

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA

**PREVALÊNCIA, GENÓTIPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES QUILOMBOLAS**

São Luís

2015

MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA

**PREVALÊNCIA, GENÓTIPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES QUILOMBOLAS**

Artigo apresentado ao Curso de Graduação em
Medicina da Universidade Federal do
Maranhão como requisito para a obtenção do
grau de Médico.

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

São Luís

2015

Silva, Marcos Antonio Custódio Neto da.

Prevalência, genótipos e fatores associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres quilombolas / Marcos Antonio Custódio Neto da Silva. — São Luís, 2015.

67 f.

Orientador: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Maranhão, Curso de Medicina, 2015.

1. Papilomavírus humano – Mulheres quilombolas. 2. Câncer de colo do útero. 3. Esfregaço cervical. 4. Genótipos de HPV. I. Título.

CDU 616-006.52-055.2(=013)

MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA

**PREVALÊNCIA, GENÓTIPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES QUILOMBOLAS**

Artigo apresentado ao Curso de Graduação em
Medicina, da Universidade Federal do
Maranhão para a obtenção do grau de Médico.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Orientadora)

Pós-doutora em Oncologia
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra

Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal

Doutora em Biologia Humana e Experimental
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Raimundo Nonato Martins Cutrim

Doutor em Infectologia
Universidade Federal do Maranhão

DEDICATÓRIA

A Deus, autor da vida, pelas bênçãos concedidas nesta caminhada.

Aos meus pais, minha eterna gratidão pela dedicação, amor, paciência e sabedoria.

Aos meus avôs, José (*in memoriam*) e Sebastião (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da existência, sem o qual não teria chegado até aqui. Por me dar forças para enfrentar as dificuldades, coragem para seguir em frente e por ter me ajudado a compreender que tudo acontece em seu devido tempo.

Aos meus pais, Marlene Custódio Neto da Silva e Antonio Ferreira da Silva, por acreditarem que eu poderia alcançar meus objetivos, por me apoiarem e aceitarem minhas escolhas. Obrigado pelo amor, carinho e cuidado incondicionais.

Aos meus irmãos, Quezia Jemima Custódio Neto da Silva e Marcos José Custódio Neto da Silva, pela admiração que tantas vezes demonstraram por mim e pelos exemplos de vida acadêmica exitosa.

A todos os meus familiares, em especial, às minhas avós Raimunda e Francisca e às minhas tias Vera Lúcia, Marlúcia, Margarida, Ivonete e Braw, por sempre me ajudarem em todos os momentos e pela compreensão sempre que necessário.

À Universidade Federal do Maranhão, pelos conhecimentos e habilidades adquiridos durante o curso de Medicina, pelo apoio institucional e auxílio nas viagens para a divulgação dos resultados das pesquisas em eventos científicos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, por sua dedicação e amor pela Medicina e pela ciência, bem como pelo exemplo de honestidade, perseverança e ética, que me contagiaram e serviram de estímulo ao longo desta caminhada. Agradeço especialmente pelo incentivo, confiança, paciência e carinho comigo em todos os momentos. Muito obrigado por ter me escolhido como seu pupilo.

À Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra, pela sua valiosa contribuição e ensinamentos ao longo da minha trajetória científica. Por acreditar no meu potencial e ter me orientado na iniciação científica ao longo de dois anos.

À Profa. Dra. Graça Maria de Castro Viana, pela amizade, pelos ensinamentos e por ter me aceito de braços abertos para nossas parcerias científicas.

Ao Prof. MSc. Walbert Edson Muniz Filho, pela colaboração e apoio logístico na aquisição de equipamentos e materiais de consumo necessários à consecução desta pesquisa científica.

Aos demais docentes do curso de Medicina pelas orientações recebidas durante a graduação, em especial Dra. Dulcelena, Dra. Luciane Brito, Dra. Ana Paula

Azevedo, Dr. José Albuquerque, Dr. Fernando Ramos, Dra. Maria do Rosário e Dra. Maria do Carmo Lacerda.

À coordenação do curso de Medicina da UFMA, a minha gratidão.

Ao Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada, lugar onde fiz grandes amigos e aprendi com mestres inigualáveis o prazer pela pesquisa científica. À Edna e Jose, pela disponibilidade e presteza.

Ao Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão, em especial à coordenadora Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito e à coordenadora do Laboratório Multiusuário Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal, pela realização dos testes com biologia molecular.

Ao Instituto Nacional de Câncer, em especial ao Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira, pela realização dos testes de genotipagem do HPV.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão - FAPEMA, pelo suporte financeiro através do Projeto 01363/09 – FAPEMA Edital MS/CNPq/FAPEMA Nº 012/2009 - Programa Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em saúde – PPSUS.

Às mulheres quilombolas que gentilmente aceitaram participar da pesquisa, pois sem elas nada seria possível.

Aos meus amigos, em especial, Rebeca Costa Castelo Branco, Gabrielle Meirelles, Israel Marques, Mônica Machado, Flávia Mohana, Wilson Jardim (*in memoriam*) e tantos outros que poderia citar, pela alegria de poder compartilhar cada momento juntos. Saibam que estes estão eternizados em minha memória. Ao longo dessa caminhada vocês se tornaram verdadeiros irmãos.

A todos que contribuíram de alguma forma, como agentes facilitadores para a execução deste projeto e concretização de um sonho.

MUITO OBRIGADO!

"Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito".

Romanos 8:28

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar onde vocês estão... Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar”

Augusto Cury

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

**ARTIGO – PREVALÊNCIA, GENÓTIPOS E FATORES ASSOCIADOS À
INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES**

QUILOMBOLAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. METODOLOGIA.....	19
3. RESULTADOS.....	24
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÕES.....	39
Agradecimentos.....	40
Fonte de Financiamento.....	41
Conflito de Interesses.....	41
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICES.....	44
ANEXOS.....	50

TABELAS

Tabela 1	Características sociodemográficas de mulheres quilombolas.....	23
Tabela 2	Características comportamentais de mulheres quilombolas.....	24
Tabela 3	Prevalência de HPV nas amostras com resultados de anormalidades citológicas em mulheres quilombolas.....	26
Tabela 4	Prevalência de HPV e distribuição de acordo com risco oncogênico em mulheres quilombolas.....	26
Tabela 5	Distribuição dos genótipos de HPV nos resultados citológicos em mulheres quilombolas.....	28
Tabela 6	Prevalência de HPV nos diferentes resultados citológicos de acordo com faixa etária em mulheres quilombolas.....	29
Tabela 7	Análise univariada de fatores sociodemográficos associados à infecção pelo HPV em mulheres quilombolas.....	30
Tabela 8	Análise univariada de fatores comportamentais associados à infecção pelo HPV em mulheres quilombolas.....	31

FIGURAS

Figura 1	Frequência de genótipos de HPV em mulheres quilombolas.....	27
-----------------	-------------------------------------------------------------	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>)
ASC-H	Células Escamosas Atípicas não Podendo Excluir Lesão de Alto Grau (<i>Atypical Squamous Cell Cannot Exclude High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAPEMA	Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão.
GP5 +/-GP6+	Oligonucleotídeos iniciadores para detecção do genoma do HPV
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)
HPV	Papillomavírus humano
HSIL	Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LSIL	Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau
MY09/MY11	Oligonucleotídeos iniciadores
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGMY09/PGMY11	Oligonucleotídeos iniciadores
VLP	<i>Virus-like particle</i>

ARTIGO**PREVALÊNCIA, GENÓTIPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES QUILOMBOLAS**

(A ser submetido à Revista *Plos One*)

PREVALÊNCIA, GENÓTIPOS E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES QUILOMBOLAS

Prevalence, genotypes and factors associated with Human Papillomavirus (HPV) infection in quilombola women

Marcos Antonio Custódio Neto da Silva¹
Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento²

¹ Graduando em Medicina na Universidade Federal do Maranhão. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq. marcos_antonio456@hotmail.com

² Doutorado em Medicina. Professora Associado IV da Universidade Federal do Maranhão. cnsd_ma@uol.com.br

RESUMO

Introdução: O Papilomavírus humano (HPV) compreende membros da família *Papillomaviridae*. A prevalência dos genótipos de HPV pode variar de acordo com a região e a população estudadas. As comunidades quilombolas são grupos étnico-raciais com maiores dificuldades de acesso aos serviços de saúde se comparado à população geral. **Objetivos:** Detectar e identificar os tipos específicos de HPV e relacionar com características sociodemográficas/comportamentais e anormalidades citológicas presentes em esfregaços cervicais de mulheres quilombolas do Maranhão. **Metodologia:** Este estudo de corte transversal incluiu 395 mulheres quilombolas usuárias do Sistema Único de Saúde dos municípios do Maranhão para rastreamento do câncer de colo uterino. As amostras foram analisadas quanto à presença de anormalidades citológicas pelo método convencional e testadas para 37 genótipos de HPV por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores PGMY09/11, seguida de hibridização reversa em linhas através do Kit Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular System)®. A associação dos tipos de HPV e o diagnóstico citológico foi investigada de acordo com as diferentes faixas etárias. **Resultados:** A infecção pelo HPV foi detectada em 12,6% (50/395) das mulheres incluídas. Infecções por tipos de HPV de alto risco foram mais frequentes. Os genótipos 68 (26,0%); 58 e 52 (20,0%); 31 (10,0%) e 62 (8,0%) foram os mais prevalentes. A prevalência de infecção por HPV em mulheres com diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa de alto grau foi de 42,0%. Houve uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por HPV e a detecção de anormalidades citológicas em todas as faixas etárias, exceto na mulheres com mais de 60 anos. Houve associação estatisticamente significativa entre município de origem e número de parceiros com a infecção pelo HPV. **Conclusões:** É importante incorporar novas técnicas de rastreio de câncer cervical incorporando à citologia oncótica cérvico-vaginal. O conhecimento da saúde da população quilombola relacionado à infecção por HPV e ao câncer de colo do útero contribuirá para o contínuo aperfeiçoamento e concretização da atenção oncológica no Estado do Maranhão.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano (HPV). Prevalência. Genótipos. PCR. Esfregaço Cervical. Quilombolas

