,13	

HPV: *Papilomavírus Humano*; IST: Infecções sexualmente transmissíveis. Dados apresentados em número e porcentagem. Foram aplicados os testes χ^2 (Qui-quadrado) ou Exato de Fisher (IC: 95%), sendo considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$.

5.2 Análise HPV e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs)

Com relação a presença do HPV e das infecções sexualmente transmissíveis *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis*, observou-se que, entre as que apresentaram infecção por *T. vaginalis*, 73,5% também apresentaram infecção por HPV, indicando associação estatisticamente significativa entre estes dois microrganismos ($p < 0.005$) (Tabela 5).

Entre as que apresentaram infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, também observou-se elevada prevalência do HPV, com 57,2% e 64,5%, respectivamente. Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa.

Tabela 5. Associação entre a presença de HPV e coinfeção por *T.vaginalis*, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. São Luís/Maranhão. 2017-2019.

IST	HPV		Total	P-valor
	Positivo	Negativo		
<i>C. trachomatis</i>	67	50	117	0.4980
	57,26%	42,74%		
<i>T. vaginalis</i>	78	28	106	0.0005
	73,58%	26,42%		
<i>N. gonorrhoeae</i>	62	34	96	0.2600
	64,58%	35,42%		

HPV: *Papilomavírus Humano*; IST: Infecções sexualmente transmissíveis. Dados apresentados em número e porcentagem. Foram aplicados os testes χ^2 (Qui-quadrado) ou Exato de Fisher (IC: 95%), sendo considerado estatisticamente significante os valores de $p \leq 0,05$.

Também buscou-se avaliar a presença do HPV e sua correlação com a presença de uma, duas ou três infecções secundárias (Tabela 6). Observou-se que, dentre as mulheres que apresentaram HPV e coinfeções, o HPV estava associado a uma (63,3%) ou a duas infecções secundárias (33,3%) ($p < 0.05$).

Tabela 6. Associação entre a infecção por HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis associadas. São Luís/Maranhão. 2017-2019.

N = 147	n	%	P-valor
HPV + 1 IST	93	63,3	0,002
HPV + 2 ISTs	49	33,3	0,004
HPV + 3 ISTs	5	3,4	0,400

HPV: *Papilomavírus Humano*; IST: Infecções sexualmente transmissíveis. Dados apresentados em número e porcentagem. Foram aplicados os testes χ^2 (Qui-quadrado) ou Exato de Fisher (IC: 95%), sendo considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$.

Dentre as participantes que apresentaram HPV e coinfeções (69,6%), observou-se maior prevalência de mulheres com HPV e *T. vaginalis* (17,54%), seguido por HPV e *N. gonorrhoeae* (14,22%) e HPV e *C. trachomatis* (11,85%), como observado na Figura 8.

Entre as que apresentaram HPV associada a duas infecções secundárias, predominou-se HPV + *C. trachomatis* + *T. vaginalis* (10,9%) e HPV + *C. trachomatis* + *N. gonorrhoeae* (6,6%). A infecção por HPV associada a três infecções secundárias foi identificada em 5 mulheres (2,37%).



Figura 7. Prevalência do HPV e coinfeção por outras ISTs. São Luís/Maranhão. 2017-2019.

HPV: *Papilomavírus Humano*; ISTs: C.T: *Chlamydia trachomatis*; T.V.: *Trichomonas vaginalis*; N.G.: *Neisseria gonorrhoeae*. Dados apresentados em porcentagem.

5.3 Tipos de HPV e a presença de ISTs

Com relação aos tipos virais encontrados entre as participantes, observou-se elevada prevalência do HPV 16 (14,69%), classificado como de alto risco oncogênico, tanto em mulheres com infecção única por HPV como naquelas com coinfeção HPV/ISTs. Entretanto, observa-se uma variação entre a segunda posição nos dois grupos (Tabela 7).

Entre as que apresentaram somente o HPV, predominou-se o HPV 16 (15,6%), seguido pelo HPV 11 (14,06%) e outros tipos virais de baixo risco oncogênico (12,50%). Entre as participantes que apresentaram HPV e coinfeção, também predominou-se o HPV 16 (14,2%), porém seguido pelo HPV 18 (6,8%) e outros tipos virais de alto risco oncogênico (13,6%). O HPV 11 também apresentou elevada prevalência neste grupo (11,6%), assim como outros tipos de baixo risco oncogênico (8,1%).

Entre as que apresentaram somente HPV, o tipo viral foi indeterminado em 21 delas (32,81%). Entre as que apresentaram HPV e coinfeções, o tipo viral foi indeterminado em 51 (34,69%) mulheres.

Tabela 7. Tipos virais de HPV em mulheres com coinfeções HPV/ISTs e mulheres somente com HPV. São Luís/Maranhão. 2017-2019.

Classificação Viral	HPV		HPV/ISTs	
	n	%	n	%
HPV 16	10	15,63	21	14,29
HPV 18	2	3,13	10	6,80
Outros HPV AR	5	7,81	20	13,61
HPV 6	2	3,13	2	1,36
HPV 11	9	14,06	17	11,56
Outros HPV BR	8	12,50	12	8,16
Risco Intermediário	7	10,94	14	9,52
Indeterminado	21	32,81	51	34,69
Total	64	100,00	147	100,00

HPV: *Papilomavírus Humano*; HPV BR: Outros *Papilomavírus Humano* de baixo risco oncogênico; HPV AR: Outros *Papilomavírus Humano* de alto risco oncogênico; IST: Infecções sexualmente transmissíveis. Dados apresentados em número e porcentagem.

5.4 Associação entre coinfeção por HPV/ISTs e lesões cervicais

Com relação as lesões cervicais identificadas no exame preventivo, predominou-se mulheres não apresentaram lesões cervicais precursoras do câncer de colo do útero, tanto entre as que apresentaram somente o HPV (96,88%) como entre as que apresentaram HPV e coinfeção (91,16%) (Tabela 8).

Tabela 8. Associação entre infecção por HPV e outras ISTs com a presença de lesões cervicais identificadas no exame preventivo. São Luís/Maranhão. 2017-2019.

Lesão cervical	Total		Somente HPV		HPV/IST	
	N	%	N	%	N	%
Não	196	92,89	62	96,88	134	91,16
Sim	15	7,11	2	3,13	13	8,84
Total	211	100	64	100	147	100
Tipo de lesão						
LSIL	6	2,84	2	3,13	4	2,72
HSIL	1	0,47	0	0,00	1	0,68
ASC-US	5	2,37	0	0,00	5	3,40
ASC-H	3	1,42	0	0,00	3	2,04

HPV: *Papilomavírus Humano*; IST: Infecções sexualmente transmissíveis. Dados apresentados em número e porcentagem; LSIL: Lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau; ASC-US: células atípicas de significado indeterminado; ASC-H: células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau. Dados apresentados em número e porcentagem. Foram aplicados os testes χ^2 (Qui-quadrado) ou Exato de Fisher (IC: 95%) para a presença ou ausência de lesões cervicais e a associação com infecção por HPV/ISTs, sendo considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$, obtendo-se p-valor de 0.245.

Apesar do reduzido número de lesões cervicais entre as participantes do estudo, observou-se que o maior número de lesões foram reportadas em mulheres que apresentaram HPV e coinfeções. Entre as lesões presentes neste grupo estão: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US, 3,4%), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL, 2,7%) e células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau (ASC-H, 2,0%). Entre as que apresentaram apenas o HPV, foi identificada apenas LSIL (3,13%).

6. DISCUSSÃO

O Papilomavírus Humano (HPV), bem como infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) como *T. vaginalis*, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* causam grande impacto na saúde pública e individual, podendo afetar tanto o aspecto sexual, como social e econômico. No presente estudo realizado no município de São Luís – MA, foi detectada uma elevada prevalência do HPV e *T. vaginalis* em mulheres usuárias do sistema público de saúde.

Neste estudo, o perfil foi de mulheres entre 21 e 40 anos de idade, com companheiro, autodeclaradas pardas, com escolaridade até o ensino médio e renda familiar inferior a um salário mínimo. Fatores associados ao comportamento sexual como apresentar parceiro fixo, ter tido menos de 3 parceiros sexuais durante a vida, início da atividade sexual antes dos 15 anos de idade, não uso de camisinha e ausência de ISTs prévias também foram reportados. As características sociodemográficas e de fatores de risco para ISTs foram semelhantes tanto para mulheres que apresentaram infecção única por HPV, como para mulheres que apresentaram HPV e coinfeções. A região Nordeste, principalmente o Estado do Maranhão, apresenta baixos índices socioeconômicos, contribuindo para as elevadas taxas de câncer cervical e infecções sexualmente transmissíveis nesta população (PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016).

Mulheres com atividade sexual irregular, como solteiras, viúvas, divorciadas que mantêm relação sexual ocasional, apresentam menor risco de aquisição de ISTs e desenvolvimento de lesões cervicais comparadas com mulheres em relações sexuais estáveis, como casadas ou em união estável (AMORIM et al., 2017; BOSCH; QIAO; CASTELLSAGUÉ, 2006). Uma possível explicação é que muitos parceiros não utilizam camisinha em relações sexuais extraconjugais, aumentando o risco de infecção e transmissão para as parceiras. No presente estudo, foi observado maior prevalência de mulheres com companheiro fixo e que reportaram não utilizar camisinha, tanto em mulheres somente com HPV, como em mulheres com coinfeções. Este dado pode ter contribuído para o elevado número de HPV e ISTs nesta população (GININDZA et al., 2017).

O início precoce da atividade sexual e possuir mais de três parceiros sexuais

durante a vida também são fatores que contribuem para a aquisição de ISTs, por levar o indivíduo a ter contato precoce com estes microrganismos e favorecer a incubação e transmissão para os parceiros sexuais, por serem geralmente assintomáticas (RIBEIRO et al., 2015). Em mulheres jovens, o epitélio cervical imaturo e a variabilidade na composição da microbiota vaginal também são cofatores para a aquisição de ISTs (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018; DOORBAR, 2018).

Neste estudo, apesar do predomínio de mulheres entre 21- 40 anos nos dois grupos, observa-se uma distribuição semelhante entre as outras faixas etárias. O pico de infecção por HPV ocorre principalmente em mulheres de até 25 anos de idade que iniciaram a atividade sexual. Isto pode estar associado a presença de fatores comportamentais que favorecem a infecção por ISTs, como o não uso de camisinha, nesta faixa etária. Todavia, o número de casos de HPV também pode ser elevado em mulheres acima de 40 anos de idade. Isto pode estar associado a presença de infecção latente adquirida na juventude e reativada devido a diminuição da resposta imune ou associada a novas infecções devido a continuação da vida sexual após o início da menopausa (SERRANO et al., 2018). A prevalência do HPV é menor em mulheres acima de 60 anos, enquanto a prevalência do câncer de colo de útero aumenta com a idade. Dessa forma, esforços de prevenção de ISTs devem ser tomados principalmente em mulheres entre 25 e 30 anos de idade para a redução do câncer de colo de útero (KONE et al., 2017).

O tabagismo foi pouco reportado entre as participantes deste estudo. O tabagismo, uso de drogas ilícitas e possuir experiência sexual com parceiro do mesmo sexo são fatores de risco associados a presença de HPV e coinfeções. O uso de cigarro contribui para o câncer de colo de útero e está associado ao aumento na prevalência e persistência da infecção por HPV (KOPS et al., 2019; SCHABATH et al., 2012; CASTELLSAGUE; BOSCH; MUÑOZ, 2002). Uma possível explicação é que a infecção por HPV e o tabaco atuam cooperativamente no desenvolvimento de lesões cervicais, pois componentes químicos presentes no cigarro podem causar danos ao material genético (DNA) e afetar a habilidade de eliminação da infecção viral pelo sistema imune (SCHABATH et al., 2012).

Não foi encontrada associação em relação a fatores socioeconômicos, apesar de alguns estudos mostrarem que a infecção por HPV e outras ISTs estão relacionadas com o nível socioeconômico e com um risco aumentado de câncer de

colo de útero (FRANCESCHI et al., 2009; GIULIANO et al., 2014; MENEZES et al., 2018; VERTERAMO et al., 2009). O estudo realizado pelo IARC observou que o baixo nível socioeconômico e o baixo nível educacional (principalmente o analfabetismo) aumentam o risco de lesões precancerosas e câncer invasivo (FRANCESCHI et al., 2009). Isto pode estar relacionado a falta de conhecimento sobre a importância do rastreamento, levando essas mulheres a buscar os serviços de saúde quando a doença já se encontra em estágios avançados.

A infecção viral associada a outra infecção sexualmente transmissível (HPV e coinfeção) foi maior do que a infecção isolada por HPV. Dentre as que apresentaram HPV e coinfeções, prevaleceram mulheres que apresentavam somente uma infecção secundária. HPV associado a *T. vaginalis* apresentou maior prevalência, e estava estatisticamente associada a presença do HPV comparado com as outras ISTs avaliadas. HPV e *N. gonorrhoeae*, seguido por HPV e *C. trachomatis* foram menos frequente. De acordo com Kops et al., (2019), uma infecção sexualmente transmissível configura-se como um fator de risco para se contrair outra IST, principalmente o HPV.

A infecção por HPV geralmente é eliminada pelo sistema imune sem que haja o desenvolvimento de sintomas, mas alguns estudos indicam que, na presença de pelo menos uma IST, a infecção do HPV é mais prevalente (KOPS et al., 2019; MENEZES et al., 2018; AMORIM et al., 2017; DE ABREU et al., 2016). Isto pode estar associado ao comprometimento do sistema imune causado por estas ISTs, que impede a eliminação do HPV e favorece a persistência no epitélio cervical. Além disso, um histórico prévio de IST está associado a reduzida habilidade de eliminação do HPV ou a um aumento no risco de aquisição da infecção viral (MENEZES et al., 2018).