ABSTRACT

Background: Human papillomavirus (HPV) comprises members of *Papillomaviridae* family. The prevalence of HPV genotypes may vary according to the region and the population studied. Quilombo communities are ethnic and racial groups with difficult access to health services compared to the general population. **Objectives:** To detect and identify specific HPV types correlating with sociodemographic/behavioral characteristics and cytological abnormalities present in cervical smears of quilombola women. **Methods:** This cross-sectional study included 395 quilombola women users of the unified health System of the municipalities of Maranhão for screening of cervical cancer. The samples were analyzed for the presence of cytological abnormalities by conventional methods and tested for 37 HPV genotypes by polymerase chain reaction (PCR) with primers PGMY09/11 followed by reverse line blot hybridization performed with the *Linear Array HPV Genotyping Test* kit by Roche Molecular System®. The association of HPV types and cytological diagnosis was investigated according to the different age groups. **Results:** HPV infection was detected in 12.6% (50/395) of the women included. Infections by high-risk types of HPV have been more frequent. Genotypes 68 (26.0%); 58 and 52 (20.0%); 31 (10.0%) and 62 (8.0%) were the most prevalent. The prevalence of HPV infection in women diagnosed with high-grade squamous intraepithelial lesion was 42.0%. There was a statistically significant association between HPV infection and the detection of cytological abnormalities in all age groups except in women over 60 years. There was a statistically significant association between the municipality of origin and number of partners with HPV infection. **Conclusions:** It is important to incorporate new cervical cancer screening techniques incorporating the cervical-vaginal cytology. Knowledge of health related quilombola population to infection by HPV and cervical cancer will contribute to the continuous improvement and implementation of cancer care in the state of Maranhão.

Keywords: Human papillomavirus (HPV). Prevalence. Genotypes. PCR. Pap Smear. Quilombola

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero (CCU) é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo com aproximadamente 528 mil casos novos por ano, sendo responsável pelo óbito de 266 mil mulheres por ano [1]. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de casos para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 15.590 casos novos de câncer de colo do útero no Brasil. O câncer cervical é a segunda neoplasia mais frequente na região Nordeste (18,79 casos/100 mil habitantes). No Maranhão, são esperados 880 novos casos e em São Luís, 200 novos casos, superando o câncer de mama [2].

O papilomavírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*. É um vírus icosaédrico, não envelopado, com cerca de 55 nm de diâmetro. O genoma é constituído de DNA circular de dupla fita contendo cerca de 7900 pares de base [3]. Até o momento, cerca de 200 tipos de HPV foram identificados, sendo nomeados pela sigla HPV seguida de um número que é dado, à medida que são caracterizados [4].

O HPV é classificado como de baixo ou alto risco oncogênico, de acordo com sua capacidade de causar lesões malignas como carcinomas cervicais. Os tipos de baixo risco estão associados ao surgimento de lesões benignas como verrugas (HPVs tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108), e os de alto risco estão associados ao processo de carcinogênese (HPVs tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 26, 53 e 66), sendo os tipos HPV 16 e 18, relacionados a mais de 70% dos casos de câncer cervical [5-7].

Excluindo os HPV 16/18, os tipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58 são os mais comuns, porém observam-se grandes variações nas frequências [8]. Por exemplo, entre os países desenvolvidos, os tipos de HPV 58, HPV 33 e HPV 45 figuram em 3º, 4º e 5º mais prevalentes respectivamente, quando associados ao câncer. Já entre os países subdesenvolvidos, os tipos HPV 33, HPV 31 e HPV 45 ocupam estas respectivas posições [9].

Estima-se que a maioria dos homens e das mulheres está infectada com pelo menos um subtipo do HPV durante a sua vida sexual, embora na maior parte das pessoas não persista e nem progride para câncer [10].

A infecção persistente pelo HPV é condição necessária para o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas intraepiteliais e do câncer cervical invasivo. Entretanto, foi demonstrado que, por si só, o HPV não é causa suficiente, sendo necessária a associação a outros co-fatores para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intraepiteliais [11-13]. Vários estudos têm avaliado fatores de risco para infecção genital pelo HPV. Esses fatores de risco incluem número de parceiros sexuais, início precoce da atividade sexual, novo parceiro sexual, tabagismo, uso prolongado de contraceptivos orais, histórico de doenças sexualmente transmissíveis (DST's), como infecção por *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex tipo 2 e vírus da imunodeficiência humana (HIV), além de fatores como imunossupressão e predisposição genética [14,15].

As primeiras alterações de lesões cervicais são anormalidades citológicas de baixo grau, tais como, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL). Uma revisão sistemática de 423 estudos mostrou que o HPV-DNA de 48 tipos diferentes de HPV do gênero alfa-papilomavírus alfa estava presente em 52,1% de ASCUS e 74,2% de lesões LSIL [16]. Uma meta-análise de 32 estudos relataram que HPV de alto risco foram detectáveis em 43% de ASCUS e em 76% de Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 1 (NIC 1) [17].

Atualmente, duas vacinas baseadas em VLPs (do inglês, *virus like particles*) formadas por proteínas L1 de HPV 6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou HPV 16 e -18 (Cervarix) estão disponíveis no mercado. Ambas as vacinas demonstraram ser altamente imunogênicas em ensaios clínicos, resultando em 100% de soroconversão nas diferentes populações estudadas [18,19].

As comunidades quilombolas são grupos étnico-raciais, segundo critérios de auto-atribuição, com trajetória histórica própria, isolamento geográficos dotados de relações territoriais específicas e com presunção de ancestralidade

negra, relações monogâmicas, apenas entre membros dos quilombos e resistência à opressão histórica sofrida [20]. Disparidades étnicas e raciais são vistas no câncer de colo do útero. Mulheres negras não hispânicas e mulheres hispânicas apresentam maiores taxas de incidência e mortalidade do que outros grupos raciais [21].

Os dados acerca da saúde da população quilombola são escassos, em especial em relação a prevalência, genótipos e fatores de risco para a infecção pelo HPV. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi determinar a prevalência e a distribuição de genótipos de HPV em mulheres quilombolas e avaliar fatores de risco associados à infecção pelo HPV.

2. METODOLOGIA

2.1. Tipo e área de Estudo

Trata-se de um estudo transversal de prevalência do câncer de colo do útero e da infecção por HPV em mulheres quilombolas do Estado do Maranhão, nos municípios de São José de Ribamar, Presidente Vargas, Viana, São Luís Gonzaga, Central do Maranhão e Alcântara. As comunidades quilombolas estudadas foram Juçatuba (São José de Ribamar); Sapucaia, Sororoca, Boa Hora I, Boa Hora II, Cavianã, Cigana, Estiva dos Cotos, Irmã Dorate, Lagoa Grande, Marajá, Pau D'arco e Fincapé (Presidente Vargas); São Cristóvão, Rua Grande, Rua Linares Pinheiros, Rua Santa Luzia e Rua Principal (Viana); Café Pipira, Monte Cristo, Fazenda Velha, Natal, Vale Verde, Santo Antônio Costa e Antonio Matos (São Luís Gonzaga); São Sebastião (Central do Maranhão) e Mocagituba I, Mogagituba II, Cajueiro, Santo Inácio, Povoado Oitiva, Povoado Castelo, Povoado Raimundo Sú, Novo Belém, Povoado Lisboa, Tubarão e Goiabal (Alcântara).

2.2. População do Estudo

A população selecionada para este estudo é constituída por 161 (cento) famílias de quilombolas, sendo o tamanho da amostra calculado em 395 pessoas, na faixa etária entre 12 a 84 anos, no período de março de 2012 a fevereiro de 2013.

Os critérios de inclusão foram: Mulheres quilombolas, que já tiveram ou têm atividade sexual e procuraram espontaneamente pelo exame de PCCU, sendo usuárias do Sistema Único de Saúde dos Municípios do Maranhão, e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critério de exclusão: Mulheres quilombolas histerectomizadas, aquelas submetidas a cirurgias em colo uterino e portadoras de déficit mental que prejudicasse o entendimento das respostas para preenchimento do formulário específico, e aquelas amostras que apresentaram degradação do DNA ou esfregaço cervico vaginal considerado insatisfatório.

2.3. Amostra

A amostra foi constituída por 395 mulheres quilombolas que realizaram coleta do exame citológico, PCR e genotipagem para detecção do HPV.

2.4. Coleta de Dados

A coleta das amostras foi realizada entre julho de 2011 e março de 2012. Procedeu-se a entrevista no momento da coleta utilizando-se um questionário epidemiológico estruturado que incluía informações sobre características sociodemográficas, hábitos e história sexual e reprodutiva (Apêndice A).

As mulheres foram submetidas a exame clínico cuidadoso com inspeção dos genitais externos e região perianal. Secreções de ectocérvice e endocérvice foram colhidas para exame citológico realizado através de método convencional. Este material também foi colocado em uma solução tampão preservadora (Universal Collection Médium Digene Corporation) e utilizado para detecção de DNA-HPV por PCR [22] e genotipagem por meio de hibridização reversa em pontos utilizando o Kits Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Systemas). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a extração de DNA, no BioBanco de Tumores e DNA do Maranhão da Universidade Federal do Maranhão.

2.5. Exame Citológico

Os esfregaços citológicos convencionais foram constituídos de raspado ectocervical e endocervical (junção escamocolunar), colhidos com espátula de

Ayre e escova endocervical, realizou-se o esfregaço celular em lâmina de vidro, o qual foi fixado com álcool e encaminhado para coloração pela técnica de Papanicolau no Laboratório de Imunologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), do Departamento de Patologia (DEPAT) da UFMA. Todos os esfregaços foram submetidos a um rigoroso controle de qualidade adotado pelo referido laboratório realizado através da revisão de todos os esfregaços negativos para anormalidades citológicas cervicais. Os resultados de adequabilidade das amostras e grau de anormalidades cervicais foram interpretados de acordo com o Sistema de Bethesda revisado em 2001 [23].