A infecção por *T. vaginalis* tem sido associada a um aumento no risco de lesão intraepitelial cervical. Hipotetiza-se que este patógeno produza nitrosaminas que causam inflamação cervical. Com isso, o epitélio cervical sofre rupturas que permitem a penetração do HPV na camada basal do epitélio (MERCER; JOHNSON, 2018; LAZENBY et al., 2014). Similarmente, apesar de não estar estabelecido o mecanismo envolvido, estudos tem reportado que, quando a célula está infectada com *C. trachomatis*, a entrada do HPV é facilitada por microabrasões epiteliais (SSEDYABANE et al., 2019; CHUMDURI et al., 2013). Com o acúmulo de partículas virais, ocorre o desarranjo do sistema imune e o impedimento da eliminação do HPV

(KOJIMA et al., 2013; VERTERAMO et al., 2009). A presença destes dois microrganismos também pode estar associado ao desarranjo genômico causado por *C. trachomatis*, favorecendo também o aparecimento de danos celulares sugestivos de lesão cervical (COMAR et al., 2017).

A aquisição inicial de infecções sexualmente transmissíveis, como *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, estão associados a maiores chances de aquisição do HPV (GININDZA et al., 2017; KRIESEL et al., 2016; KENYON; BUYZE; COLENBUNDERS, 2013; SOUZA et al., 2013). Entretanto, neste estudo não foi possível identificar qual IST foi adquirida primeiro, se o HPV ou os outros microrganismos avaliados.

Estudos foram realizados no intuito de avaliar a prevalência de infecções sexualmente transmissíveis no Brasil, entretanto poucos estudos avaliaram a associação entre HPV e outras ISTs (KOPS et al., 2019; BRITTO et al., 2018; AMORIM et al., 2017; DE ABREU et al., 2016; SOUZA et al., 2013). Estes estudos variam na forma de identificação destes agentes, alguns avaliando somente através de entrevistas e outros através de técnicas laboratoriais ou moleculares que apresentam maior ou menor especificidade na detecção dos patógenos. Outros fatores também devem ser levados em consideração, como: as diferenças entre as infecções sexualmente transmissíveis avaliadas, tendo em vista o amplo número de microrganismos transmitidos sexualmente e; a população avaliada, visto que os estudos são, geralmente, realizados em grupos específicos, como mulheres grávidas ou HIV soropositivas (MENEZES et al., 2018; TOTA et al., 2017; GIULIANO et al., 2016; MENON et al., 2016b).

Kops et al., (2019), em um estudo multicêntrico verificou fatores associados a infecção por HPV e outras ISTs em homens e mulheres jovens sexualmente ativos através do auto-relato dos participantes. Eles observaram que a infecção isolada por HPV (84,8%) foi maior do que a infecção associada a outras ISTs (9,6%). Dentre as mulheres que reportaram a presença de HPV e coinfeções, predominou-se mulheres com uma infecção secundária associada ao HPV. Entretanto, por se tratar de infecções auto-reportadas, as infecções podem ter ocorrido no passado e não refletir o status destas ISTs no presente. Além disso, como muitas ISTs não apresentam sinais e sintomas, isto pode ter contribuído para subestimar a prevalência destas infecções na população do estudo (KOPS et al., 2019; DARIOTIS et al., 2010).

No presente estudo, diferente do estudo de citado acima, a maior prevalência foi observada entre as participantes que apresentaram HPV e coinfeções. Isto pode estar associada a técnica utilizada para a detecção dos patógenos. A PCR permite a detecção do material genético destes microrganismos, mesmo quando estes apresentam cargas baixas de infecção.

Já o estudo de Amorim et al., (2017), realizado no Nordeste do Brasil, buscou avaliar a associação entre a infecção por HPV e outras nove ISTs, incluindo *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* e *G. vaginalis*, bem como o envolvimento destas na progressão de lesões intraepiteliais cervicais. A população avaliada apresenta características semelhantes a de mulheres residentes em São Luís, por se tratar de mulheres com condições sociodemográficas similares e a técnica de detecção utilizada para a detecção dos microrganismos foi a PCR. De modo similar ao nosso estudo, verificou-se elevada prevalência do HPV e *T. vaginalis* e menor prevalência de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Entretanto, o número de lesões epiteliais foi elevado e estavam estatisticamente associados a infecção por *T. vaginalis* e *G. vaginalis* (AMORIM et al., 2017).

Um estudo semelhante realizado por Abreu et al., (2016) visou avaliar as taxas de coinfeções entre HPV e outros microrganismos sexualmente transmissíveis em diferentes achados citológicos. Avaliou-se a presença de HPV, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* através da técnica de PCR Multiplex em mulheres residentes no Sul do Brasil, que apresenta melhores condições sociodemográficas em comparação com a região Nordeste. Também observou-se elevada prevalência do HPV e *T. vaginalis*, em comparação com as outras ISTs avaliadas. Observou-se um aumento no risco de HSIL e ASC-US em mulheres com coinfeção por HPV de alto risco, *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. O mesmo também foi observado para mulheres com coinfeção por HPV de alto risco e *T. vaginalis*. Os resultados apresentados acima corroboram com os obtidos no presente estudo e também reforçam a hipótese de que as ISTs atuam como cofatores na carcinogênese cervical mediada por HPV.

Neste estudo, houve reduzida prevalência de lesões cervicais precursoras do câncer de colo de útero, tanto em mulheres com infecção única por HPV quanto em mulheres que apresentaram HPV e coinfeções, não havendo associação estatisticamente significativa entre a presença de HPV/ISTs e a presença de lesões

cervicovaginais. Entretanto, as lesões cervicais identificadas foram predominantes em mulheres com coinfeções, incluindo ASC-US, LSIL e ASC-H, enquanto em mulheres com infecção única por HPV foi identificado apenas LSIL.

Resultado similar também pode ser observado em estudos realizados em países com condições sociodemográficas semelhantes as do Brasil. Menezes et al., (2018) estimaram a prevalência e os padrões de coinfeção por HPV/ISTs em mulheres HIV-negativas residentes na África do Sul. Além do HPV, foram identificadas as ISTs *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum* e HSV-2. Similarmente, observou-se elevada prevalência de coinfeções, com o HPV geralmente associado a duas infecções secundárias. Também não observou-se diferenças significativas entre mulheres com infecção única e mulheres com coinfeções em relação a fatores sociodemográficos. Corroborando com esses dados, no presente estudo a infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* não foi estatisticamente associado a infecção por HPV.

Além de alguns estudos relatarem que mulheres com *C. trachomatis* apresentam maiores chances de aquisição do HPV, também é reportado um aumento de até 5 vezes no risco de HSIL em coinfectadas por HPV e *C. trachomatis* (SONGOCK; KIM; BODILY, 2017; VERTERAMO et al., 2009; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003). Assim, evidencia-se que existe diferenças no potencial destas ISTs de agir como cofatores para a carcinogênese mediada por HPV.

O estudo de Chumduri et al., (2013) e Kojima et al., (2012) evidenciaram que, em resposta a distúrbios causados por coinfeções persistentes, as células podem “burlar” os mecanismos de sinalização de dano celular, levando assim a imortalização de células alteradas e formação de tumores. Entretanto, o presente estudo não buscou explicar os mecanismos de ação sinérgica entre HPV e outras ISTs, mas evidenciou que, nesta população, existe uma possível ação de cooperação entres estes microrganismos, contribuindo para microambiente celular propício para o desenvolvimento de lesões cervicais.

Com relação ao tipo viral identificado, observou-se elevada prevalência do HPV 16 (alto risco oncogênico) tanto em mulheres com infecção única por HPV quanto em mulheres com HPV e coinfeções. Porém, observou-se uma variação entre a segunda posição nos dois grupos. Em mulheres somente com HPV, predominou-se o HPV 11 e outros tipos de baixo risco oncogênico, enquanto em mulheres com coinfeções

HPV/ISTs, predominou-se o HPV 18 e outros tipos virais de alto risco oncogênico. Em algumas mulheres não foi possível identificar o tipo viral, tanto em mulheres com infecção única por HPV como em mulheres com coinfeções. Isto pode estar associado a presença de coinfeções por múltiplos genótipos de HPV, impossibilitando a detecção pela técnica de sequenciamento. Fatores associados a amostra biológica, como a qualidade ou quantidade do DNA no momento da reação também pode ter contribuído para a dificuldade na identificação do vírus nestas mulheres.

A associação entre HPV de alto risco oncogênico e ISTs tem sido demonstrada em vários estudos, evidenciando que infecções por *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae* podem ser considerados fatores de risco para a aquisição de HPV de alto risco (BRITTO et al., 2018; MERCER; JOHNSON, 2018; SERRANO et al., 2018; KONE et al., 2017; COMAR et al., 2017; DE ABREU et al., 2016; CHUMDURI et al., 2013). Tanto o HPV, como as infecções acima citadas compartilham a mesma via de transmissão e fatores comportamentais, socioeconômicos e demográficos de risco. Se não tratadas, estas infecções podem aumentar o risco de infecção por HPV e levar ao desenvolvimento de complicações sérias como inflamação pélvica e infertilidade.

A inflamação causada por estas ISTs pode facilitar o processo carcinogênico devido ao aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (ERA) que podem causar danos ao DNA e inibição de mecanismos de reparação celular (COMAR et al., 2017; KONE et al., 2017). Dessa forma, tipos de HPV de alto risco oncogênico podem persistir no epitélio, atuar sobre proteínas supressoras de tumor, favorecendo o processo de carcinogênese cervical (KONE et al., 2017). Também hipotetiza-se que infecções bacterianas liberam enzimas líticas que levam a degradação do muco protetor da região vaginal, contribuindo para a formação de microabrasões e a adesão do HPV, e posteriormente a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (SUTTON et al., 2007).

O reduzido número de lesões precursoras do câncer do colo do útero, em contraste com a elevada prevalência do HPV em mulheres com citologia normal identificado neste estudo suporta a hipótese de que, apesar de configurar-se como um importante fator precursor da oncogênese cervical, somente a presença do HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer. Outros fatores como a persistência e o tipo viral, a expressão de oncogenes virais e a integração do genoma viral na célula hospedeira também causam grande influência na carcinogênese

cervical (DOORBAR, 2018; ZUR HAUSEN, 2002, 2009; HO et al., 1993). Na infecção inicial, o genoma do HPV é replicado e mantido na forma episossomal, podendo manter-se nesse estado e contribuindo para a infecção assintomática. Entretanto, eventualmente, o genoma viral consegue se integrar ao genoma da célula hospedeira, principalmente os tipos virais de alto risco associados ao câncer, como o HPV 16 e 18. Hipotetiza-se que a integração viral interfere em importantes mecanismos de controle do ciclo celular, apoptose e controle da instabilidade cromossômica. Essas alterações são atribuídas principalmente aos oncogenes virais E6 e E7, que conhecidamente atuam sobre proteínas supressoras tumorais inibindo a morte celular, promovendo a imortalização e transformação de células, e favorecendo o surgimento do câncer (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018; WALHART, 2015; WENTZENSEN; VINOKUROVA; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2004). Dessa forma, o estudo da integração do genoma viral pode vir a ser uma importante ferramenta a ser utilizada clinicamente para a compreensão do potencial oncogênico do HPV na progressão de lesões cervicais.

Dessa forma, dois principais mecanismos podem estar associados com a infecção por agentes sexualmente transmissíveis e o desenvolvimento de lesões cervicais. A primeira hipótese é que a infecção por HPV leva a um aumento na susceptibilidade a uma nova infecção sexualmente transmissível; a outra hipótese é que a coinfeção por HPV e outra IST atuam de maneira cooperativa para o desenvolvimento de lesões cervicais (KISEKI et al., 2017).

Os resultados apresentados neste estudo corroboram com a segunda hipótese, evidenciando que mulheres com coinfeções apresentaram elevada prevalência, tanto de tipos virais de alto risco oncogênico, como de lesões cervicais. Isto pode estar associado a atuação mútua do HPV e outros microrganismos presentes no epitélio cervical, que levaram a modificações no microambiente cervical e impediram a atuação do sistema imune na eliminação destes agentes. O HPV 16 e 18, conhecidamente de elevado potencial oncogênico, apresentam características que favorecem a persistência viral e a malignização de células infectadas e, associado a outros fatores, pode favorecer o desenvolvimento de lesões com potencial de progressão para o câncer (CASTELLSAGUÉ et al., 2016; LI et al., 2008; LIZANO et al., 2006).

Em contrapartida, em mulheres que apresentaram somente a infecção por HPV, a ausência de outros patógenos e a presença de tipos virais de alto ou baixo risco oncogênico apresentaram menor potencial para causar danos ao epitélio, refletindo no menor número de lesões cervicais identificados neste grupo. A ausência de cofatores atuando juntamente com o HPV, favorece a eliminação do vírus pelo sistema imune. De modo semelhante, dados da literatura reportam maior variabilidade entre os tipos virais encontrados em mulheres assintomáticas, corroborando com os resultados obtidos neste estudo (PRETE et al., 2019; MANINI; MONTOMOLI, 2018; LIZANO et al., 2006).

A vacinação contra o HPV vem sendo implementada no intuito de reduzir as taxas de HPV e câncer no Brasil. Espera-se que a circulação do HPV possa ser reduzida na população brasileira, bem como a redução de doenças relacionadas ao vírus. Após anos de implementação da vacina, novos estudos devem ser realizados, evidenciando os impactos da vacinação contra o HPV nesta população, bem como a identificação dos tipos virais presentes na população maranhense.

As infecções sexualmente transmissíveis, incluindo o HPV, configuram-se como um importante problema de saúde pública por estarem associadas ao desenvolvimento de várias complicações urogenitais, como a infertilidade e o câncer (BRUNI et al., 2017). Apesar da associação entre HPV e o câncer do colo de útero estar bem estabelecido, novos estudos precisam ser realizados para compreender os múltiplos e complexos fatores que podem estar envolvidos no processo de carcinogênese cervical associado ao HPV e outras ISTs. Este estudo poderá fornecer novos direcionamentos para o desenvolvimento de programas de prevenção de HPV/ISTs, bem como a promoção de práticas de sensibilização da população sobre os impactos destas na qualidade de vida das mulheres.

7. CONCLUSÃO

Este estudo fornece informações sobre a prevalência de HPV e outras importantes ISTs em mulheres, através da detecção molecular destes patógenos. Observou-se elevada prevalência do HPV associado a *T. vaginalis* entre as participantes do estudo. O HPV 16 apresentou maior prevalência entre as que apresentaram infecção somente por HPV e as que apresentaram HPV e coinfeções. Os achados sugerem que a presença de *T. vaginalis* pode favorecer a infecção por HPV, e essa associação HPV/IST pode favorecer o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais precursoras do câncer de colo de útero. Dentre os principais fatores de risco associados a ISTs estavam a baixa renda, baixa escolaridade, o início precoce da atividade sexual e o não uso de camisinha.

Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias que favoreçam o acesso de mulheres ao exame preventivo, a fim de detectar lesões cervicais precocemente e permitir o melhor tratamento a estas mulheres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA PANDEY, R.; KARMACHARYA, E. Cervical cancer screening behavior and associated factors among women of Ugrachandi Nala, Kavre, Nepal. **European Journal of Medical Research**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2017.
- AMORIM, A. T. et al. Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 769, p. 1–12, 2017.
- AWUA, A. K. et al. Unique LCR variations among lineages of HPV16, 18 and 45 isolates from women with normal cervical cytology in Ghana. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2017.
- BANHART, S. et al. Chlamydia trachomatis and its interaction with the cellular retromer. **International Journal of Medical Microbiology**, n. July, p. 0–1, 2017.
- BANSAL, A.; SINGH, M. P.; RAI, B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem Biology of Human Papilloma. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 2, p. 84–89, 2016.
- BEBEAR, C.; BARBEYRAC, B. DE. Genital Chlamydia trachomatis infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 1, p. 4–10, 2009.
- BOSCH, F. X.; QIAO, Y.; CASTELLSAGUÉ, X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. 8–21, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo HPV. (POP-BRASIL): resultados preliminares**. Porto Alegre: [s.n.].
- BRISTOW, C. C. et al. Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Trichomonas vaginalis screening and treatment of pregnant women in Port-au-Prince, Haiti. **International Journal of STD and AIDS**, v. 28, n. 11, p. 1–10, 2017.
- BRITTO, A. M. A. et al. Detection of sexually transmitted infections at a Brazilian gynecology center: high prevalence of co-infections. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, n. December, 2018.
- BRUNI, L. et al. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. **The Journal of**

Infectious Diseases, v. 202, n. 12, p. 1789–1799, 2010.

BRUNI, L. et al. **Human Papillomavirus and Related Diseases Report WORLD**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>>.

BUDAI, I. CHLAMYDIA TRACHOMATIS : MILESTONES IN CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS IN THE LAST HUNDRED YEARS. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 54, n. 1, p. 8950, 2007.

BURD, E. Human papillomavirus and cervical cancerBurd E (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16: 1–17 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607614160>. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.

BURD, E. M. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 2, p. 291–319, 2016.

BURK, R. D. et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: General features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 20, n. 3, p. 113–123, 2011.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. Human papillomavirus detection in cervical neoplasia attributed to 12 high-risk human papillomavirus genotypes by region. **Papillomavirus Research**, v. 2, p. 61–69, 2016.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, v. 89, p. 191–199, 2002.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 31, p. 20–28, 2003.

CHUMDURI, C. et al. Chlamydia Infection Promotes Host DNA Damage and Proliferation but Impairs the DNA Damage Response. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 6, p. 746–758, 2013.

COMAR, M. et al. Chlamydia trachomatis and HPV co-infections in HIV negative men from a multi-ethnic area of Northern Italy at high prevalence of cervical malignancies. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. March, p. 1654–1661, 2017.

CORTINA, S. H. DE et al. A Systematic Review of Point of Care Testing for Chlamydia trachomatis , Neisseria gonorrhoeae , and Trichomonas vaginalis. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2016, p. 1–17, 2016.

COSTA-LOURENÇO, A. P. R. DA et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Brazilian Journal of M**, v. 8, p. 617–628, 2017.

COUPLÉE, F. et al. Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 902–907, 2002.

DARIOTIS, J. K. et al. What are the Consequences of Relying upon Self-Reports of Sexually Transmitted Diseases? Lessons Learned about Recanting in a Longitudinal Study. **Journal of adolescent health**, v. 45, n. 2, p. 187–192, 2010.

DE ABREU, A. L. P. et al. Association of human papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 1371–1383, 2016.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 47, p. 2–13, 2018.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DEIVENDRAN, S.; MARZOOK, K. H.; PILLAI, M. R. The Role of Inflammation in Cervical Cancer. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 816, p. 377–399, 2014.

DEL PRETE, R. et al. Simultaneous detection and identification of STI pathogens by multiplex Real-Time PCR in genital tract specimens in a selected area of Apulia, a region of Southern Italy. **Infection**, v. 45, n. 4, p. 469–477, 2017.

DISCACCIATI, M. G. et al. MMP-9/RECK imbalance: A mechanism associated with high-grade cervical lesions and genital infection by human papillomavirus and *chlamydia trachomatis*. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 24, n. 10, p. 1539–1547, 2015.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525–541, 2006.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F55-70, 2012.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease

association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 2–23, 2016.

DOORBAR, J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. **Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p. 166–179, 2016.

DOORBAR, J. Host control of human papillomavirus infection and disease. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 47, p. 27–41, 2018.

DREYER, G. Clinical implications of the interaction between HPV and HIV infections. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 47, p. 95–106, 2018.

EDWARDS, T. et al. Trichomonas vaginalis : Clinical relevance , pathogenicity and diagnosis. **Critical REviews in Microbiology**, v. 7828, p. 1–12, 2014.

FELLER, L. et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infectious Agents and Cancer**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2009.

FERNANDES, T. et al. Resistência de Neisseria gonorrhoeae a antimicrobianos na prática clínica: como está o Brasil? **Femina**, v. 46, n. 2, p. 76–89, 2018.

FRANCESCHI, S. et al. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 5, p. 865–870, 2009.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 1, p. 113–123, 2009.

GININDZA, T. G. et al. Prevalence and risk factors associated with sexually transmitted infections (STIs) among women of reproductive age in Swaziland. **Infectious Agents and Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2017.

GIULIANO, A. R. et al. Differences in human papillomavirus infection natural history , transmission and anatomic site of infection. **International Journal of Cancer**, v. 00, p. 1–9, 2014.

GIULIANO, A. R. et al. High HIV, HPV, and STI prevalence among young Western Cape, South African women: EVRI HIV prevention preparedness trial. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom**, v. 68, n. 2, p. 227–235, 2016.

GRAVES, K. J. et al. Trichomonas vaginalis virus: a review of the literature. **International Journal of STD and AIDS**, p. 1–9, 2019.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human

populations. **Journal of virology**, v. 67, n. 11, p. 6413–23, 1993.

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 34–40, 2017.

INCA. **Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. [s.l: s.n.].

KASAMATSU, E. et al. Factors associated with high-risk human papillomavirus infection and high-grade cervical neoplasia: A population-based study in Paraguay. **Plos One**, v. 14, n. 6, p. e0218016, 2019.

KENYON, C.; BUYZE, J.; COLENBUNDERS, R. Classification of incidence and prevalence of certain sexually transmitted infections by world regions. **International Journal of Infectious Diseases**, v. xxx, p. e1–e8, 2013.

KISEKI, H. et al. Influence of co-infection complicated with human papillomavirus on cervical intraepithelial neoplasia development in patients with atypical squamous cells of undetermined significance. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 23, n. 12, p. 814–819, 2017.

KOJIMA, S. et al. The Prevalence of Cervical Regulatory T Cells in HPV-Related Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Correlates Inversely with Spontaneous Regression of CIN. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, p. 134–141, 2013.

KONE, E. S. et al. Vaginal Infections of Albanian women Infected with HPV and their impact in intraepithelial cervical lesions evidenced by Pap test. **Journal of Cytology**, v. 34, p. 16–21, 2017.

KOPS, N. L. et al. Factors associated with HPV and other self-reported STI coinfections among sexually active Brazilian young adults: Cross-sectional nationwide study. **BMJ Open**, v. 9, n. 6, p. 1–7, 2019.

KRIESEL, J. D. et al. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. **International Journal of STD and AIDS**, v. 27, n. 14, p. 1275–1282, 2016.

LAZENBY, G. B. et al. An Association Between *Trichomonas vaginalis* and High-Risk Human Papillomavirus in Rural Tanzanian Women Undergoing Cervical Cancer Screening. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 1, p. 38–45, 2014.

LEW, J. BIN et al. Primary HPV testing versus cytology-based cervical screening in women in Australia vaccinated for HPV and unvaccinated: effectiveness and

economic assessment for the National Cervical Screening Program. **The Lancet Public Health**, v. 2, n. 2, p. e96–e107, 2017.

LI, W. et al. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 12, p. 1355–1361, 2008.

LIMA, L. D. M. et al. Sexually transmitted infections detected by multiplex real time PCR in asymptomatic women and association with cervical intraepithelial neoplasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 40, n. 9, p. 540–546, 2018.

LIZANO, M. et al. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. **Gynecologic Oncology**, v. 102, n. 2, p. 230–235, 2006.

MANINI, I.; MONTOMOLI, E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. **Italy Ann Ig**, v. 30, p. 28–32, 2018.

MARTEL, C. DE et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site , country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 33, n. 0, p. 664–670, 2017.

MARTINS, T. R. et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: Correlation to cytological data. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2016.

MASROUR-ROUDSARI, J.; EBRAHIMPOUR, S. Causal role of infectious agents in cancer: An overview. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 153–158, 2017.

MENEZES, L. J. et al. Patterns of prevalent HPV and STI co-infections and associated factors among HIV-negative young Western Cape , South African women : the EVRI trial. **Sexually Transmitted Infections**, v. 94, n. July 2013, p. 55–61, 2018.

MENON, S. et al. Human and Pathogen Factors Associated with Chlamydia trachomatis -. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 4, p. 969–985, 2015.

MENON, S. et al. Associations Between Vaginal Infections and Potential High-risk and High-risk Human Papillomavirus Genotypes in Female Sex Workers in Western Kenya. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 12, p. 2567–2577, 2016a.

MENON, S. et al. Epidemiology of HPV genotypes among HIV positive women in Kenya: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016b.

MERCER, F.; JOHNSON, P. J. Trichomonas vaginalis: Pathogenesis, Symbiont

Interactions, and Host Cell Immune Responses. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 8, p. 683–693, 2018.

MIRALPEIX, E. et al. Role of *Chlamydia trachomatis* serology in conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, p. ijgo.12903, 2019.

MUSSELWHITE, L. W. et al. Racial/Ethnic Disparities in Cervical Cancer Screening and Outcomes. **Acta Cytologica**, v. 60, n. 6, p. 518–526, 2016.

NALDINI, G. et al. Association between human papillomavirus and chlamydia trachomatis infection risk in women: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Public Health**, v. 64, n. 6, p. 943–955, 2019.

NEWMAN, L. et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 2015.

NORENHAG, J. et al. The vaginal microbiota, HPV and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, p. 0–3, 2019.

PILLAY, J. et al. Screening for chlamydia and/or gonorrhoea in primary health care: Protocol for systematic review. **Systematic Reviews**, v. 7, n. 1, p. 248, 2018.

PINHO-FRANÇA, J. D. R.; CHEIN, M. B. D. C.; THULER, L. C. S. Patterns of cervical cytological abnormalities according to the Human Development Index in the northeast region of Brazil. **BMC Women's Health**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

PINIDIS, P. et al. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. **Maedica - a Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 1, p. 48–54, 2016.

PRETE, R. DEL et al. Epidemiological evaluation of human papillomavirus genotypes and their associations in multiple infections. **Epidemiology and Infection**, v. 147, n. e132, p. 1–9, 2019.

RIBEIRO, A. A. et al. HPV infection and cervical neoplasia: Associated risk factors. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2015.

ROSILLON, D. et al. Risk of newly detected infections and cervical abnormalities in adult women seropositive or seronegative for naturally acquired HPV-16/18 antibodies. **Cancer Medicine**, n. August 2017, p. cam4.1879, 2019.

SALFA, M. C.; SULIGOI, B. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae* Based on Data Collected by a Network of Clinical Microbiology Laboratories, in Italy. **Adv Exp. Medicine, Advances in**

Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, v. 6, n. October 2014, p. 57–66, 2015.

SCHABATH, M. B. et al. Smoking and human papillomavirus (HPV) infection in the HPV in men (HIM) study. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 21, n. 1, p. 102–110, 2012.