2.6 Detecção do HPV

2.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi feita a partir das células descamativas cervicais colhidas com escova coletora mergulhada em solução de PBS, kit comercial de purificação de DNA cujo método se baseia na ligação seletiva do DNA a uma membrana de sílica na presença de sais caotrópicos (PureLink™, Invitrogen), sendo as amostras processadas e extraído o DNA a partir do esfregaço cervical. Após ressuspensão por agitação em vórtex foi transferido um volume de 200 µL do meio universal de coleta (UCM) contendo o material para um tubo tipo eppendorf ao qual foram adicionados 20 µL de Proteinase K e 20 µL de RNase. A mistura resultante foi incubada por dois minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado ao material 200 µL do tampão de lise/ligação e a mistura incubada por 30 minutos a 55°C. Terminada a etapa de lise, foram adicionados 200 µL de etanol a 96%, seguido por agitação em vórtex de modo a se obter uma solução homogênea. O material lisado foi aplicado à coluna e o procedimento de purificação foi realizado de acordo com as instruções de uso do kit comercial em três etapas: ligação do DNA à coluna de sílica, lavagem para retirada de material não ligado e recuperação (eluição) do DNA ligado à coluna. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C.

2.6.2 Amplificação do DNA genômico humano

Para confirmação de existência de material genômico humano e ausência de substância inibidora de PCR foi realizado o controle interno das amostras extraídas, através de PCR para partes do gene (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) - GAPDH, utilizando-se primers previamente desenhados, conforme a sequência: GAPDH – 5' AAG GCT GGG GCT CAT TTG 3' e GAPDHr – 5'GTG TGG TGG GGG ACT GAG 3'.

A visualização da amplificação com primers GAPDH foi feita em gel de poliacrilamida. As condições de amplificação do GAPDH, para as fases às quais o termociclador foi regulado encontram-se descritas na técnica (os itens foram repetidos por 40 ciclos).

Nas amplificações do DNA envolvendo o GAPDH, os componentes de cada reação foram: 2,5 mmol/bhL de MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTPs 10X, 10 µmol/L de mistura de primer (05 µmol/L de RW e 05 µmol/L de FF), 0,25 unidades de Taq DNA polimerase. O volume final de reação foi de 25µL, sendo completado com água de miliQ na quantidade suficiente. No controle negativo da PCR, em um dos tubos foi utilizada somente água em substituição às amostras contendo DNA e, como controle positivo, a amostra tida como padrão ouro de extração, que em todos os testes, sempre se apresentou positivo para HPV.

Após o término da reação, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata para verificação de uma banda de aproximadamente 98pb correspondente ao fragmento do gene GAPDH. As amostras positivas para amplificação de GAPDH foram submetidas a reações de PCR para a detecção do DNA do HPV. As amostras negativas para o gene GAPDH tiveram o DNA re-extraído e foram novamente testadas para esse gene. Somente as amostras positivas para o GAPDH foram utilizadas para detecção.

2.6.3 Amplificação do DNA e genotipagem do HPV

A amplificação do DNA e genotipagem do HPV foram realizadas através do kit Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Systems, Branchburg Inc.). O DNA do HPV foi amplificado por PCR com o par de iniciadores de consenso para a região L1 PGMY09/PGMY11 marcados com biotina em um termociclador utilizando a ciclagem: 95°C por 13 minutos, seguida por 40 ciclos de

desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a uma temperatura de 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Ao final, foi realizada uma extensão terminal de cinco minutos a uma temperatura de 72°C. O controle de amplificação foi feito usando par de iniciadores para o gene da β -globina GH20 e PC04 marcados com biotina. A genotipagem do HPV foi realizada por metodologia de hibridização reversa: o produto da PCR foi desnaturado com uma solução de NaOH a 1,6%.

Após a desnaturação, o material foi aplicado em uma tira de nylon contendo sondas imobilizadas para duas concentrações diferentes de β -globina, 19 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82) e 18 tipos de HPV de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 72, 81, 83, 84, IS39 e CP6108). A presença de híbridos na tira foi detectada por um sistema de precipitação de cor nas linhas contendo sondas específicas para os diferentes genótipos do HPV, depois da adição de um conjugado de estreptavidina-peroxidase e o respectivo substrato.

2.7. Análise Estatística

Os dados foram avaliados através do programa estatístico SPSS for Windows 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Inicialmente foram feitas análises exploratórias (descritivas) das variáveis numéricas (idade, idade da menarca e o início da atividade sexual) calculando o máximo, o mínimo, a média e o desvio-padrão. Depois essas variáveis foram avaliadas em relação ao teste de HPV pelo teste t de student independente. Das variáveis categóricas calculou-se as frequências absolutas e relativas, organizando em tabelas e gráficos. Posteriormente para comparar as entre proporções das variáveis categóricas com o teste do HPV e quanto oncogenicidade do vírus foi empregado o teste de qui-quadrado de independência. Para verificação de associação entre as variáveis, empregou-se como estimador de magnitude o odds ratio (OR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Em todos os testes o nível de significância (α) foi de 5%, ou seja, foi considerando significativo quando $p < 0,05$.

2.8. Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão sob o número 233/2011. Para dar continuidade à pesquisa, a solicitação de prorrogação da vigência do projeto foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, sob o parecer 785.413/2014 (Anexo A). Para o desenvolvimento do projeto, as mulheres incluídas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares) (APÊNDICE B).

3. RESULTADOS

Foram incluídas 395 mulheres no estudo, sendo 27,8% (110/395) com idade inferior a 30 anos; 24,6% (99/395) com idade entre 31 e 40 anos; 20,3% (80/395) com idade entre 41 e 50 anos; 17,5% (69/395) com idade entre 51 e 60 anos e 9,9% (39/395), idade superior a 60 anos. A idade das pacientes variou de 13 a 84 anos, com idade média de 41,3, DP \pm 14,4 anos. Em relação à escolaridade, mulheres que cursaram o ensino fundamental, ensino médio e ensino superior representaram, respectivamente, 66,0% (261/395), 16,5% (65/395) e 2,3% (9/395) dos casos. Mulheres analfabetas corresponderam a 15,2% (60/395) do total dos casos. Quanto ao município de origem das comunidades quilombolas, 25,6% (101/395) eram provenientes de Alcântara e 25,6% (101/395) de São José de Ribamar. Quanto ao estado civil, 30,1% (119/395) corresponderam às mulheres solteiras; 61,0% (241/395) às mulheres casadas; 1,6% (6/395) às mulheres divorciadas e 7,3% (29/395) às mulheres viúvas. Em relação à raça, 45,5 % (180/395) eram pardas, 32,4% (128/395) e 6,6% (26/395) eram brancas. (Tabela 1).

Tabela 1. Características sociodemográficas de mulheres quilombolas

Variáveis	N	%
Faixa etária		
≤ 30	110	27,8
31-40	97	24,6
41-50	80	20,3
51-60	69	17,5
>60	39	9,9
Escolaridade		
Analfabeta	60	15,2
Ensino Fundamental	261	66,0
Ensino Médio	65	16,5
Ensino Superior	9	2,3
Municípios		
Alcântara	101	25,6
Central do Maranhão	50	12,6
Presidente Vargas	63	15,9
São José de Ribamar	101	25,6
São Luís Gonzaga	54	13,7
Viana	26	6,6
Estado Civil		
Solteira	119	30,1
Casada	241	61,0
Divorciada	06	1,6
Viúva	29	7,3
Raça		
Branca	26	6,6
Negra	128	32,4
Parda	180	45,5
Não informado	61	15,5

A Tabela 2 mostra as características comportamentais, sendo mais prevalentes mulheres que iniciaram atividade sexual com 15 anos ou mais (61,6%; 243/395); que tiveram mais de um parceiro sexual (54,7%; 216/395); com idade da menarca superior a 12 anos (59,0%; 233/395); com mais de uma gestação (82,5%; 326/395); sem sinais de DST (70,4%; 278/395); sem uso de contraceptivo (82,3%; 325/395); que realizaram higiene vaginal mais de uma vez ao dia (82,3%; 325/395); que já haviam realizado exame citopatológico de Papanicolau (85,3%; 337/395); que apresentaram colo normal (51,4%; 203/395); que não faziam uso de bebida alcoólica (63,3%; 250/395) e que não fumavam (91,9%; 363/395). Observou-se a idade mínima da menarca foi de 9 anos e máxima de 17 anos com uma idade média de 13 anos, DP ± 1.5 anos e a

atividade sexual teve seu início de 10 anos, tendo ocorrido um caso do início com 43 anos com uma média de 16.6 anos, DP \pm 3.1.

Tabela 2: Características comportamentais de mulheres quilombolas

Variáveis	N	%
Início da atividade sexual		
≤ 15 anos	152	38,4
> 15 anos	243	61,6
Número de parceiros		
Um	179	45,3
Mais de um	216	54,7
Idade da Menarca		
≤ 12 anos	162	41,0
> 12 anos	233	59,0
Nº gestações		
Até uma	69	17,5
Mais de uma	326	82,5
Sinais de DST		
Não	278	70,4
Sim	117	29,6
Uso de contraceptivo		
Sim	70	17,7
Não	325	82,3
Frequência de higiene genital		
Uma vez por dia	70	17,7
Mais de uma vez por dia	325	82,3
Realização de exame Papanicolau		
Não	58	14,7
Sim	337	85,3
Inspeção do Colo		
Alterado	192	48,6
Normal	203	51,4
Etilista		
Sim	145	36,7
Não	250	63,3
Tabagista		
Sim	32	8,1
Não	363	91,9

Entre as 395 mulheres analisadas, 91,6% (362/395) tiveram diagnóstico negativo para lesão intraepitelial escamosa ou malignidade e 8,4% (33/395) apresentaram anormalidades citológicas, variando entre os diagnósticos de ASC-US e HSIL. Estes diagnósticos incluíram 33,3% (11/33) de ASC-US, 21,2% (7/33) de LSIL, 30,3% (10/33) de HSIL e 15,2% (5/33) de ASC-H.

A prevalência total de HPV foi de 12,6% (50/395). Considerando as mulheres que apresentaram anormalidades citológicas, 12/33 (36,4%) foram positivas para HPV. Dos diagnósticos de inflamação, 35 (10,4%) casos foram positivos para HPV. Das 11 pacientes diagnosticadas com ASC-US, 2 (18,2%) foram positivas para infecção por HPV. Das 7 pacientes que apresentaram LSIL, 2 (28,6%) tinham infecção por HPV. Para os diagnósticos de ASC-H e HSIL, a taxa de infecção encontrada foi, respectivamente, de 40,0% (2/5) e 60,0% (6/10) (Tabela 3). Houve associação estatisticamente significativa entre a presença de anormalidades citológicas nos esfregaços cervicais e a presença de HPV ($p < 0.001$).

Das 395 pacientes, 50 apresentaram positivo para algum tipo de HPV, com idade média de 41.3, com DP \pm 14,5 para as mulheres com HPV negativo e média de idade 40.6 para HPV positivo com DP \pm 14.0. Em relação idade da menarca a média foi de 13.0 anos para HPV negativo, DP \pm 1.5 e 12.8 anos para HPV positivo, DP \pm 1.5. Para o início da atividade sexual foi observado 16.7 anos, DP \pm 3.1 para HPV negativo e 16.3 anos, DP \pm 2,9 para HPV positivo.

Tabela 3. Prevalência de HPV nas amostras com resultados de anormalidades citológicas em mulheres quilombolas.

Anormalidades Citológicas	HPV			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Total n (%)	
ASC-H	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (100,0)	<0.0001
ASC-US	9 (81,8)	2 (18,2)	11 (100,0)	
HSIL	4 (40,0)	6 (60,0)	10 (100,0)	
LSIL	5 (71,4)	2 (28,6)	7 (100,0)	
Inflamação	301 (89,6)	35 (10,4)	336 (100,0)	
Atrofia	23 (88,4)	3 (11,6)	26 (100,0)	
Total	345 (87,4)	50 (12,6)	395 (100,0)	

ASC-H (atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesions)

ASC-US - (atypical squamous cells of undetermined significance)

HSIL - (high grade intraepithelial lesion)

LSIL - (low grade squamous intraepithelial lesion)

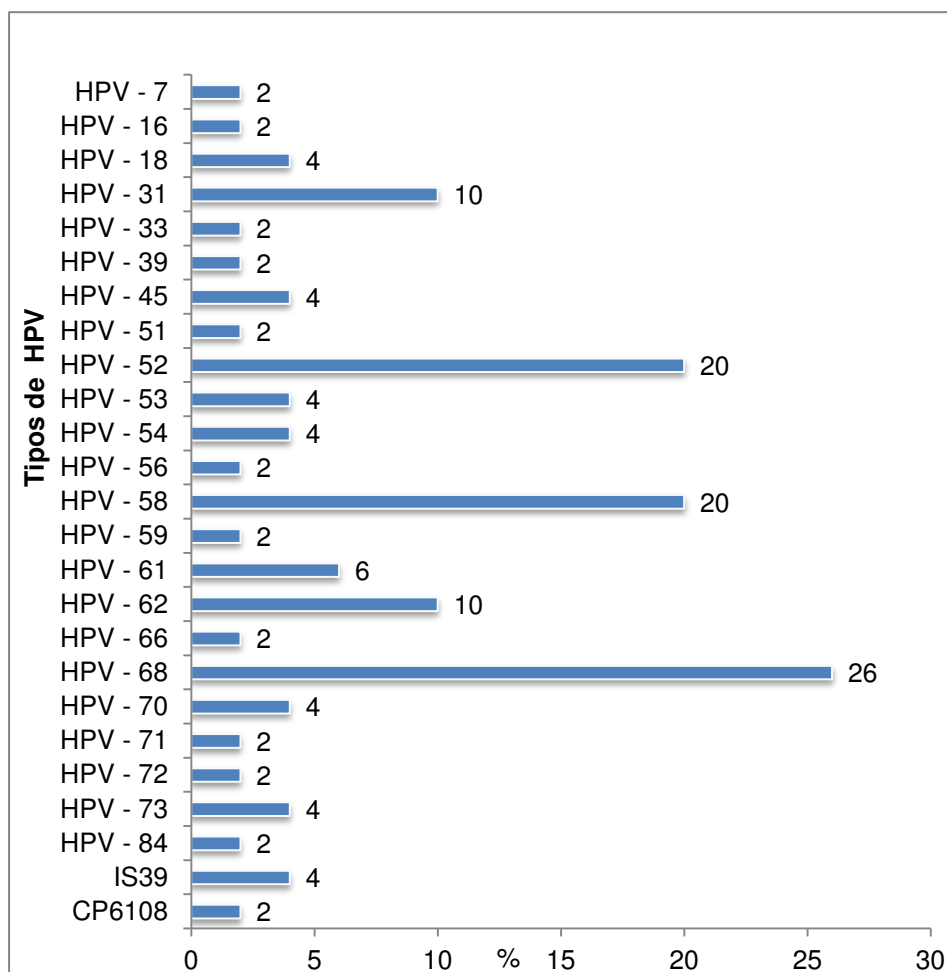
Algumas mulheres apresentaram infecções múltiplas pelo HPV, mais frequentes com HPV 68, totalizando 72 tipos de HPV nas mulheres positivas para HPV, sendo 50 (69,4%) de alto risco oncogênico (Tabela 4). A Figura 1 mostra a distribuição dos tipos de vírus HPV na população estudada. Os genótipos 68 (26,0% - 13/50); 58 e 52 (20,0% - 10/50 cada); 31 (10,0% - 5/50) e 62 (8,0% - 4/50) foram os mais prevalentes. Apenas 6,0% (3/50) dos casos foram positivos para o HPV-61. Os genótipos 73, 70, 54, 53, 45, IS39 e 18 representaram individualmente 4,0% (2/50) do total de casos. Os tipos CP6-108, 84, 72, 71, 66, 59, 56, 55, 51, 39, 33, e 16 representaram individualmente 2,0% (1/50) do total de casos.

Tabela 4. Prevalência de HPV e distribuição de acordo com o risco oncogênico em mulheres quilombolas.

HPV	N	%
HPV +	50	12,6
HPV -	345	87,4
Risco oncogênico*		
Alto risco	50	69,4
Baixo risco	14	19,4
Indeterminado	8	11,2

* A soma dos tipos de HPV estratificados pelo risco é maior que 50 devido à coinfeção

Figura 1 – Frequência de genótipos de HPV em mulheres quilombolas



Em relação à presença de HPV nos diferentes resultados citológicos, os tipos de alto risco oncogênico foram mais frequentes (78,0%, 39/50) que os de baixo risco oncogênico (22,0%-11/50). Para aquelas diagnosticadas com alguma anormalidade, a prevalência de infecção por HPV foi de 24,0% (12/50), sendo maior nos casos de HSIL (42,0%), seguida por LSIL (21,0%), ASC-US (21,0%) e ASC-H (16,0%). Em todos os diagnósticos, as infecções simples foram mais frequentes que as múltiplas (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos genótipos do HPV nos resultados citológicos de mulheres quilombolas.

Tipos de HPV	Anormalidades Citológicas						
	ASC-H	ASC-US	HSIL	Inflamação	LSIL	Atrofia	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
HPV alto risco							
16	-	-	1	-	-	-	1
18	-	-	1	1	-	-	2
31	-	-	-	4	1	-	5
33	-	-	-	1	-	-	1
39	-	-	-	1	-	-	1
45	-	-	-	2	-	-	2
51	-	-	-	1	-	-	1
52	-	1	2	6	-	1	10
56	-	-	-	1	-	-	1
58	-	1	2	6	-	1	10
59	-	-	-	-	-	1	1
66	-	-	-	1	-	-	1
68	-	1	-	11	-	1	13
70	-	-	-	2	-	-	2
73	1	-	-	-	-	1	2
HPV Baixo risco							
7	-	-	-	1	-	-	-
53	-	-	-	2	-	-	2
54	-	-	-	2	-	-	2
55	-	-	-	1	-	-	1
61	-	-	-	2	1	-	3
62	-	-	-	3	1	-	4
71	-	-	-	-	-	1	1
72	-	-	-	1	-	-	1
84	-	-	1	-	-	-	1
IS39	1	-	1	-	-	-	2
CP6108	-	-	-	-	-	1	1
Total de Positivos	2	3	8	49	3	7	72*

*Este número refere-se às infecções múltiplas. Entre as 6 infecções múltiplas do vírus 68, 3 estavam associadas ao vírus tipo 52. ASC-US, atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion; ASC-H: atypical squamous cells can not exclude high-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high grade alto squamous intaepithelial lesion.

A Tabela 6 mostra a prevalência de HPV em mulheres com diferentes resultados citológicos, estratificados por faixa etária. Em mulheres com idade inferior a 30 anos, a positividade para o HPV variou entre 23,2% (25/108) em mulheres com esfregaços considerados inflamatórios a 100% em mulheres com resultados de LSIL e HSIL. Houve uma associação significativa entre a

positividade para o HPV e a detecção de anormalidades citológicas nesta faixa etária ($p = 0,02$). A positividade para o HPV foi significativamente associada à detecção de anormalidades citológicas na faixa etária de 31 a 40 anos ($p = 0,0009$). As pacientes HPV positivas, na faixa etária de 41 a 50 anos também mostraram associação estatisticamente significativa com a detecção de anormalidades citológicas ($p = 0,03$). Em pacientes com idade entre 51 e 60 anos, a positividade para o HPV foi de 9,3% (5/54) nos esfregaços considerados inflamatórios e de 80,0% (4/5) nos casos de HSIL. Nesta faixa etária, as mulheres HPV positivas mostraram associação estatisticamente significativa com a detecção de alterações citológicas ($p = 0,0003$) quando comparadas a mulheres negativas para a infecção por HPV. As pacientes HPV-positivas, na faixa etária acima de 60 anos, não mostraram associação estatisticamente significativa com a detecção de anormalidades citológicas ($p = 0,12$).