SERRANO, B. et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 47, p. 14–26, 2018.

SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 2007.

SONGOCK, W. K.; KIM, S. MAN; BODILY, J. M. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. **Virus Research**, v. 231, p. 56–75, 2017.

SOUZA, R. P. et al. Short report: Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus-infected Brazilian women by multiplex polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 1199–1202, 2013.

SPURGEON, M. E.; LAMBERT, P. F. Human Papillomavirus and the Stroma : Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle. 2017.

SSEDYABANE, F. et al. HPV-Chlamydial Coinfection, Prevalence, and Association with Cervical Intraepithelial Lesions: A Pilot Study at Mbarara Regional Referral Hospital. **Journal of Cancer Epidemiology**, v. 2019, p. 1–7, 2019.

STEVENS, J. S.; CRISS, A. K. Pathogenesis of Neisseria gonorrhoeae in the female reproductive tract : neutrophilic host response , sustained infection , and clinical sequelae. p. 1–9, 2017.

SUTTON, M. et al. The Prevalence of Trichomonas vaginalis Infection among Reproductive-Age Women in the United. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 1319–26, 2007.

TADELE, A.; HUSSEN, S.; SHIMELIS, T. Prevalence and associated factors of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae among female commercial sex workers in Hawassa City, Southern Ethiopia 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2019.

TOTA, J. E. et al. Approaches for triaging women who test positive for human

papillomavirus in cervical cancer screening. **Preventive Medicine**, v. 98, p. 15–20, 2017.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae in the 21st Century : Past , Evolution , and Future Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae in the 21st Century : Past , Evolution , and Future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, 2014.

VERTERAMO, R. et al. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1–7, 2009.

VIDAL, J. P. C. B. et al. Genetic Diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian Patients With Invasive Cervical Cancer. **Cancer**, v. 88, n. J. Med. Virol., p. 1279–1287, 2016.

WALHART, T. Human Papillomavirus Biology, Pathogenesis, and Potential for Drug Discovery: A Literature Review for HIV Nurse Clinical Scientists. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 26, n. 6, p. 693–702, 2015.

WENDLAND, E. M. et al. POP-Brazil study protocol: A nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. **BMJ Open**, v. 8, n. 6, p. 1–6, 2018.

WENTZENSEN, N. et al. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. **Journal of Clinical Virology**, v. 76, p. S49-55, 2016.

WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Research**, v. 64, n. 11, p. 3878–3884, 2004.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human papillomavirus laboratory manual**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sexually Transmitted Infections (STIs)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sexually transmitted infections**. [s.l: s.n.].

YAN, R. L. et al. Chlamydia trachomatis infection among patients attending sexual and reproductive health clinics: A cross-sectional study in Bao'an District, Shenzhen, China. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–13, 2019.

ZUR HAUSEN, H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by

high risk human papillomavirus genotypes. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, n. 6, p. 405–411, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.

APÊNDICES

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ESTUDO: PAPILOMAVÍRUS HUMANO: PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS EM POPULAÇÕES EM CONDIÇÕES DE VULNERABILIDADE

Prezado (a) Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo *Papilomavírus humano: prevalência e fatores associados em populações em condições de vulnerabilidade*, que pretende verificar através de exames laboratoriais, a presença (ou não) de papilomavírus humano (HPV) no seu organismo (corpo) e a associação com outros dados de sua saúde.

Para a pesquisa do HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis (bactérias e protozoários) serão coletadas amostras da mucosa oral (boca), anal e genital (mulheres na vagina e homens no pênis), por profissionais (por ex.: médicos ou enfermeiras) treinados e com experiência, utilizando material estéril e descartável (material novo e que não foi e não será utilizado com outra pessoa). Esses procedimentos são indolores (sem dor), mas pode causar um pequeno incômodo no local, que é passageiro e não causará agravos a sua saúde (danos /não te deixará doente e nem com dor), pois será realizado de acordo com as normas (regras) em saúde, com cuidado e atenção. Se o (a) senhor (a) se sentir constrangido pode se negar a realizar o procedimento de coleta, sem qualquer problema, mas garantimos que tudo será realizado da forma mais respeitosa possível e com profissionalismo; além de garantirmos o sigilo absoluto (não comentar com qualquer pessoa ou divulgar seu nome/identificação e resultados dos exames) dos seus dados.

A coleta de amostra biológica (sangue) para dosagem de perfil glicídico (glicose/açúcar no sangue), lipídico (gordura no sangue), verificação de Hepatite, HIV e Sífilis também será realizada por profissionais treinados, com material estéril e descartável (material novo e que não foi e nem será utilizado por outra pessoa). Para realização da coleta de sangue necessita-se um jejum (sem comer) máximo de 12 horas. Por exemplo: se o exame será feito às 08:00 da manhã, o senhor (a) deverá parar de se alimentar (comer) às 20:00 h do dia anterior ao exame. O senhor (a) pode beber água de maneira normal e rotineira e usar seus medicamentos (remédios) de uso contínuo (de todos os dias). Após a coleta de sangue, por favor, o (a) senhor (a) deverá pressionar o local da coleta por no mínimo 3 minutos; além disso, evite flexionar (dobrar), não massageie o local e não carregue peso no braço em que foi feita a punção sanguínea (coleta de sangue). A punção sanguínea (coleta de sangue) pode causar um leve desconforto e raramente o aparecimento de hematomas (deixar o local roxo) que desaparecem em até 48 horas. Caso ocorra hematoma solicita-se que o (a) senhor (a) coloque compressas de gelo por 15 minutos nas primeiras horas após a coleta. Se achar necessário, pode-se colocar compressa morna para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente. Porém, como este procedimento será realizado por profissional competente e experiente a probabilidade de esse fato ocorrer é mínima (muito pequena).

A determinação de HIV, vírus da hepatite e sífilis serão realizadas por testes laboratoriais remoto - TLR (exame que se faz através de um pequeno furo no dedo da mão e coleta de uma gota de sangue) utilizando também material estéril e descartável (material novo e que não foi e nem será utilizado por outra pessoa). A punção capilar (furo no dedo da mão) é rápida e indolor não causando qualquer prejuízo (dano) para sua mobilidade física dos dedos ou das mãos (mexer mãos e dedos).

Também será verificado sua pressão arterial (após 3 minutos de descanso sentado) e seus parâmetros (dados) antropométricos para averiguar (ver) se o (a) senhor (a) está com excesso de peso (peso; altura; circunferência da cintura, do quadril e abdominal). O resultado de todos os exames será entregue ao (a) senhor (a) e eles configuram (são) sigilo (segredo) absoluto de identificação (os resultados dos exames juntamente com seu nome/identificação não serão divulgados de maneira nenhuma para qualquer pessoa).

Com sua participação, poderemos obter dados importantes sobre o vírus HPV e seus fatores associados, bem como melhorar o conhecimento sobre a distribuição da doença e estudar a possibilidade de novas formas de tratamento, profilaxia (vacina) e prevenção (campanhas e atendimento). Para o senhor (a) o benefício direto é fazer exames para verificar suas condições de saúde (pressão arterial, açúcar e gordura no sangue, entre outros) e se possui o vírus HPV e outras infecções sexualmente transmissíveis (doença passada por sexo), além de receber orientações em saúde.

O possível risco para você está ligado ao constrangimento ao responder os questionamentos, o qual será minimizado, uma vez que, será respeitada a decisão do (a) senhor (a) em não querer compartilhar (nos contar) seus dados pessoais e na coleta de amostra biológica. Na coleta de amostra biológica (sangue) há risco de sentir pequena dor ou incomodo local, mas serão tomadas as precauções para minimizar (diminuir) esse desconforto e eventual dor ou hematoma (roxo no local da coleta de sangue) local, como explicado acima. Para a coleta de amostra para pesquisa do HPV (anal, genital e oral) ela será realizada em local privativo na presença apenas do profissional (médico ou enfermeira) e de um integrante da pesquisa, de maneira respeitosa e respeitando sua integridade e saúde.

Sua autorização/participação deverá ser voluntária. Você não receberá nenhum valor em dinheiro ou outro tipo de premiação para fazer parte deste estudo. Também não haverá pagamento de despesas referentes ao seu deslocamento (transporte) para sua participação. Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para sanar (esclarecer) suas dúvidas. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo a você. Você terá a garantia de sigilo e confidencialidade (segredo), através da codificação dos seus dados (seu nome será substituído por número e letras); assim em nenhum momento seu nome será divulgado. Também é seu direito retirar (desistir) o seu consentimento (sua participação) a qualquer momento, sem prejudicar ou afetar seu atendimento no sistema de saúde.

Este estudo não prevê agravos (danos ou causar doenças) a sua saúde, porém se isso acontecer (danos diretos ou indiretos, tardios ou imediatos) o (a) senhor (a) será ressarcido e terá direito a assistência integral gratuita, pelo tempo que for necessário, conforme Resolução CNS nº 466/2012. Para isso, basta entrar em contato com a equipe da pesquisa e você será atendido e acompanhado a um serviço de saúde (custeado pelos pesquisadores) para avaliação, diagnóstico e tratamento (quando necessário).

Em caso de dúvidas, você poderá entrar em contato com a equipe de pesquisadores pelo telefone (98) 3272-8273 ou 981620919, durante o horário comercial: 08-12h e 14-18 h. Você poderá entrar em contato também com Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão para tirar dúvidas a respeito de questões éticas. O Comitê de Ética em Pesquisa é um grupo não remunerado formado por diferentes profissionais e membros da sociedade que avaliam um estudo para julgar se ele é ético e garantir a proteção dos participantes garantindo sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O CEP do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão está localizado na Rua Barão de Itapary, 227, quarto

andar do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, Centro, São Luís - MA. CEP-65.020-070. Telefone (98) 2109 1250. Horário de Funcionamento: 8 às 12 h e 14 às 17 h.

Se você decidir participar, você deverá assinar nos locais adequados deste documento e rubricar todas as páginas, isso irá representar o seu “Livre Consentimento em Participar deste Estudo” (sua aceitação). O pesquisador responsável ou membros da equipe de pesquisa também irão assinar o TCLE e rubricar todas as páginas. Este termo é elaborado em duas vias: uma via ficará com o pesquisador responsável e a outra via será do (a) senhor (a).

Consentimento em Participar:

Eu, _____ li e entendi o objetivo deste estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Entendi que a minha participação é totalmente voluntária (por vontade própria) e que posso, a qualquer momento, me recusar a participar. Tive a oportunidade de esclarecer (tirar) minhas dúvidas. Entendi, ainda, que todos os resultados deste estudo serão utilizados para fins científicos (estudos), *sendo garantindo o sigilo e a confidencialidade de todas as minhas informações e dados coletados.*

Participante:

Pesquisador:

Nome da Pesquisadora Responsável: Sally Monteiro
Telefone de contato: (98) 981620919

Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Universitário – UFMA
Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro. Telefone: 2109-1250

Polpa Digital
(se necessário)

Polpa Digital
(se necessário)

Apêndice B: Questionário Sociodemográfico

DATA:					FICHA Nº:	
Nome:					Idade:	
Ocupação:						
Endereço:						
Cidade onde nasceu:				Telefone:	()	
Data de nascimento:						
Cor/etnia:	<input type="checkbox"/> Branco(a).	<input type="checkbox"/> Pardo(a)	<input type="checkbox"/> Preto(a).	<input type="checkbox"/> Amarelo(a).	<input type="checkbox"/> Indígena	
Qual seu estado civil? <input type="checkbox"/> Solteiro(a) <input type="checkbox"/> Casado(a) <input type="checkbox"/> Separado(a) / divorciado(a) / desquitado(a). <input type="checkbox"/> Viúvo(a) <input type="checkbox"/> União estável						
Qual a sua renda mensal: <input type="checkbox"/> Programas Sociais <input type="checkbox"/> até ½ salário mínimo <input type="checkbox"/> entre ½ a 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> sem renda <input type="checkbox"/> mais de 1 a 2 salários mínimos <input type="checkbox"/> mais de 3 salários mínimos						
Qual a renda total de sua família, por mês: <input type="checkbox"/> Programas Sociais <input type="checkbox"/> até ½ salário mínimo <input type="checkbox"/> entre ½ a 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> sem renda <input type="checkbox"/> mais de 1 a 2 salários mínimos <input type="checkbox"/> mais de 3 salários mínimos						
No total, quantas pessoas dependem economicamente desta renda familiar: <input type="checkbox"/> pessoas						
Escolaridade: <input type="checkbox"/> analfabeto (a) <input type="checkbox"/> ensino fundamental <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto <input type="checkbox"/> ensino médio <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto <input type="checkbox"/> ensino superior <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto						
Tabagismo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> ex-fumante Nº cigarros/dia:						
Etilismo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Frequência: Tipo de bebida:						
Você já utilizou drogas ilícitas <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Qual:						
Se sim, iniciou com quantos anos?						
Você ainda utiliza algum tipo de droga ilícita <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim .						
Frequência: Qual:						
Refere alguma doença: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim .						
Qual (is):						
Se sim, utiliza algum medicamento? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim						
Qual (is):						
Quanto tempo de diagnóstico:						

Já fez alguma Terapia com Radiação? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim		Quando?	Quanto Tempo?
Idade da menarca:		Idade do 1º coito:	
Menopausa: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Idade da menopausa:			
Usa ou já usou medicação hormonal para a menopausa:			
<input type="checkbox"/> sim, usa atualmente <input type="checkbox"/> sim, já usou <input type="checkbox"/> nunca usou			
Nº de gestações:		Idade da 1ª gestação:	Nº de filhos:
Abortamentos: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim		Espontâneo:	Provocado:
Nº de parceiros sexuais durante a vida: <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> mais. Quantos:			
Tem parceiro fixo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Tempo:		Nº coitos/semana:	
Parceiro apresenta queixa genital: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Qual:			
Faz uso de contraceptivo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Tempo:			
Qual tipo:			
<input type="checkbox"/> camisinha masculina <input type="checkbox"/> anticoncepcional oral <input type="checkbox"/> adesivo transdérmico <input type="checkbox"/> injeção trimestral <input type="checkbox"/> camisinha feminina <input type="checkbox"/> ta <input type="checkbox"/> dispositivo intrauterino <input type="checkbox"/> laqueadura tubária <input type="checkbox"/> coito interrompido <input type="checkbox"/> nenhum método			
Utilizou camisinha na primeira relação com parceiro fixo: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim			
Orientação sexual: <input type="checkbox"/> heterossexual <input type="checkbox"/> bissexual <input type="checkbox"/> homossexual			
Modalidades de penetração peniana, além do vaginal: <input type="checkbox"/> oral <input type="checkbox"/> anal <input type="checkbox"/> outro. Qual:			
Já teve alguma IST? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim			
Qual (is):			
Tratamento:			
Parceiro teve episódios prévios de ISTs: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim. Qual:			
Antecedentes familiares:			
<input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> cardiopatia <input type="checkbox"/> obesidade <input type="checkbox"/> tireoidopatias <input type="checkbox"/> câncer. Local do Câncer:			
Outros:			
Já havia realizado exame preventivo:			
<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Com que idade você começou a fazer exames preventivos:			
[] anos			
De quanto em quanto tempo você costumava fazer o exame preventivo?			
<input type="checkbox"/> mais de uma vez por ano <input type="checkbox"/> todo ano			

- de 2 em 2 anos
- de 3 em 3 anos
- com intervalo de mais de 3 anos
- sem regularidade
- não sabe/não respondeu

Detectado anteriormente alguma lesão genital? não sim.