Tabela 6. Prevalência de HPV nos diferentes resultados citológicos de acordo com a faixa etária em mulheres quilombolas.

Resultado Citológico	Detecção do HPV		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Faixa etária (<30 anos)			
ASC-US	3 (60,0)	2 (40,0)	0,02
HSIL	-	2 (100,0)	
LSIL	-	2 (100,0)	
Inflamação	83 (76,8)	25 (23,2)	
Atrofia	2 (100,0)	-	
Total	88 (74,0)	31 (26,0)	
Faixa etária (31-40 anos)			
ASC-H	-	2 (100,0)	0,0009
ASC-US	2 (100,0)	-	
HSIL	1 (100,0)	-	
LSIL	2 (50,0)	2 (50,0)	
Inflamação	77 (84,6)	14 (15,4)	
Atrofia	-	2 (100,0)	
Total	82 (80,4)	20 (19,6)	
Faixa etária (41-50 anos)			
ASC-H	2 (100,0)	-	0,03
ASC-US	2 (66,7)	1 (33,3)	
HSIL	-	2 (100,0)	
LSIL	1 (100,0)	-	
Inflamação	62 (85,0)	11 (15,0)	
Atrofia	1 (50,0)	1 (50,0)	
Total	68 (82,0)	15 (18,0)	
Faixa etária (51-60 anos)			
ASC-H	-	1 (100,0)	0,0003
ASC-US	1 (100,0)	-	
HSIL	1 (20,0)	4 (80,0)	
Inflamação	49 (90,7)	5 (9,3)	
Atrofia	11 (73,3)	4 (26,7)	
Total	62 (81,5)	14 (18,5)	
Faixa etária (> 60 anos)			
ASC-US	-	1 (100,0)	0,12
LSIL	1 (100,0)	-	
Inflamação	19 (82,6)	4 (17,4)	
Atrofia	10 (90,9)	1 (9,1)	
Total	20 (80,0)	5 (20,0)	

ASC-US, atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion; ASC-H: atypical squamous cells can not exclude high-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high grade alto squamous intaepithelial lesion;

A Tabela 7 descreve a associação entre as variáveis sociodemográficas e a positividade para o HPV na análise univariada dos fatores preditores para a infecção viral. Apenas o município de origem apresentou associação significativa com a positividade para o HPV ($p < 0,0001$). As variáveis analisadas (faixa etária, escolaridade, estado civil e raça) não mostraram associação significativa com a positividade para HPV.

Tabela 7. Análise univariada de fatores sociodemográficos associados à infecção pelo HPV em mulheres quilombolas.

Variáveis	Detecção do HPV		P
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Idade			
≤ 30 anos	91 (82,7)	19 (17,3)	0,65
31 a 40 anos	87 (89,7)	10 (10,3)	
41 a 50 anos	72 (90,0)	8 (10,0)	
51 a 60 anos	60 (86,7)	9 (13,3)	
> 60 anos	35 (89,7)	4 (10,3)	
Escolaridade			
Analfabeta	51 (85,0)	9 (15,0)	0,72
Ensino Fundamental	231 (88,5)	30 (11,5)	
Ensino Médio	56 (86,1)	9 (13,9)	
Ensino Superior	7 (77,7)	2 (22,3)	
Municípios			
Alcântara	96 (95,0)	5 (5,0)	<0,0001
Central do Maranhão	45 (90,0)	5 (10,0)	
Presidente Vargas	46 (73,0)	17 (27,0)	
São José de Ribamar	91 (90,0)	10 (10,0)	
São Luís Gonzaga	40 (78,4)	11 (21,6)	
Viana	25 (96,1)	1 (3,9)	
Estado civil			
Solteira	100 (84,0)	19 (16,0)	0,24
Casada	216 (89,6)	25 (10,4)	
Divorciada	5 (83,3)	1 (16,7)	
Viúva	24 (82,7)	5 (17,3)	
Raça			
Branca	21 (80,7)	5 (19,3)	0,57
Negra	109 (85,1)	19 (14,9)	
Parda	159 (88,3)	21 (11,7)	
Não informado	56 (91,8)	5 (8,2)	

A Tabela 8 descreve a associação entre as variáveis comportamentais e a positividade para o HPV na análise univariada dos fatores preditores para a infecção viral. Dentre as variáveis analisadas (início da atividade sexual, número de parceiros, idade da menarca, número de gestações, sinais de DST, uso de Contraceptivo, frequência de higiene, realização de exame de Papanicolau, resultado da inspeção do colo, etilismo e tabagismo) houve associação significativa com a positividade para HPV apenas em relação ao número de parceiros ($p=0,01$).

Tabela 8. Análise univariada de fatores comportamentais associados à infecção pelo HPV em mulheres quilombolas.

Variáveis comportamentais	Detecção do HPV		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Início da atividade sexual			
≤ 15 anos	126 (82,9)	26 (17,1)	0,65
> 15 anos	219 (90,1)	24 (9,9)	
Número de parceiros			
Um	158 (88,2)	21 (11,8)	0,01
Mais de um	187 (86,5)	29 (13,5)	
Idade da menarca			
≤ 12 anos	141 (87,0)	21 (13,0)	0,22
> 12 anos	204 (87,5)	29 (12,5)	
Número de gestações			
Até uma	63 (91,3)	6 (8,7)	0,32
Mais de uma	282 (86,5)	44 (13,5)	
Sinais de DST			
Não	234 (84,1)	44 (14,9)	0,56
Sim	111 (94,8)	6 (5,2)	
Uso de contraceptivo			
Sim	53 (75,7)	17 (24,3)	0,47
Não	292 (89,8)	33 (10,2)	
Frequência de higiene genital			
Uma vez	58 (82,8)	12 (17,2)	0,30
Mais de uma vez	287 (88,3)	38 (11,7)	
Realização de exame Papanicolau			
Não	49 (84,4)	9 (15,6)	0,17
Sim	296 (87,8)	41 (12,2)	
Inspeção do Colo			
Alterado	169 (88,0)	23 (12,0)	0,59
Normal	176 (86,7)	27 (13,3)	
Etilista			
Sim	127 (87,6)	18 (12,4)	0,99
Não	218 (87,2)	32 (12,8)	
Tabagista			
Sim	25 (78,1)	7 (21,9)	0,98
Não	320 (88,1)	43 (11,9)	

4. DISCUSSÃO

A prevalência total de HPV pode variar de acordo com a técnica utilizada, a população e a região estudadas. Neste estudo, a prevalência de infecção pelo HPV em mulheres quilombolas foi de 12,6% através da técnica de hibridização. Resultados diferentes foram encontrados por Akarolo-Anthony et al (2014) que mostraram uma prevalência global de 37% em mulheres nigerianas [24] e por Watson-Jones et al (2013) que demonstraram prevalência de 74% em mulheres na Tanzânia [25]. Rocha et al (2013), em estudo realizado em populações indígenas da Amazônia Boliviana, encontraram uma prevalência de 5,9% de DNA do HPV [26].

Algumas mulheres apresentaram infecções múltiplas pelo HPV, mais frequentes com HPV 68, totalizando 72 tipos de HPV nas mulheres positivas para HPV, sendo 50 (69,4%) de alto risco oncogênico. Dos 25 tipos de HPV encontrados neste estudo, o HPV 68 foi o mais prevalente (26,0%), seguido de HPV 58 e 52 (20,0%) e HPV 31 (10,0%).

Estudo realizado na França apontou o HPV 16 como mais prevalente, seguidos do HPV 53 e 31 [27]. Estudo realizado no Vietnã demonstrou os tipos de HPV 16, 18 e 58 como mais prevalentes [14]. Xue et al (2015) encontrou os tipos de HPV 16, 52 e 58 como mais prevalentes, sendo o HPV 68 apenas o 8º mais prevalente [28]

Goldman et al. (2013), observaram que a presença do HPV 68 ocorreu numa taxa quatro vezes maior que a esperada em infecções múltiplas, indicando a existência de uma interação entre HPVs de alto risco oncogênico, especialmente entre os tipos 31/68, 51/68 e 33/58. Estes autores sugeriram que alguns genótipos do vírus agem como co-fatores na infecção por outros tipos, evidenciando-se um novo possível fator de risco [29].

A prevalência de HPV em mulheres com diferentes resultados citológicos, estratificados por faixa etária. Em mulheres com idade inferior a 30 anos, a positividade para o HPV variou entre 23,2% (25/108) em mulheres com esfregaços considerados inflamatórios a 100% em mulheres com resultados de LSIL e HSIL. Houve uma associação significativa entre a positividade para o HPV e a detecção de anormalidades citológicas nesta faixa etária ($p = 0,02$). A

positividade para o HPV foi significativamente associada à detecção de anormalidades citológicas na faixa etária de 31 a 40 anos ($p = 0,0009$). As pacientes HPV positivas, na faixa etária de 41 a 50 anos também mostraram associação estatisticamente significativa com a detecção de anormalidades citológicas ($p = 0,03$). Em pacientes com idade entre 51 e 60 anos, a positividade para o HPV foi de 9,3% (5/54) nos esfregaços considerados inflamatórios e de 80,0% (4/5) nos casos de HSIL. Nesta faixa etária, as mulheres HPV positivas mostraram associação estatisticamente significativa com a detecção de alterações citológicas ($p = 0,0003$) quando comparadas a mulheres negativas para a infecção por HPV. As pacientes HPV-positivas, na faixa etária acima de 60 anos, não mostraram associação estatisticamente significativa com a detecção de anormalidades citológicas ($p = 0,12$). Estes resultados indicam que os testes de HPV tem utilidade em mulheres com mais de 30 anos, as quais têm maior possibilidade de serem portadoras de lesões cervicais significantes.