Qual:



ANEXOS

Anexo A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papilomavírus humano: prevalência e fatores associados em populações em condições de vulnerabilidade.

Pesquisador: SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 76328917.5.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.392.728

Apresentação do Projeto:

Introdução

O HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais prevalentes no mundo (DUNNE et al., 2007) e está etiológicamente ligada a lesões neoplásicas benignas e malignas (aproximadamente 90% das mulheres com câncer de colo uterino apresentam positividade para o DNAHPV) (DE OLIVEIRA et al., 2013; LORENZI et al., 2013). Estima-se que até 70% da população contrai o HPV em algum momento de sua vida (KAHN, BURK, 2007). A idade de maior prevalência da infecção HPV, na mulher, é dos 20-25 anos, período de maior vulnerabilidade da zona de transformação do colo uterino, declinando a prevalência progressivamente com a idade (DE VILLIERS et al., 1982). Sua transmissão é principalmente por via sexual, podendo ocorrer também através de auto-inoculação já que as mãos são consideradas reservatórios da infecção tanto em homens como em mulheres (HERNANDEZ et al., 2008, BRASIL, 2013). Estudos sugerem que o HPV também pode ser transmitido da mãe para o bebê durante o parto (RINTALA et al., 2005; SMITH et al., 2010; LEE et al., 2013). Dentre os fatores de risco para

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



se contrair HPV pode-se citar: (1) imunossupressão, (2) homens ou mulheres com mais de 10 parceiros sexuais, (3) atividade sexual precoce, (4) pouca higiene, (5) tabagismo, (6) terapia com radiação (7) fimose (8) não utilização de preservativo, (9) bebês cujas mães possuem HPV de alto risco (CROSIGNANI et al., 2013, BASEMAN, KOUTSKY, 2005; RINTALA et al., 2005, WELTON et al., 2004). Além disso, infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecção por *Trichomonas vaginalis* e/ou *Chlamydia trachomatis* e vaginose bacteriana são reconhecidos como cofatores para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo considerados adjuvantes no processo neoplásico (KING et al., 2011; NAM et al., 2009). Ou seja, os fatores associados ao HPV estão diretamente ligados a condições de vulnerabilidades humanas, como consumo de álcool e drogas ilícitas, condições de baixa higiene e pobreza, entre outros. Estudos com pessoas com imunodeficiência celular congênita ou adquirida confirmam a importância da imunidade na supressão do HPV e das neoplasias induzidas por este vírus (COX, 1995; ZURHAUSEN, 1986). A imunossupressão provavelmente aumenta o risco de transformação celular, permitindo que o vírus escape à imunovigilância, permitindo assim a persistência viral por longo tempo. Estimativas do tempo médio entre a aquisição da infecção HPV e o desenvolvimento do tumor maligno são de 5 a 25 anos para o câncer cervical e acima de 50 anos para o câncer vulvar (ZUR HAUSEN, 1986). Usuários de álcool e drogas ilícitas (principalmente as injetáveis), estão altamente expostos ao vírus HPV, devido ao estilo de vida que inclui comportamentos sexuais de risco, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), elevados níveis de consumo de tabaco e altas taxas de infecções sexualmente transmissíveis, como herpes simplex 2 e sífilis (PLITT, et al., 2005; KRICKER, et al., 2013; ROSA-CUNHA, et al., 2014). Estudos com mulheres usuárias de drogas ilícitas demonstram a infecção pelo HIV como preditor da infecção pelo HPV (DEV, et al., 2006; CHU, et al., 2013; ROSA-CUNHA, et al., 2014). A prevalência do HPV e sua incidência é cerca de 2 a 4 vezes maior entre as mulheres com infecção pelo HIV (PALEFSKY, et al., 1999; ROSACUNHA, et al., 2014). Poucos outros determinantes do HPV entre pessoas em condições de vulnerabilidade como usuários de drogas ilícitas foram relatados na literatura nacional e internacional, e estes podem variar de acordo com o status sorológico do HIV, a co-infecção com outros agentes infecciosos, a região em que essas pessoas residem e os hábitos de vida. A distribuição e os fatores associados com lesões do colo do útero e penianas, incluindo infecção pelo HPV, não estão bem caracterizadas nesse grupo populacional (populações vulneráveis - profissionais do sexo e usuários de álcool e drogas ilícitas). Poucos estudos foram realizados no âmbito nacional e internacional. No Maranhão, este tipo de estudo nunca foi realizado. O interesse neste tópico vem crescendo nos últimos anos, tendo em vista o crescente número de pessoas em condições de vulnerabilidade. Mesmo em trabalhos realizados no mundo, muitas questões permanecem sem esclarecimento adequado, tornando fundamentais novas e contínuas abordagens a cerca desse tema. Ressalta-se ainda a complexidade, contradições e conflitos envolvidos na questão dos profissionais do

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



sexo e dos usuários de álcool e drogas ilícitas, bem como o preconceito que os envolve, indicando dupla penalização (a social e a legal). Tratar a saúde de populações específicas e vulneráveis são um dos focos na integralidade do cuidado e redução de danos em sua real dimensão, o que é essencial para a mudança do paradigma de enfrentamento dos problemas de saúde pública. Segundo o Relatório Mundial (2013) sobre uso de drogas, houve um aumento na produção e uso indevido de drogas a partir de 2009. O Brasil, fronteira com países produtores de cocaína e portos para a África e Europa, é país que se insere na rota do tráfico internacional de drogas, o que gera novos desafios ao sistema de controle de distribuição e de controle da violência e agravos de saúde gerada pelo tráfico de drogas ilícitas. Neste contexto, a detecção do HPV (para adequado tratamento e consolidação da prevenção e vacinação) deve ser uma das prioridades das políticas públicas, pois a interrupção da cadeia de transmissão e prevenção de novas ocorrências propiciaria a redução de agravos na saúde da população como um todo, além de reduzir os custos para o tratamento de suas complicações (BRASIL, 2006). Entretanto, apesar do enfoque de prevenção e tratamento se restringir quase que exclusivamente a parcela feminina da população é fundamental associar tais condutas aos parceiros sexuais das mesmas, haja vista que a disseminação do HPV apresenta-se fortemente associada ao homem como meio propagador deste vírus entre as mulheres, influenciando diretamente nas recidivas das tratadas (TEIXEIRA et. al., 2002).

Hipótese:

- H0: A condição de vulnerabilidade (por exemplo: profissionais do sexo, utilização de álcool e drogas/substâncias ilícitas) é um fator associado/facilitador para a infecção pelo HPV.
- H1: A condição de vulnerabilidade (por exemplo: profissionais do sexo, utilização de álcool e drogas/substâncias ilícitas) não é um fator associado/facilitador para a infecção pelo HPV.

Metodologia Proposta:

- Tipo e Local de Estudo: Trata-se de um estudo epidemiológico, do tipo analítico, de modo prospectivo, com pessoas (maiores de 18 anos, sem distinção de sexo, etnia, classe social ou escolaridade) em condições de vulnerabilidade, a saber: profissionais do sexo, usuários de álcool e/ou drogas ilícitas, moradores de rua e pessoas que frequentam a Rede de Atenção Psicossocial - RAPS. A amostra será por conveniência tentando abranger o maior número de pessoas possível, assim, o número 120 é um valor estipulado e mutável.
- Coleta de Dados: Serão coletados os dados demográficos (sexo, idade, cor autodeclarada, escolaridade, atividade profissional, renda, estado civil), estilo de vida (prática de atividade física, tabagismo, consumo de álcool e drogas ilícitas, práticas sexuais, frequência e tipo de drogas ilícitas

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



utilizadas; bem como álcool), histórico de saúde, bem como de infecções sexualmente transmissíveis. Histórico de uso de medicamentos. Os dados antropométricos avaliados serão altura, peso, circunferência da cintura (CC), circunferência quadril (CQ), circunferência abdominal (CA), bioimpedância (BIA). Após registro desses dados, serão calculados os seguintes índices: de massa corporal (IMC), a relação cintura quadril (RCQ) e índice de conicidade (IC). A mensuração e classificação da pressão arterial seguirá o protocolo descrito na VII Diretrizes Brasileira de Hipertensão (2016), onde a medida da PA será aferida em aparelho de pressão digital devidamente calibrado. Os parâmetros bioquímicos analisados serão determinados utilizando técnicas de rotina com base na literatura especializada. A análise do material biológico (sangue) será realizada no Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da UFMA.

- Coleta e Processamento das Amostras Biológicas: Haverá também coleta de sangue total para determinação da concentração sérica de parâmetros bioquímicos para mensurar o estado de saúde (como por exemplo: perfil glicídico e lipídico), testes para a determinação do microrganismo causador da sífilis, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da hepatite. Para verificar a presença do papilomavírus humano e co-infecções será coletado amostras genitais, bem como da mucosa oral e anal. A coleta de material biológico da mucosa oral e anal será efetuada com swab estéril e descartável. As amostras genitais das mulheres serão coletadas a partir da colpocitologia oncótica, da colposcopia e da coleta de material endocervical para verificação da presença ou ausência de HPV (material estéril e descartável). As amostras genitais dos homens serão coletadas por profissional devidamente capacitado (médico ou enfermeiro). Será utilizado swab estéril e descartável para coleta de secreção da região uretral. Para a detecção do HPV será realizada extração de material genético (DNA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo Nested, com os primers PGMY 09 e PGMY11 (primeira rodada), no segundo round os primers GP+5 e GP+6. Para verificação da qualidade e existência de DNA nas amostras, serão utilizados os primers GH20 e PC04 para o gene constitutivo humano da -globina. Para verificação do tipo de HPV será realizado PCR do tipo alelo específica e sequenciamento automatizado. A determinação das possíveis co- infecções será realizada utilizando-se a técnica molecular de PCR Multiplex. Serão utilizados primers validados na literatura científica para amplificação de múltiplos agentes infecciosos, como: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum, Trichomonas vaginalis e Herpes tipos I e II. As etapas dos procedimentos para detecção de HIV, Hepatite e Sífilis será realizada de acordo com o Fabricante dos Kits Diagnósticos. Participantes que tiverem resultados reagentes para HIV serão devidamente orientados (com auxílio dos profissionais do serviço de saúde) e encaminhados para o teste confirmatório no Centro de Testagem Anônima – CTA Lira, do município de São Luís.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Critério de Inclusão:

Homens e Mulheres, sem distinção de cor da pele ou classe social, maiores de 18 anos, que apresentam-se em condições de vulnerabilidade.

Critério de Exclusão:

Participantes que não aceitem responder aos questionamentos sobre os dados demográficos, estilo de vida e histórico de doenças e/ou que se recusarem a coletar a amostra biológica. Participantes que apresentem condições claras de desconforto com a pesquisa ou com a coleta das amostras biológicas. Gestantes e Lactantes; bem como pessoas com dificuldades em entender o objetivo da pesquisa ou possuir deficiências cognitivas que impossibilitem responder o questionário com dados fidedignos.

Metodologia de Análise de Dados:

Para a avaliação da relação entre os dados epidemiológicos e clínicos e a presença de HPV, serão utilizados o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística será feita no programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

Desfecho Primário:

Detectar o vírus HPV em pessoas que vivem em condições de vulnerabilidade.

Desfecho Secundário:

Identificar os fatores associados ao HPV em pessoas que vivem em condições de vulnerabilidade e possibilitar novos delineamentos de estratégias em saúde para essa população, como educação em saúde (prevenção) e profilaxia (vacina).

Tamanho da Amostra no Brasil: 120

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a presença do papilomavírus humano em pessoas em condições de vulnerabilidade, bem como seus fatores associados.