Segundo Akarolo-Anthony et al (2014), a faixa etária mais acometida pela infecção pelo HPV foi a menor que 30 anos, apresentando um declínio em mulheres com mais de 45 anos de idade, concordado com os achados deste estudo [24]. Em Fiji, a população estudada apresentou um declínio da infecção pelo HPV em diferentes faixas etárias, de 35,8% em mulheres com menos de 25 anos para 18,6% em mulheres entre 55-64 anos [30].

No estudo de Foliaki et al (2014), a positividade para pelo menos um genótipo de HPV foi 24,0% entre 1244 mulheres selecionadas, sendo 35,8% na faixa etária 16-24 anos, 25,8% na faixa etária 25-34 anos, 22,5% na faixa etária 35-44 anos, 17,7% na faixa etária 45-54 anos e 18,6% na faixa etária 55-64 anos. O HPV-16 foi o genótipo mais prevalente. Apenas 14 (1,1%), 6 (0,5 %) e 3 (0,2%) das mulheres estavam infectadas pelo HPV18, HPV6 e HPV11, respectivamente. O HPV 68 estava presente em apenas 3 (0,2%) das mulheres infectadas. Dos casos HPV-positivos, 70,1% apresentaram apenas um genótipo viral, enquanto 29,9% tinham infecções múltiplas. Os genótipos de HPV mais frequentemente envolvidos em infecções múltiplas eram de alto risco oncogenico. A maior prevalência foi observada nos primeiros anos de atividade sexual (35,8% de mulheres HPV positivas tinham idade entre 16-24 anos); sendo a prevalência do HPV foi posteriormente diminuída e estabilizada [30].

Considerando as mulheres que apresentaram anormalidades citológicas, 12/33 (36,4%) foram positivas para HPV. Dos diagnósticos de inflamação, 35 (10,4%) casos foram positivos para HPV. Das 11 pacientes diagnosticadas com ASC-US, 2 (18,2%) foram positivas para infecção por HPV. Das 7 pacientes que apresentaram LSIL, 2 (28,6%) tinham infecção por HPV. Para os diagnósticos de ASC-H e HSIL, a taxa de infecção encontrada foi, respectivamente, de 40,0% (2/5) e 60,0% (6/10). Houve associação estatisticamente significativa entre a presença de anormalidades citológicas nos esfregaços cervicais e a presença de HPV ($p < 0.001$). Marks et al (2015) encontraram as seguintes prevalências; 43,8%% de infecção por HPV em mulheres com diagnóstico de inflamação, 36,5% com diagnóstico de ASC-US, 80,9% em mulheres com LSIL e 71,5% em mulheres com diagnósticos de HSIL [31].

Em relação à presença de HPV nos diferentes resultados citológicos, os tipos de alto risco oncogênico foram mais frequentes (78,0%) que os de baixo risco oncogênico (22,0%). Para aquelas diagnosticadas com alguma anormalidade, a prevalência de infecção por HPV foi de 24,0%, sendo maior nos casos de HSIL (42,0%).

O tipo 68, em infecções simples ou múltiplas, foi detectado principalmente em mulheres cujos esfregaços foram considerados como inflamatórios. Os tipos de HPV de alto risco 58, 52, 18 e 16 foram detectados em mulheres quilombolas com diagnóstico citológico de HSIL, concordando com os achados da literatura [27,31-32].

Em relação aos fatores sociodemográficos e a infecção pelo HPV, apenas o município de origem apresentou associação significativa com a positividade para o HPV ($p < 0,0001$). Akarolo-Anthony et al (2014) estudando mulheres nigerianas também não encontrou associação entre fatores sociodemográficos (escolaridade, idade, estado civil) e infecção pelo HPV [24]. Isto pode ser relacionado às características da população estudada: isolamento geográfico, hábitos conservadores, não consumo de álcool e tabaco.

Quanto aos fatores comportamentais analisados houve associação significativa com a positividade para HPV apenas em relação ao número de

parceiros ($p=0,01$). Trabalho realizado na Guiné por Keita et al (2009) também demonstrou associação significativa entre o número de parceiros e a infecção pelo HPV [33].

Acredita-se que os resultados obtidos neste estudo podem subsidiar a reorganização de estratégias voltadas à saúde da mulher quilombola no tocante à prevenção e ao manejo específico da infecção por HPV tendo em vista as particularidades desse grupo. O maior conhecimento, por parte da mulher, sobre as formas de aquisição, fatores de risco e frequência da infecção por HPV em grupos etários e populacionais distintos pode, provavelmente, contribuir para que ela tenha maior percepção em relação ao seu risco de desenvolver lesões pré-neoplásicas cervicais e, conseqüentemente, influenciar a sua adesão permanente às estratégias de rastreamento, bem como estimular mudanças de comportamento e estilo de vida considerados de risco para o HPV.

O presente estudo fornece uma estimativa regional da prevalência de infecção pelo HPV em mulheres quilombolas. Ressalta-se a maior prevalência de HPV 68, achado incomum na literatura, que pode ser explicado por diferenças étnico-raciais da população estudada. Esse tipo viral pode contribuir para um incremento na carcinogênese cervical relacionada a genótipos específicos de HPV.

As limitações do estudo se relacionaram sobretudo ao uso de formulários para a coleta de dados referentes aos fatores de risco para aquisição e manutenção do HPV, uma vez que as associações estatísticas foram realizadas exclusivamente com base nas informações relatadas pelas mulheres.

5. CONCLUSÕES

- A população quilombola estudada foi constituída por mulheres entre 13 e 84 anos, com ensino fundamental (66,0%), provenientes de Alcântara e São José de Ribamar (25,6% cada), casadas (61,0%), pardas (45,5%), que iniciaram a atividade sexual após os 15 anos de idade (61,6%), tiveram mais de um parceiro sexual (54,7%), com idade da menarca acima dos doze anos (59,0%), tiveram mais de uma gestação (82,5%), não

apresentaram sinais de DST (70.4%), não faziam uso de anticoncepcionais (82,3%), faziam higiene vaginal mais de uma vez ao dia (82,3%), já realizaram exame de Papanicolau (85,3%), apresentaram colo do útero com aspecto normal (51,4%), não fumavam (91,9%) e não faziam uso de bebidas alcoólicas (63,3%);

- A prevalência global de HPV foi de 12,6%, sendo o HPV 68 foi o tipo mais prevalente (26,0%), seguido pelos tipos 58 e 52 (20,0% cada), 31 (10,0%) e 62 (8,0%). O tipo 68, em infecções simples ou múltiplas, foi detectado principalmente em mulheres cujos esfregaços foram considerados como inflamatórios. Nove outros tipos de HPV de alto risco oncogênico (31, 18, 45, 70, 39, 56, 59, 66 e 53) também foram identificados em mulheres com esfregaços considerados como inflamatórios ou negativos para neoplasia. Outras seis infecções por HPV de baixo risco oncogênico (54, 61, 62, 72, 84) foram detectadas em mulheres com esfregaços inflamatórios. Mulheres com diagnóstico de ASC-US mostraram infecção por vírus de alto risco oncogênico (HPV 52, 58 e 68) e as mulheres com diagnóstico de LSIL mostraram infecções por HPV de alto risco oncogênico (HPV 31 e baixo risco oncogênico (HPV 61 e 62). Os tipos de HPV de alto risco 58, 52, 18 e 16 foram detectados em mulheres quilombolas com diagnóstico citológico de HSIL;
- A infecção por HPV foi significativamente associada a detecção de anormalidades citológicas em mulheres quilombolas;
- Houve uma associação estatisticamente significativa entre município de origem e número de parceiros com a infecção pelo HPV.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento. Às mulheres quilombolas que aceitaram participar deste estudo. À FAPEMA/SES/MA/CNPq, edital nº 012/2009 pelo financiamento concedido. Ao Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão pela revisão das lâminas dos exames citológicos e ao BioBanco de Tumores e DNA do Maranhão pela realização dos testes de biologia molecular

Fontes de financiamento

O financiamento para esta pesquisa foi obtido através do Projeto 01363/09 – FAPEMA Edital MS/CNPq/FAPEMA Nº 012/2009, Programa Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em saúde – PPSUS.

Como bolsista de iniciação científica do PIBIC/CNPq/UFMA, foi possível desenvolver a presente pesquisa.

Conflito de interesses

Não houve conflito de interesses (econômicos, pessoais, científicos, assistenciais, educacionais, religiosos e sociais) interferindo nos resultados da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO) – Globocan 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2015.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil. INCA: Rio de Janeiro, 2014.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-50.
4. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013;445(1-2):2-10.
5. Bragagnolo AL, Eli D, Haas P. Papiloma Vírus Humano (HPV). *RBAC*. 2010; 42(2):91-96.
6. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S; Castellsagué X, De SanJose S, Garnett, G, et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull. of the Health Organization*. 2007;85(9):719-726.
7. Noronha VL, Cruz EM, Pinho CN, Mello WA, Villa LL, Russomano FB. Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Submetidas a Rastreamento para Câncer de Cérvix Uterina, Belém – PA – Brasil. *DST – J Bras Doenças Sex Transm*. 2011;23(1):5-11.
8. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Matheus C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase nº 10 (Internet). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

9. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 2006; 24(Suppl 3): S26–S34.
10. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus (HPV) variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Research*. 2010;70(8): 3159–3169.
11. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008; 26 Suppl 1: K1–16.
12. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/1–S3/10.
13. Dunne EF, Markowitz LE. Genital human papillomavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2006;43(5):624–9.
14. Tran LT, Tran LT, Bui TC, Le DT, Nyitray AG, Markham CM. Risk factors for high-risk and multi-type Human Papillomavirus infections among women in Ho Chi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study. *BMC Womens Health*. 2015 Dec;15:172.
15. Guven S, Kart C, Guvendag Guven ES, Gunalp GS. The underlying cause of cervical cancer in oral contraceptive users may be related to cervical mucus changes. *Med Hypotheses*. 2007;69(3):550-2
16. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*. 2013; 445(1–2):224–31.
17. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate. *Cell Mol Med*. 2009; 13(4):648–59
18. Villa L. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Letters*. 2011; 305(2):106–112.
19. Adams M, Jasani B, Fiander A. Human papilloma virus (HPV) prophylactic vaccination: challenges for public health and implications for screening. *Vaccine*. 2007; 25:3007–3013.
20. Cardoso LFC. Sobre imagens e quilombos: notas a respeito da construção da percepção acerca das comunidades quilombolas. *R. Est. Pesq. Educ*. 2010;12(1):11-20.
21. U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999–2006 incidence and mortality web-based report. 2010. Retrieved from <http://www.cdc.gov/uscs>.

22. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Heeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:357-361.
23. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
24. Akarolo-Anthony SN, Famooto AO, Dareng EO, Olaniyan OB, Offiong R, Wheeler CM, Adebamowo CA. Age-specific prevalence of human papilloma virus infection among Nigerian women. *BMC Public Health* 2014; 14:656.
25. Watson-Jones D, Baisley K, Brown J, Kavishe B, Andreasen A, Changalucha J, et al. High prevalence and incidence of human papillomavirus in a cohort of healthy young African female subjects. *Sex Transm Infect* 2013;89:358–365.
26. Cervantes J, Lema C, Hurtado L, Andrade R, Quiroga G, Garcia G, et al. Prevalence of Human Papillomavirus infection in rural villages of the Bolivian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2003;45(3):131-5.
27. Casalegno JS, Benchaib M, Le Bail Carval K, Piaton E, Mathevet P, Mekki Y. Human papillomavirus genotype distribution among French women with and without cervical abnormalities. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011;114(2):116-9.
28. Xue H, Lin X, Li T, Yan X, Guo K, Zhang Y. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Liaoning province, China. *J Med Virol.* 2015;87(7):1248-53.
29. Goldman B, Rebolj M, Rygaard C, Preisler S, Ejegod DM, Lynge E, Bonde J. Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark. *Vaccine.* 2013;31(12):1604-9.
30. Foliaki S, Brewer N, Pearce N, Snijders PJ, Meijer CJ, Waqatakirewa L, Clifford GM, Franceschi S. Prevalence of HPV infection and other risk factors in a Fijian population. *Infect Agent Cancer.* 2014;9:14.
31. Marks MA, Gupta S, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, Phongnarisorn C, et al. Prevalence and correlates of HPV among women attending family-planning clinics in Thailand. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):159.
32. Jing L, Zhong X, Huang W, Liu Y, Wang M, Miao Z, et al. HPV genotypes and associated cervical cytological abnormalities in women from the Pearl River Delta region of Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:388.
33. Keita N, Clifford GM, Koulibaly M, Douno K, Kabba I, Haba M. HPV infection in women with and without cervical cancer in Conakry, Guinea. *Br J Cancer.* 2009. 7;101(1):202-8

APÊNDICE A - Ficha Protocolo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO E DA CRIANÇA

FICHA PROTOCOLO

PROJETO: CÂNCER DE COLO DO ÚTERO: Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Quilombolas, Aceitabilidade da Vacina e sua Aplicabilidade para o SUS.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Endereço atual: _____
Cidade: _____ Estado: _____
Endereço anterior: _____
Cidade: _____
Idade: _____ Ocupação: _____ Grau de instrução: _____
Procedência: _____

A rural B urbano

ANTECEDENTES PESSOAIS

1- Sexarca

A 12 a 15 anos B 16 a 19 anos.....

C acima de 20 anos

2- N° de parceiro

A único B além de dois.....

3- Frequência de relações sexuais

A 01/semana B duas ou mais/semana

4- DSTs

A sim B não.....

5- Gestação

A 01 B 02 ou mais

6 - Idade da 1° gestação

A 12 a 15 anos B 16 a 19 anos

7- CONTRACEPTIVOS

A sim B não

8- PARTOS

A eutócicos B Cesáreos

9- ABORTAMENTO

A sim B não

10- CURETAGEM

A sim B não

11- TABAGISMO

A sim B não

12- INGESTA DE BEBIDA ALCOÓLICA

A sim B não

13- Prurido

A sim B não

14- Leucorréia

A sim B não

15- Ardência

A sim B não

16- Dispareunia

A sim B não

17- Sinusorragia

A sim B não

18- OCORRÊNCIA DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL

A sim B não

AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA:

19- LESÕES VULVARES

A sim B não

20- LESÕES VAGINAS

A sim B não

CITOPATOLOGIA ONCÓTICA (MS)

21- CITOPATOLOGIA

A- inflamatório

B - lesões intra epiteliais de baixo grau e HPV

C - lesões intra epiteliais de alto grau

D - carcinoma *in situ*

E - carcinoma microinvasor

F - carcinoma invasor

22 - ELISA P/ TESTE DE HIV

A positivo B negativo

GENOTIPAGEM POR PCR

A positivo B negativo

CRITÉRIOS NÃO INCLUSÃO

∂ Gravidez

∞ Histerectomia

• SIDA

≈ Doenças com corticoterapia prolongada

÷ Idade abaixo de 15 anos e acima de 19 anos

≠ Neoplasia maligna

Σ Transplante renal

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO E DA CRIANÇA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidado (a) a participar, como voluntária, em uma pesquisa: **“CÂNCER DE COLO DO ÚTERO: Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Quilombolas, Aceitabilidade da Vacina e sua Aplicabilidade para o SUS”**. Com o objetivo de Analisar a o câncer de colo do útero, a infecção por Papilomavírus humano (HPV) em mulheres quilombolas, a aceitabilidade da vacina e sua aplicabilidade no Sistema Único de Saúde (SUS). No caso de você concordar em participar, favor assinar ao final deste documento. Você receberá uma cópia deste termo assinada em duas vias por você e pelo pesquisador responsável onde há o telefone e endereço do pesquisador (a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação antes e durante a pesquisa. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento sem nenhuma penalização e interrupção do seu acompanhamento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a Instituição. **Local de Execução:** Universidade Federal do Maranhão – UFMA – Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada– NIBA - Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, Prédio do CCBS, Bloco 3, Sala 3A. Tel: 3272-8535, São Luís –MA. **Critério de Inclusão dos Indivíduos:** Eu poderei ser incluída nesta pesquisa se atender aos seguintes critérios: ser afro descendente, pertencer a uma das comunidades quilombolas em estudo e possuir faixa etária entre 12 a 59 anos. **Critério de Exclusão:** Mulheres HIV positivas, diabéticas, com uso de imunossupressores, não ser afro descendente, não pertencer a uma das comunidades quilombolas em estudo e se negar a participar do estudo. **Crítérios de Acompanhamento e Assistência como responsáveis:** As mulheres selecionadas serão acompanhadas por médica, bem como pelos demais investigadores, citados no item 4, sendo estes responsáveis pela tomada de decisões pertinentes, durante toda a fase de execução do projeto. **Descrição do Estudo:** Trata-se de um estudo transversal de prevalência do câncer do colo do útero e da infecção por HPV em mulheres quilombolas no município de Codó-MA, região dos Cocais, em mulheres na faixa etária de 12 a 59 anos. Realizar-se-á um estudo prospectivo, descritivo e analítico para pesquisa do câncer de colo do útero, da infecção por HPV e da aceitabilidade da vacina em 400 mulheres na faixa etária entre 12 a 59 anos, no período de março de 2010 a fevereiro 2012. As mulheres serão atendidas pela equipe do projeto de pesquisa da Universidade Federal do Maranhão no Posto de Saúde da Estratégia de Saúde da Família existente nas comunidades quilombolas de Codó. (ANEXO 1 e 2). A população

acima descrita será examinada com a finalidade de detectar resultados de citologia oncológica com lesões precursoras de baixo e alto grau e comparar com a análise por colposcopia, biópsia da cérvix uterina (exame restrito àquelas, com efeito, citopático compatível com HPV). O material coletado será encaminhado para o laboratório do NIBA. As neoplasias malignas do colo de útero detectadas nesta pesquisa serão estadiadas pelo Sistema de TNM da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). **Benefícios para o Indivíduo:** Eu poderei conhecer melhor meu estado de saúde, bem como a existência de infecção pelo vírus HPV. Haverá um grande benefício para a promoção da minha saúde. Caso detectado alguma lesão, poderei tratar precocemente e obter maior chance de cura. **Riscos para o Indivíduo:** O estudo não oferece riscos. Os desconfortos são aqueles associados à coleta do exame citopatológico para rastreamento de neoplasia e infecção pelo HPV. Em raras ocasiões, pode haver sangramento durante a coleta. Os materiais utilizados para esses procedimentos serão estéreis e/ou descartáveis.

11. Alternativa para o Estudo: não se aplica.

12. Exclusão dos Indivíduos: Eu poderei ser excluída do projeto se não conseguir completar os requisitos de cada etapa.

13. Direitos dos Indivíduos para recusar-se a participar ou retirar-se do estudo: Eu entendo que minha participação no projeto é voluntária e posso recusar-me a participar ou posso interromper minha participação em qualquer hora, sem penalização.

14. Direitos dos indivíduos quanto à privacidade: Eu concordo com a publicação dos dados obtidos, desde que preservado o meu nome. Estou ciente que haverá total proteção à minha participação. Concordo ainda que os resultados poderão estar disponíveis para a Agência Financiadora da Pesquisa, observando a privacidade do meu nome.