Objetivo Secundário:

- Descrever o perfil sócio demográfico da população de estudo;
- Verificar condições de saúde, hemodinâmica e os índices antropométricos;
- Analisar a frequência do HPV e seus tipos específicos;

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



- Verificar a prevalência de HIV, Hepatite e Sífilis;
- Verificar a presença de outros agentes causadores de ISTs, como o vírus da Herpes I e II, as bactérias Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum e o protozoário Trichomonas vaginalis;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos (perfil glicídico e lipídico) e sua correlação com dados de saúde, antropométricos e hemodinâmicos;
- Estabelecer possíveis correlações entre a presença dos vírus HPV com outros agentes causais de IST, como os vírus do HIV, Hepatite e Herpes;
- Estabelecer possíveis correlações entre a presença dos vírus HPV e co-infecções como Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum e Trichomonas vaginalis;
- Averiguar a presença de fatores de risco para a infecção pelo HPV nesta população, através das características sociodemográficas, hábitos de vida e histórico de saúde, laboratoriais e clínicas;
- Averiguar a possibilidade de desenvolvimento de uma árvore de decisão preditiva ou algoritmo para classificação entre hígidos e possíveis portadores de HPV, utilizando os dados coletados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O pesquisador relatou que "Os riscos para o participantes são mínimos e contornáveis. Para a pesquisa do HPV serão coletadas amostras da mucosa oral, anal e genital, por profissionais treinados e com experiência, utilizando material estéril e descartável. Esses procedimentos são indolores, mas pode gerar um pequeno incômodo passageiro no local, mas não causará agravos a saúde. Deste modo, a equipe da pesquisa será breve na coleta dessas amostras, seguindo as normas de biossegurança em saúde e respeitando as queixas do participante, para causar o mínimo de incômodo possível. A coleta de sangue também pode gerar um pequeno incômodo, mas será realizada por pesquisadores treinados, com material estéril e descartável, de acordo com as normas de biossegurança em saúde. Após a coleta de sangue pede-se que o participante pressione o local da coleta por no mínimo 3 minutos após a punção, evite flexionar o braço se a punção foi feita na altura da dobra do braço e antebraço, não massageie o local da coleta e não carregue peso no braço que foi feita a punção sanguínea. A punção sanguínea pode causar um leve desconforto e raramente o aparecimento de hematomas que desaparecem em até 48 horas. Caso ocorra hematoma orienta-se ao paciente: colocar compressas de gelo por 15 min. (nas primeiras seis horas). Se necessário pode-se prolongar este tempo por mais 2 ou 3 horas. Em seguida pode ser colocada compressa morna para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente".

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Benefícios:

O pesquisador relatou que "Os benefícios são individuais (para o participante) e coletivos (para a comunidade científica e sistema de saúde). Com esta pesquisa serão obtidos dados importantes sobre o vírus HPV e seus fatores associados e assim será possível melhorar o conhecimento sobre a distribuição da doença e estudar a possibilidade de novas formas de tratamento, profilaxia (vacina) e prevenção (campanhas e atendimento). O participante saberá de dados pertinentes a sua saúde e se possuir algum agravo será devidamente esclarecido e orientado/encaminhado para o serviço de saúde mais adequado".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante pois o Papilomavírus Humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais prevalente no mundo inteiro. No Brasil há 137.000 novos casos anualmente. Pessoas em condições de vulnerabilidade, especialmente os usuários de drogas ilícitas (principalmente as injetáveis), estão altamente expostas ao vírus HPV, devido ao estilo de vida que inclui comportamentos de risco, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), elevados níveis de consumo de tabaco e altas taxas de infecções sexualmente transmissíveis, como herpes simplex 2 e sífilis. Estudos com mulheres usuárias de drogas ilícitas demonstram que a imunodeficiência como preditor da infecção pelo HPV e que a prevalência do HPV e sua incidência é cerca de 2 a 4 vezes maior entre as mulheres com infecção pelo HIV. Poucos outros determinantes do HPV entre pessoas em condições de vulnerabilidade foram relatados na literatura nacional e internacional, e estes podem variar de acordo com agentes infecciosos, coinfeção, a região em que essas pessoas residem e os hábitos de vida. Deste modo, considerando o aumento dos números de pessoas em condições de vulnerabilidade, em especial usuários de álcool e drogas ilícitas, nas últimas décadas, e a fragilidade do sistema imunológicos desses o objetivo deste estudo é verificar a presença do papilomavirus humano em pessoas em condições de vulnerabilidades, bem como verificar seus fatores associados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional no 001/2013(item 3/ 3.3). O protocolo apresenta ainda as declarações de anuência, declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



resguardando o sigilo e a confidencialidade.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_777121.pdf	01/11/2017 11:37:02		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.pdf	01/11/2017 11:34:50	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	BTMA.pdf	01/11/2017 11:33:59	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	Carta.pdf	01/11/2017 11:33:13	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	01/11/2017 11:30:37	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/11/2017 11:29:57	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/11/2017 11:28:36	SALLY CRISTINA MOUTINHO	Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



			MONTEIRO	
Declaração de Pesquisadores	TERMOS.pdf	01/11/2017 11:28:04	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/11/2017 11:26:52	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Declaração do Patrocinador	termooutorgafapema.pdf	11/09/2017 14:02:35	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	BTMAautorizacao.pdf	11/09/2017 13:55:47	SALLY CRISTINA MOUTINHO	Aceito
Outros	BTMAautorizacao.pdf	11/09/2017 13:55:47	MONTEIRO	Aceito
Outros	autorizacaoHPV3.pdf	11/09/2017 13:49:52	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	autorizacaoHPV2.pdf	11/09/2017 13:49:27	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	autorizacaoHPV1.pdf	11/09/2017 13:46:59	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	11/09/2017 13:44:32	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	Questionario.pdf	11/09/2017 13:32:33	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 22 de Novembro de 2017

Assinado por:

**Rita da Graça Carvalho
Frazão Corrêa
(Coordenador)**

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227**Bairro:** CENTRO**CEP:** 65.020-070**UF:** MA**Município:** SAO LUIS**Telefone:** (98)2109-1250**E-mail:** cep@huufma.br

Anexo B: Artigo submetido na revista *BMC Infectious Disease*

BMC Infectious Diseases

PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND CO-EXISTENT SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS AMONG FEMALE

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	INFD-D-19-01834	
Full Title:	PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND CO-EXISTENT SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS AMONG FEMALE	
Article Type:	Research article	
Section/Category:	Sexually transmitted diseases	
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão	Dra Sally Cristina Moutinho Monteiro
Abstract:	<p>Background: human papillomavirus is one of the most common sexually transmitted infections in the world, with a higher prevalence among young adults at the onset of sexual activity, Methods: prospective cross-sectional study were performed among 162 women aged between 18 and 73 years. For the DNA/HPV isolation, samples were collected and placed in the HC2 DNA Collection buffer (QIAGEN, CA, USA), and frozen at -20°C until processed. DNA/HPV extraction were performed by using QIAamp DNA Mini and Blood kit (QIAGEN, CA, USA) according to manufacturer instructions. Total DNA was isolated, eluted in 100 mL AE buffer and stored at 80°C. Extracted DNA was quantified using a NanoVue unit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Statistical analysis was performed using IBM SPSS® software version 23. Data were initially subjected to descriptive analysis, plus mean and standard deviation. Results: among the participants, 61.7% had DNA / HPV and 66.7% were users of illicit drugs and 59.3% were non-users, making them statistically significant. Among DNA/HPV positive users there was a higher proportion of sexually transmitted infections (STIs) (27.9%) compared to non-users (9.27%) ($p > 0.05$).</p> <p>Conclusion: the vulnerability of women to STIs and the high influence caused by the socioeconomic context in the course of these infections, the importance of public policies that establish appropriate strategies for their prevention, early diagnosis and treatment is emphasized, so that there is. The Research Ethics Committee of the University Hospital of the Federal University of Maranhão approved the project under the number CAAE 76328917.5.0000.5086, and informed consent was obtained from all subjects.</p>	
Corresponding Author:	Ilka Kassandra Pereira Belfort Universidade Federal do Maranhão São Luis, MA BRAZIL	
Corresponding Author E-Mail:	ilkabelfort@gmail.com	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Maranhão	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Ilka Kassandra Pereira Belfort	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Ilka Kassandra Pereira Belfort Carla Figueredo Belfort Leite	

	Francisco Pedro Belfort
	Renata Lemos Gaspar
	Pablo Matos Monteiro
	Lucas Henrique de Lima Costa
	Ana Paula Almeida Cunha
	Flávia Castello Branco Vidal
	Allan Kardec Duailibe Barros
	Sally Cristina Moutinho Monteiro
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	David Alvarez chagocuba@yahoo.com
	Gilmárcio Martins gilmarcio@yahoo.com.br
	Maria de Paula engenheira.paula@gmail.com
Additional Information:	
Question	Response
Has this manuscript been submitted before to this journal or another journal in the BMC series?	No

PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND CO-EXISTENT SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS AMONG FEMALE

Ilka Kassandra Pereira Belfort¹; Carla Figueredo Belfort Leite²; Francisco Pedro Belfort³; Renata Lemos Gaspar⁴; Pablo Matos Monteiro⁵; Lucas Henrique de Lima Costa⁶; Ana Paula Almeida Cunha⁷; Flavia Castello Branco Vidal⁸; Allan Kardec Barros⁹; Sally Cristina Moutinho Monteiro¹⁰.

1. Postgraduate Program in Biotechnology - Northeast Network of Biotechnology. (RENORBIO). Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA – Brazil. e- mail: ilkabelfort@gmail.com
2. Academic of the Course of Pharmacy and Biochemistry. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e- mail: carlabelfort@gmail.com
3. Postgraduate Program in Adult Health - PPGSAD. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e- mail: fp_mendes3@hotmail.com
- 4 Academic of the Course of Pharmacy and Biochemistry. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e- mail: renatagaspar20@gmail.com
- 5 Academic of the Course of Pharmacy and Biochemistry. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e- mail: pablomonteiro50@gmail.com
6. Academic of the Course of Pharmacy and Biochemistry. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e- mail: lhlcosta@hotmail.com
7. Postgraduate Program in Adult Health - PPGSAD. Federal University of Maranhão UFMA. São Luís, MA - Brazil. e-mail: anapcunha03@gmail.com
8. Postgraduate Program in Adult Health - PPGSAD. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e-mail: flavidal@hotmail.com
9. Postgraduate Program in Biotechnology - Northeast Network of Biotechnology. (RENORBIO). Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA – Brazil. e- mail: akduailibe@gmail.com
10. Postgraduate Program in Adult Health - PPGSAD. Federal University of Maranhão - UFMA. São Luís, MA - Brazil. e-mail: sallycris@yahoo.com

Endereço para correspondência: Prof.^a Dr.^a Sally Cristina Moutinho Monteiro Department of Pharmacy – DEFAR/UFMA Av. dos Portugueses, 1966

Bairro: Bacanga - CEP 65080-805

São Luís - MA

E-mail: sallycris@yahoo.com

Institution: Federal University of Maranhão - UFMA, São Luís, MA - Brazil.

ABSTRACT

Background: human papillomavirus is one of the most common sexually transmitted infections in the world, with a higher prevalence among young adults at the onset of sexual activity, Methods: prospective cross-sectional study were performed among 162 women aged between 18 and 73 years. For the DNA/HPV isolation, samples were collected and placed in the HC2 DNA Collection buffer (QIAGEN, CA, USA), and frozen at -20°C until processed. DNA/HPV extraction were performed by using QIAamp DNA Mini and Blood kit (QIAGEN, CA, USA) according to manufacturer instructions. Total DNA was isolated, eluted in 100 mL AE buffer and stored at 80°C. Extracted DNA was quantified using a NanoVue unit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Statistical analysis was performed using IBM SPSS® software version 23. Data were initially subjected to descriptive analysis, plus mean and standard deviation. Results: among the participants, 61.7% had DNA / HPV and 66.7% were users of illicit drugs and 59.3% were non-users, making them statistically significant. Among DNA/HPV positive users there was a higher proportion of sexually transmitted infections (STIs) (27.9%) compared to non-users (9.27%) ($p > 0.05$). Conclusion: the vulnerability of women to STIs and the high influence caused by the socioeconomic context in the course of these infections, the importance of public policies that establish appropriate strategies for their prevention, early diagnosis and treatment is emphasized, so that there is. The Research Ethics Committee of the University Hospital of the Federal University of Maranhão approved the project under the number CAAE 76328917.5.0000.5086, and informed consent was obtained from all subjects.

Key-words: Papillomaviridae; Street Drugs; Sexually Transmitted Diseases; health promotion

BACKGROUND

Human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infections (STIs) in the world, with a higher prevalence among young adults at the onset of sexual activity (WENDLAND et al., 2018a). Approximately 291 million sexually active women come into contact with the virus during their lifetime (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013), but infection can be eliminated without developing clinical signs within 12 months (DUARTE et al., 2017; GRADÍSSIMO, BURK, 2017). In Brazil, according to the preliminary results of the Epidemiological Study on the National Prevalence of HPV Infection (POP-Brazil), the estimated prevalence of HPV is 54.6%, with a mean age of 20.6 years (BRASIL, 2017).

Currently more than 200 types of HPV have been identified and can be classified as low oncogenic risk when associated with the development of warts and benign lesions or high oncogenic risk when associated with the development of cancer. Persistent high-risk HPV infection, including types 16 and 18, are at increased risk of developing cervical intraepithelial lesions that may progress to cervical cancer (CAMARGO et al., 2018; GOODMAN, 2015). HPV has been reported as responsible for at least 99% of cervical cancers worldwide (SERRANO, et al., 2017, WHO, 2010), and is associated with the development of other types of cancer of the genital tract in men and women, such as penile cancer and anal cancer (VIARISIO, GISSMANN, TOMMASINO, 2017).

Cervical cancer is the third most frequent tumor in the female population and the fourth leading cause of cancer death in Brazil (INCA, 2018; IARC, 2012), accounting for 16,340 (7.9%) new cases and 5,430 deaths per year, according to the National Cancer Institute (INCA, 2016). The high prevalence of HPV is associated with demographic, socioeconomic and sexual behavior (GOODMAN, 2015, WOLDAY et al., 2018). Among the demographic and socioeconomic factors, there are schooling and low income, as well as the difficulty in accessing health services; in relation to factors associated with sexual behavior, there are huge number of partners, the early onset of the sexual activity, multiparity and condom non-use. (GUIMARÃES et al., 2018; DEV et al., 2006).

Studies have reported that persistent HPV infection is facilitated by inflammatory processes caused by other sexually transmitted agents, such as *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* and *Treponema pallidum* (WOLDAY et al., 2018; LUGO, et al., 2018). In addition, coinfections elevate the risk of progression to malignancy probably due to increased impairment of the immune system (VRIEND et al., 2015). The vaginal microbiota influences the innate and adaptive responses of mucosal and cutaneous surfaces, differing according to the site of

infection of the virus, favoring the elimination or persistence of HPV infection in the infected tissue (SCHIFFMANN et al., 2016).

Illicit drug users are exposed to additive and intoxicating effects of drugs, which alter judgment and inhibition, often causing impulsive and unsafe sexual behaviors such as multiple partners and unprotected sex (without condom use) (GUIMARÃES et al., 2018; WENDLAND et al., 2018a; PAQUETTE et al., 2017; DEV et al., 2006; PLITT, et al., 2007; RAWSON, et al., 2002), and in the present study. Although addiction affects sexual behavior in different ways, it can lead to the exchange of sex for drugs and / or money, innumerable anonymous partners, and a greater likelihood of relating to social networks with a high prevalence of STIs (WENDLAND et al., 2018a; PAQUETTE et al., 2017; PLITT, et al., 2007; SEMPLE, et al., 2005; RAWSON, et al., 2002).

Some studies report a higher prevalence of STIs among young adults between the ages of 16 and 44 who are illicit drug users (PAQUETTE et al., 2017; DEGENHARDT; HALL, 2012). There are few published studies on STIs in the drug user population, as assessed in general household surveys. Thus, information on sexual and reproductive health behaviors are important for the development of effective preventive strategies against anogenital cancers in this population. The objective of this study was to determine the prevalence rates of HPV infection and coinfection by other STIs in women who use illicit drugs.

METHODS

Study Population

This prospective cross-sectional study were performed among 162 women aged between 18 and 73 years, who have been patients at the public health units of gynecological care in São Luís - MA, Brazil from August 2017 to September 2018. Exclusion criteria included menstruation, hysterectomy, women who did not start sexual activity, pregnant or at less than 45 days postpartum.

Before the questionnaire administration, willing participants were given all the necessary information about the study, before they signed the informed consent form. A structured standardized questionnaire was administered to obtain detailed data on socio-demographic characteristics, and sexual, reproductive and gynecologic history. These data included age, literacy, marital status, ethnicity, age at first intercourse, parity, lifetime number of sexual partners, methods of contraception and history of IST infections.

We define drug users in this chapter as those who are addicted to the use of opiates (e.g., heroin), cocaine (e.g., freebase and crack), and methamphetamine (meth), and marijuana.

The Research Ethics Committee of the University Hospital of the Federal University of Maranhão approved the project under the number CAAE 76328917.5.0000.5086, and informed consent was obtained from all subjects. The free and informed consent form was obtained through signatures of the participants.

Cervical cytology and sexually transmitted infection

Conventional cytological smears were obtained with Ayres spatula (ectocervical sample) and endocervical brush (endocervical sample), extended in a glass slide, fixed with ethanol, and stained using the Pap technique. Cytological examinations of Pap smear were reported using the 2001 Bethesda Reporting System. Microbiological findings such as *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp.*, coccus and other bacilli were also identified through the cytological test.

The presence of virus da hepatite B - HBV (VIKIA HBsAg, bioMérieux Brasil), virus da hepatite C - HCV (Imuno- Rápido HCV da Wama Diagnóstica), virus da imunodeficiência - HIV (HIV Tri Line, Bioclin, Brasil) and Syphilis (DPP® Rapid Test Syphilis Biomaguinhos) were determined by using rapid tests based on immunochromatographic method device or strip, according to the manufacturer's instruction.

Specimen collection from DNA extraction

For the DNA/HPV isolation, samples were collected and placed in the HC₂ DNA Collection buffer (QIAGEN, CA, USA), and frozen at -20°C until processed. DNA/HPV extraction were performed by using QIAamp DNA Mini and Blood kit (QIAGEN, CA, USA) according to manufacturer instructions. Total DNA was isolated, eluted in 100 µL AE buffer and stored at -80°C. Extracted DNA was quantified using a NanoVue unit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK).

Detection of HPV

Presence from DNA/HPV was detected using nested polymerase chain reaction (PCR) with the primer sets PGMY09/11 (first round PCR) and GP+5/GP+6 (second round PCR); these primers amplify a segment of the L1 gene and evaluated by amplification of the human β-globin gene. The first round of amplification was carried out in a 25 µL reaction volume by using 5µL DNA, 8.7 µL water, 2.5 µL 10X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM each dNTP, 30 µM each primer (MY09 and MY11), and 0.5 µL Platinum Taq DNA

polymerase (Invitrogen). Amplification was performed according to the following protocol: 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 51.5°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, followed by a final step at 72°C for 7 minutes. The second amplification was also carried out in a 25 µL reaction volume by using 5 µL amplified DNA, 9.7 µL water, 2.5 µL 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 30µM of each primer (GP5+ and GP6+), and 0.5 µL Platinum Taq DNA polymerase. Amplification was performed as follows: 94°C for 5 minutes, followed by 45 cycles at 94°C for 45 seconds, 40°C for 60 seconds, and 72°C for 60 seconds, and a final step at 72°C for 10 minutes.

Amplification products were evaluated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in 1X TBE buffer for 30 minutes at 5 V/cm in a horizontal unit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Bands were stained with 0.1% Gel Red (Invitrogen) and visualized using an ultraviolet transilluminator (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Data Analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS® software version 23. Data were initially subjected to descriptive analysis, plus mean and standard deviation. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normality of data. The Student t-test was used to evaluate associations between groups of the independent variables with normal distribution. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The study group consisted of 162 women, divided into two groups: users of illicit drugs and non-users of illicit drugs, with a mean age of 34.3 years, with illicit drug users in age group from 18 to 30 years (45%).

With regard to sociodemographic data, it was verified that among the drug users 64.81% completed the average level; 61.10% were self-described with brown skin color and 57.40% were single. As far as sexual behavior is concerned, 70.37% of drug users are: first coitus between 15 and 19 years; 53.7% had more than 7 sexual partners so far; 74.07% and 83.33% practice oral and anal sex, respectively. The study participants are predominantly non-smokers (68.51% among users and 90% among non-users) and make steady use of alcoholic beverages, which exceeds the World Health Organization's recommendations (proportionally 2 doses per day or drink for 2 days). Regarding condom use, 75.92% of drug users say they do not use it while 62.03% of non-users use this barrier method in (Table 1).

Table 1. Socio-demographic parameters of the study groups

	Drug Users N = 54	Not Drug Users N = 108	p
Age distribution			
18 a 30	13 (24%)	26 (45%)	p<0.01
31 a 43	27 (50%)	64 (33,33)	
44 +	14 (25,92)	18 (16,67)	
Education			
Illiterate	1 (1,87%)	5 (4,62%)	p<0.01
Primary and Middle	13 (24,07%)	50 (46,29%)	
High school	35 (64,81%)	28 (25,92%)	
University	5 (9,25%)	25 (23,14%)	
Race/ethnicity			
Preta	21 (38,88%)	43 (39,81%)	p<0.01
Branca	02 (3,70%)	65 (60,19%)	
Parda	31 (57,40%)		
Married status			
Single	30 (55,55%)	40 (37,03%)	p<0.01
Married/living together	24 (44,44%)	68 (62,97%)	
Age at first intercourse			
11 a 14			p<0.01
15 a 19	7 (1,85%)	13, (19,5%)	
20 a 24	40 (27,78%) 7 (1,85%)	25, (46,30%) 41, (12,04%)	
Number sexual partners			
1 a 2	5 (9,27%)	60 (55,55%)	p<0.01
3 a 6	20 (37,03%)	38 (35,18%)	
7+	29 (53,7%)	10 (9,27%)	
Practice of anal sex			
Yes	40 (74,07%)	60 (55,55%)	p<0.01
No	14 (25,93%)	48 (44,45%)	
Practice of oral sex			
Yes	45 (83,33%)	63 (58,33%)	p<0.01
No	9 (16,67%)	45 (41,67%)	
Smoking			
Yes	17 (31,49%)	10 (9,26%)	p<0.01
No	37 (68,51%)	98 (90,74%)	
Alcohol			
Yes	36 (66,66%)	70 (64,81%)	p<0.01
No	18 (33,34%)	38 (35,19%)	
Anticoncepcional Oral			
Yes	3 (5,56%)	14 (12,97%)	p<0.01
No	51 (94,44%)	94 (87,03%)	
Condom use			
Yes			p<0.01
No	23 (42,6%) 41 (75,92%)	67 (62,03%) 31 (57,4%)	

*T – Student e Qui-Quadrado

The results of the preventive tests (Table 2) showed that 88.88% of drug users and 92.59% of non-users presented cytological data with no malignancy / alterations. However, illicit drug users have a higher percentage of cytologic changes (low grade SIL + high grade SIL - 11.1%) than nonusers (7.4%), which are statistically significant.

Table 2. Cytology Diagnosis in the Study Groups

	Drug Users N = 54	Not Drug Users N = 108	P*
Normal	48 (88,88%)	100 (92,59%)	$p < 0.01$
Low grade SIL	3 (5,55%)	4 (3,7%)	$p < 0.03$
High grade SIL	3 (5,55%)	4 (3,7%)	$p < 0.03$

*T – Student e Qui-Quadrado

Among the participants, 61.7% had DNA / HPV and 66.7% were users of illicit drugs and 59.3% were non-users, making them statistically significant. Among DNA/HPV positive users there was a higher proportion of sexually transmitted infections (STIs) (27.9%) compared to non-users (9.27%) ($p > 0.05$) (Table 3).

Table 3. Prevalence of HPV and STIs by Genital HPV Infection Status in the Study Groups

	Drug Users N = 54		P	Not Drug Users N = 108		p
	HPV+	HPV-		HPV+	HPV-	
HPV	36 (66,7%)	18 (33,33%)	$> 0,05$	64 (59,3%)	44 (40,74%)	$> 0,05$
Candida	5 (9,3%)	4 (7,4%)	$> 0,05$	7 (6,5%)	12 (11,11%)	$> 0,05$
Trichomonas	5 (9,3%)	1 (1,85%)	$> 0,05$	1(0,92%)	0 (0%)	$> 0,05$
Syphilis	5 (9,3%)	0 (0%)	$> 0,05$	2 (1,85%)	2 (1,85%)	$> 0,05$

*Não foram encontradas participantes com teste reativo para HCV (hepatite C), HBsAg (hepatite B) e HIV (vírus da imunodeficiência humana).

Table 4 shows the co-infections in women with DNA / HPV positive, where HPV is frequently associated with another infectious agent in both groups. In both users and non-users, the percentage of co-infections is similar (61.1% and 58.33%, respectively - $p < 0.05$). This data configures that both groups are exposed to more than one type of IST in their relationship environments.

Table 4. Prevalence of co-infection in women with HPV+ in the Study Groups

	Drug Users N = 54	Not Drug Users N = 108	p
HPV	1 (1,85%)	3 (2,77%)	<0.02
HPV + 1 IST	16 (29,63%)	35 (32,41%)	<0.02
HPV + 2 IST	16 (29,63%)	22 (20,37%)	<0.02
HPV + 3 IST	6 (5,55%)	1(1,85%)	<0.02

*T – Student e Qui-Quadrado

DISCUSSION

As predicted by Goodman (2015) and Wolday (2018), the high prevalence of HPV is related to socioeconomic, demographic, and sexual behavior. According to Dev et al., (2006) and Guimaraes (2018), demographic and socioeconomic factors are related to: low level of schooling, low income and sexual behavior, which includes high number of partners, early sexual activity, lack of condom use and multiparity.

Thus, the results of this research are in agreement with the authors, since it was found that the participants in our research do not have much study because, among the participants of the group of illicit drug users, the majority (64,81 %) only have secondary education and those of the non-users group, the majority (46.29%) only have elementary education. In Machado's (2017) research, it corroborates with our data that high school is preponderant in the results of the researched ones confirming the importance of the level of schooling in the prevention of diseases, especially the transmissible ones.

Miranda et al. (2013), referring to the level of education, clarifies that the higher the educational level, the greater the concern about the danger of contracting STIs, as well as the interest and understanding of the content about prevention presented to them. Therefore, the low educational level of the women interviewed in our study may justify the 61.7% rate of DNA/HPV.

As a significant difference among users of illicit drugs, it was found that 70.37% had the first coitus between 15 and 19 years; 53.7% had more than 7 sexual partners so far; 74.07% practice oral sex and 83.33% anal sex.

Regarding age, Queiroz, Cano and Zaia (2007) report that HPV infection has a higher incidence among women in the age group between 20 and 40 years, since in this age group, sexual practice is more frequent. They also emphasize that it is in this age group that the disease presents its most latent form, and that because of this, its identification becomes more difficult, a fact that facilitates the transmission.

Sharing the same thinking, Sellors et al. (2003) states that HPV infection is 3 to 4 times more prevalent in young adult women than in women aged 35-55 years. (SELLORS et al., 2003 apud NAKAGAWA, SCHIRMER, BARBIERI, 2010).

Corroborating with our findings, Fedrizzi (2011) argues that sexual behavior, such as large numbers of partners and early initiation of sexual activity, are factors that relate to HPV virus contamination and also to other types of STDs. Epidemiological studies on infection (3,4) have documented a substantial preponderance in which, early age of sexual debut and low adherence to condom use constitute risk factors for both infection and reinfection by HPV.

Among the participants in the positive DNA/HPV study, there was a higher proportion of sexually transmitted infections (STIs) among illicit drug users (27.9%) when compared to non-users (9.27%) ($p > 0,05$).

According to the National Cancer Institute (INCA), it is proven that 50% to 80% of women with active sex life will have some type of infection caused by one or more types of HPV at some point. It reports that most of these infections will be transient, due to the immune system fighting them, especially among younger ones. However, it emphasizes that although the immune system develops antibodies, they will not always be sufficient to fight and eliminate viruses (INCA, 2019).

In the words of Simões and Zanusso Júnior (2019, 104) it is had that: [...] Human Papilloma Virus (HPV) infection is the main risk factor for cervical cancer. Other factors have been identified as at risk, such as socioeconomic and environmental and lifestyle, which include early onset of sexual activity, plurality of sexual partners, smoking, inadequate hygiene habits and prolonged use of oral contraceptives. In the early stages cervical cancer is asymptomatic, and the discovery of the disease is done through the result of cytopathological examination (Papanicolaou) that should be done regularly.

However, for Rosa et al (2009), only the presence of HPV does not constitute sufficient reason for the presence of malignancy, since only a small percentage is that it evolves into cancer and when there is the presence of high oncogenic risk and pre-malignant lesions that persist for decades.

Among the different types of viruses classified as high-risk, Campisi (2009) and Scudellari (2013), report that the highest risk for causing infections are HPV-16 and HPV-18, when compared to the other types, once that these are associated to the DNA of the host, being associated in a world-wide level, to the cases of cancer. The authors also say that the vaccine becomes a preventive option, but it only acts as a preventive way, in people who had access to it before they started sexual life.

When associated with HPV + and other STIs in drug users we had syphilis as the main related infection (9.3%). Compared to data from the Epidemiological Bulletin of Syphilis we had a lower but worrying percentage, since studies indicate the return of this epidemic in Brazil (BRASIL, 2018). In a study by Lopes et al. (1997) in a Brazilian penitentiary reported that the prevalence of active syphilis in the studied population was (5.7%) which they are numbers that draw near to those found in our study. In view of the above, we see the need for strengthening in the incentive and dissemination in the realization of rapid tests offered in basic health units. The results of the preventive tests showed that 88.88% of drug users and 92.59% of non-users presented cytological data with no malignancy / alterations. However, illicit drug users have a higher percentage of cytologic changes (low grade SIL + high grade SIL - 11.1%) than nonusers (7.4%), which are statistically significant.

Among the users of illicit drugs, the risk of STI contamination becomes much greater, due to sexual behaviors being mostly impulsive and insecure, with unprotected sex and with multiple partners (GUIMARÃES et al., 2018; WENDLAND et al., 2018a).

It was evidenced in the research that among users of illicit drugs, 74.07% and 83.33% practice anal and oral sex respectively; 94.44% do not take contraceptives. However, we did not identify relation between contraceptive and higher risk for infection (ENTIAUSPE, et al, 2014).

In fact, drug users are a population with a high index of vulnerability to HIV infection, both due to the proper forms of drug use with needle sharing and other materials in the non-parenteral use, as well as through the practice of non- insurance, which often reverts to one of the ways they can get the drugs they use (ROSS, WILLIAMS, 2001).

According to Caiaffa et al. (2006), in the late 1980s and mid-1990s injecting drug users (IDUs) were most responsible for the country's HIV epidemic.

In this way, it is perceived that drug users constitute a population that must be constantly vigilant, since the contagion of the various STIs occurs, in the great majority, among those who live a disorderly life and without great concern for hygiene and health. In addition, the transmission of HPV occurs in various ways, either by contact between the sex organs, in anal intercourse that can lead to viral infections and neoplasias, and even through oral sex (ROSA et al., 2009).

The prevention of the virus is based mainly on the adoption of condoms during sexual intercourse by both women and men, and preventive exams such as the pap smear that detects in early time existent neoplasias (CIRINO; ICHIATA: BORGES, 2010).

It should be emphasized that the National Cancer Institute (INCA, 2019) states that persistent infection, caused by HPV, plays a major role in the development of cervical cancer, since studies show that the virus is present in more of 90% of confirmed cases of cervical cancer.

CONCLUSION

In this study, we identified a higher probability of positive HPV associated with other STIs for the following women: single, brown, middle school, alcohol-consuming, and multiple partners. In this context and in view of the vulnerability of women to STIs and the high influence caused by the socioeconomic context in the course of these infections, the importance of public policies that establish appropriate actions / strategies for their prevention, early diagnosis and treatment is emphasized, so that there is promotion in the quality of life of this population.

AUTHORS' CONTRIBUTION

All the authors contributed to the project construction, evaluation, data collection and article validation.

FUNDING

The HPV Study infrastructure is supported by the Maranhão Tumor and DNA Bank (BTMA - UFMA). Similarly, FAPEMA provided financial support for data analysis.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported in part by research funding from the Maranhão Scientific and Technological Research and Development Foundation (FAPEMA). The opinions expressed in this article are those of the authors.

We thank the Family Health Strategy teams, the women surveyed, the HPV Research Group and the participating Health Units.

REFERENCES

- [1]WENDLAND, E. M. et al. Sexual behavior across the transition to adulthood and sexually transmitted infections. *Medicine*, v. 97, n. 33, p. e11758, 2018a.
- [2]WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) . *Sexually Transmitted Infections (STIs)*. [s.l: s.n.].

- [3]DUARTE, D. V et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Screening among Riverside Women of the Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, v. 39, n. 7, p. 350–357, 2017.
- [4]GRADÍSSIMO, A.; BURK, R. D. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 17, n. 4, p. 379–391, 2017.
- [5]BRASIL. Dados do Boletim Epidemiológico de Sífilis – 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2018>. Acesso em 16 de maio de 2019.
- [6]LOPES, F. et al. Prevalência de HIV, papilomavírus humano e sífilis na Penitenciária Feminina da Capital, São Paulo, 1997-1998. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(6):1473-1480, nov-dez, 2001.
- [7]GOODMAN, A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ*, v. 350, p. 1–11, 2015.
- [8]SERRANO, B.; BROTONS, M.; BOSCH, F.X.; BRUNI, L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract. Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 Sep 2. pii: S1521-6934(17)30124-4.
- [9]WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Immunization, Vaccines and Biologicals. Última atualização: setembro de 2010. Disponível em: www.who.int/immunization/topics/hpv/en/. Acesso em novembro 2017.
- [10]VIARISIO, D.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. *Current Opinion in Virology*, v. 26, p. 56–62, 2017.
- [11]INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Detecção Precoce. 2001. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/deteccao_precoce. Acesso em: 02 maio de 2019.
- [12]IARC. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Data sources and methods. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/DataSource_and_methods.aspx. Acesso em outubro de 2017.
- [13]WOLDAY, D. et al. HPV genotype distribution among women with normal and abnormal cervical cytology presenting in a tertiary gynecology referral Clinic in Ethiopia. *Infectious Agents and Cancer*, v. 13, n. 1, p. 28, 2018.
- [14]GUIMARÃES, R. A. et al. Risk behaviors for sexually transmitted infections in noninjecting drug users: A cross-sectional study. *International Journal of STD & AIDS*, p. 095646241775033, 2018.

- [15] DEV, D. et al. Incidence of and risk factors for genital human papillomavirus infection in women drug users. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, v. 41, n. 4, p. 527–529, 2006
- [16] VRIEND, H. J. et al. Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without *Chlamydia trachomatis* co-infection. *Cancer Medicine*, v. 4, n. 10, p. 1589–1598, 2015.
- [17] SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, 2016.
- [18] PAQUETTE, R. et al. Illicit drug use and its association with key sexual risk behaviours and outcomes: Findings from Britain's third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *PLoS One*, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2017.
- [19] PLITT, S.S.; SHERMAN, S.G.; VISCIDI, R.P.; STRATHDEE, S.A.; FULLER, C.M., [20] RAWSON, R.A.; WASHTON, A.; DOMIER, C.P.; RIEBER, C. Drugs and sexual effects: Role of drug type and gender. *Journal of Substance Abuse Treatment*. v. 22; 103–108. 2002.
- [21] SEMPLE, S.J.; ZIANS, J.; GRANT, I.; PATTERSON, T.L. Impulsivity and methamphetamine use. *Journal of Substance Abuse Treatment*. v. 29; 2005; 85–93.
- [22] DEGENHARDT, L.; HALL, W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. *The Lancet*, v. 379, n. 9810, p. 55–70, 2012.
- [23] MIRANDA, A.E; RIBEIRO, D.; REZENDE, E.F.; et al. Associação de conhecimento sobre DST e grau de escolaridade entre conscritos em alistamento ao Exército Brasileiro. Brasil, 2007. *Cien Saude Colet*. v. 18; n. 2; 2013. P. 489-497.
- [24] Machado LS, Pires MC. Perfil epidemiológico de mulheres com papilomavírus humano que utilizam o serviço público de saúde. *Rev baiana enferm.*, v. 3, n. 4 :e22135. 2017;
- [25] QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T.; ZAIA, J. E. O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. *Revista Brasileira Análise Clínica*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2; p. 151-157. 2007.
- [26] NAKAGAWA, J; TAMANI, T; S.; J; BARIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. *Rev Brasileira de Enfermagem*. [en línea], 63, abr.2010.
- [27] FEDRIZZI, E.N. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. *Rev Bras Pat Trato Gen Inf*. v. 1; n.1; 2011.
- [28] CAMPISI, G.; GIOVANNELLI, L. Controversies surrounding human papiloma vírus infection, head and neck vs oral câncer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol*. v.30;n.1; 2009.

- [29]SIMÕES, LUDMILA PINI; ZANUSSO JUNIOR, GERSON. Vírus HPV e o desenvolvimento de câncer de colo de útero: uma revisão bibliográfica .Rev. UNINGÁ, Maringá, v. 56, n. 1, p. 98-107, jan./mar. 2019
- [30]WENDLAND, E. M. et al. POP-Brazil study protocol: A nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. *BMJ Open*, v. 8, n. 6, p. 1–6, 2018b.
- [31]ROSS, M.; WILLIAMS, M.L. Sexual behavior and illicit drug use. *Annu Rev Sex Res.* v. 12; n.1; 2001:290- 310.
- [32]ENTIAUSPE LG, et al. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. *Braz J Microbiol*; v. 45, n. 2, p. 689-94. 2014.
- [33]CAIAFFA, W.T.; BASTOS, F.; FREITAS, L. L. The contribution of two Brazilian multi-center studies to the assessment of HIV and HCV infection and prevention strategies among injecting drug users: the AJUDE-Brasil I and II Projects. *Cad. Saúde Pública*,v.22 n.4; 2006: 771-782.
- [34]CIRINO, F.M.B.; NICHIATA, L.Y.I.; BORGES, A.L.V. Conhecimento, atitude e práticas na prevenção do câncer de colo uterino e HPV em adolescentes. *Esc Anna Nery. Rev Enferm.* v.14; n. 1; 126-34. 2010.

Anexo C: Normas da *BMC Infectious Disease* para submissão de artigo

Submission guidelines

Research article

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [editorial policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

BMC Infectious Diseases strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's [information on recommended repositories](#). Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the [Editorial Policies](#) Page.

Please note that for outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection we endorse the [ORION](#) guidelines.

Authors who need help depositing and curating data may wish to consider uploading their data to [Springer Nature's Research Data Support](#) or contacting our [Research Data Support Helpdesk](#). Springer Nature's Research Data Support provides data deposition and curation to help authors follow good practice in sharing and archiving of research data, and can be accessed [via an online form](#). The services provide secure and private submission of data files, which are curated and managed by the Springer Nature Research Data team for public release, in agreement with the submitting author. These services are provided in partnership with figshare. Checks are carried out as part of a submission screening process to ensure that researchers who should use a specific community-endorsed repository are advised of the best option for sharing and archiving their data. Use of Research Data Support is optional and does not imply or guarantee that a manuscript will be accepted.

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names and institutional addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the [CONSORT](#) extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be in stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

- ***Ethics approval and consent to participate***

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

- ***Consent for publication***

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

- ***Availability of data and materials***

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in [BMC Research Notes](#), you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing.

Co-published data notes will be linked to the research article the data support ([example](#)).

For more information please email our [Research Data Team](#).

- ***Competing interests***

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

- ***Funding***

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

- ***Authors' contributions***

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

- ***Acknowledgements***

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

- ***Authors' information***

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

- ***Footnotes***

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. Am J Sci. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. BMC Medicine. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. Blood 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Figures, tables and additional files

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.