15. Publicação das Informações: As informações coletadas referentes ao projeto estarão disponíveis para a Equipe envolvida na pesquisa e para a Agência Financiadora. Poderão ser publicados de acordo com o item 14.

16. Informação Financeira: Minha participação neste estudo não implica em contrato de trabalho. Eu não receberei nenhuma compensação financeira para participar do estudo.

17. Dano à Saúde: Fui comunicada que qualquer ocorrência que não seja decorrente do estudo e surja durante o estudo, deverá ser tratada por conta própria, ou seja, o estudo que participo não assume nenhum compromisso no tratamento de outras enfermidades. Nestes casos, deverei comunicar à equipe do projeto todas as informações referentes à enfermidade e o seu tratamento. Se existe alguma intercorrência decorrente da pesquisa comunicarei ao investigador principal no telefone: (098) 8189-0191, em qualquer horário do dia ou da noite.

18. Assinaturas: O estudo foi discutido comigo e todas as questões foram respondidas. Eu entendo que perguntas adicionais relacionadas ao estudo devem ser dirigidas aos investigadores relacionados acima. Eu entendo que se tiver dúvidas sobre direitos dos voluntários, posso contatar o Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão. Eu concordo com os termos acima e acuso o recebimento de uma cópia desse consentimento.

Voluntária

**PARA QUAISQUER INFORMAÇÕES, POR FAVOR, DIRIGIR-SE A OS
SEGUINTE ENDEREÇO:**

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

ENDEREÇO: Rua Duque Bacelar, Qd-33, nº 41, Quintas do Calhau CEP
65067510 São Luís -MA

TELEFONE: (98) 814727

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:


ENDEREÇO: Avenida dos Portugueses, 1966, Prédio CEB Velho, Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação, Sala 07 CEP 65080-805

TELEFONE : (098) 3272-8701

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:

Prof. Dr. Francisco Navarro

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/MA 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: CÂNCER DE COLO DO ÚTERO: Papilomavirus Humano (HPV) em Mulheres Quilombolas, Aceitabilidade da Vacina e sua Aplicabilidade para o SUS. Pesquisador: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.); Versão: 3 CAAE: 18685813.6.0000.5087 Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA								
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 765.413 Data da Relatoria: 29/08/2014 Apresentação do Projeto: O Papilomavirus humano (HPV) compreende membros da família Papilomaviridae. Foram identificado mais de 200 tipos de HPV e cerca de 40 são responsáveis pela infecção da região anogenital e mucosa oral. (P.CATES, 1999; WEINSTOCK, 2004; PSYRRI; DIMAIO,2007; Doorbar et al., 2012; Curado and Boyle, 2013;). Entre os fatores de risco há uma relação entre o baixo nível socioeconômico dos paciente e baixa higiene pessoal que são considerados os mais importantes para o desenvolvimento do câncer de pênis. (FAVORITO et al, 2008; Chaux et al., 2012; Forman et al., 2012). A infecção pelo HPV tem sido associada com carcinoma anogenital, incluindo câncer cervical, vulvar, anal, peniano e mais recentemente um subconjunto de carcinoma de células epidermóide de cabeça e pescoço (GILLISON, 2006; Forman et al., 2012). Aproximadamente 25% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço estão mundialmente associados com alto risco para o papilomavirus humano dos tipos 16, 18, 31, 33, 35 encontrados no genoma de DNA (KREIMER et al., 2005; Curado and Boyle, 2013). A prevalência de infecção por HPV na mucosa oral é de 6,6%. Cerca de 60% a 70% dos cânceres da orofaringe são positivos para HPV e 10 a 19% são tumores da cavidade oral, laringe e hipofaringe. O HPV 16 é responsável por 87% dos casos								
<table border="0" style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td>Endereço: Avenida dos Portugueses, 1958 CEB Velho</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética</td> <td>CEP: 65.080-040</td> </tr> <tr> <td>UF: MA</td> <td>Município: SÃO LUIS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (98)3272-8708</td> <td>Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br</td> </tr> </table>	Endereço: Avenida dos Portugueses, 1958 CEB Velho		Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética	CEP: 65.080-040	UF: MA	Município: SÃO LUIS	Telefone: (98)3272-8708	Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br
Endereço: Avenida dos Portugueses, 1958 CEB Velho								
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética	CEP: 65.080-040							
UF: MA	Município: SÃO LUIS							
Telefone: (98)3272-8708	Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br							

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 705.413

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os comentários e considerações enviados pelo relator foi acatado pelo pesquisador e foram corrigidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as considerações sobre os termos de apresentação obrigatória foram acatados e corrigidos pelo pesquisador.

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências e inadequações foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO LUIS, 10 de Setembro de 2014

Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1988 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.095-040
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8705 Fax: (98)3272-8705 E-mail: cepufma@ufma.br

ANEXO B: NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Periódico: *Plos One*

Classificação WEBQUALIS: A1 na área de avaliação Medicina II

Submission Guidelines

Style and Format

File format

Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.

Length

Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font

Use any standard font and a standard font size.

Headings

Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout

Manuscript text should be double-spaced.

Do not format text in multiple columns.

Page and line numbers

Include page numbers and line numbers in the manuscript file.

Footnotes

Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

Language

Manuscripts must be submitted in English.

You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.

Abbreviations

Define abbreviations upon first appearance in the text.

Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. List all non-standard abbreviations (with definitions) in alphabetical order in a separate section at the beginning of the manuscript.

Keep abbreviations to a minimum.

Reference style

PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references.

See reference formatting examples and additional instructions below.

Equations

We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable.

Avoid using MathType or Equation Editor to insert single variables (e.g., \mathcal{A} or Qz) in running text. Wherever possible, single symbols should be inserted as normal text with the correct Unicode (hex) values.

Do not use MathType or Equation Editor for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

Nomenclature

Use correct and established nomenclature wherever possible.

Units of measurement Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.

Drugs Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).

Species names Write in italics (e.g., *Homo sapiens*). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the

synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below the list.

Beginning section

The following elements are required, in order:

Title page: List title, authors, and affiliations as first page of manuscript

Abstract

Introduction

Middle section

The following elements can be renamed as needed and presented in any order:

Materials and Methods

Results

Discussion

Conclusions (optional)

Ending section

The following elements are required, in order:

Acknowledgments

References

Supporting Information Captions (if applicable)

Other elements

Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately.

Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited.

Supporting information files are uploaded separately.

Please refer to our downloadable sample files to make sure that your submission meets our formatting requirements:

[Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)

[Download full manuscript sample \(PDF\)](#)

[Parts of a Submission](#)

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, comprehensive to readers outside the field	Specific, descriptive, concise, and

Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model

Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial

Short title 50 characters State the topic of the study

Cigarette Smoke Exposure and Innate Immunity

SODIS and Childhood Diarrhoea

Titles should be written in title case (all words capitalized except articles, prepositions, and conjunctions). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Who belongs on the author list

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy. Read the policy.

Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. Read more about Acknowledgments.

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

First name (or initials, if used)

Middle name (or initials, if used)

Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

One corresponding author should be designated in the submission system as well as on the title page.

One corresponding author should be designated in the submission system. However, this does not restrict the number of corresponding authors that may be

listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication.

Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include the consortium or group name in the author list, and include the full list of members in the Acknowledgments or in a Supporting Information file.

The corresponding author is responsible for making sure all authors approve the final manuscript before submission. PLOS ONE will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system. The length limit is 1 page.

The cover letter should include the following information:

Summarize the study's contribution to the scientific literature

Relate the study to previously published work

Specify the type of article (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)

Describe any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript

Suggest appropriate Academic Editors to handle your manuscript (see the full list of Academic Editors)

List any opposed reviewers

IMPORTANT: Do not include requests to reduce or waive publication fees in the cover letter. This information will be entered separately in the online submission system.

Read about publication fee assistance.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should:

Describe the main objective(s) of the study
Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
Summarize the most important results and their significance
Not exceed 300 words
Abstracts should not include:

Citations
Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
Define the problem addressed and why it is important
Include a brief review of the key literature
Note any relevant controversies or disagreements in the field
Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

The Materials and Methods section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Read the Supporting Information guidelines.

Human or animal subjects and/or tissue or field sampling

Methods sections describing research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the reporting guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Data

Methods sections of manuscripts using data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use.

If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.

A list of recommended repositories for different types of data can be found [here](#).

Cell lines

Methods sections describing research using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the reporting guidelines for cell line research for more information.

New taxon names

Methods sections of manuscripts adding new taxon names to the literature must follow the reporting guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results

The Results section should provide details of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper, including information on the number of replicates (if relevant to ensure replicability). There is no specific word limit for this section, but details of experiments that are peripheral to the main thrust of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplemental files; these are published online alongside the accepted article. The Results section should be written in past tense.

Results, Discussion, Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled “Results and Discussion”) or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled “Discussion”). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn.

Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the PLOS ONE Criteria for Publication for more information.

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like “scientific editing service” or “manuscript editing service.”

Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the PLOS ONE publication criterion for language standards may be rejected.

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the online submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

Published or accepted manuscripts

Manuscripts on pre-print servers, if the manuscript is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print

Do not cite the following sources in the reference list:

Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in brackets. PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before ordering the citations.

Formatting references

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the ICMJE sample references.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

Journal name abbreviations should be those found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

Source Format

Published articles

Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res*. 2011;10: 1576-1588.

Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. *Mol Immunol*. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005

Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

Accepted, unpublished articles Same as published articles, but substitute “In press” for page numbers or DOI.

Web sites or online articles

Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health*. 2005;1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Books

Bates B. *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.

Book chapters Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.

Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv) Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreira DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available: arXiv:1403.3301v1. Accessed 17 March 2014.

Published media (print or online newspapers and magazine articles) Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. *The New York Times*. 29 Jan 2014. Available:

<http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.

New media (blogs, web sites, or other written works) Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>.

Masters' theses or doctoral dissertations Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available: <http://cuminad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>

Databases and repositories (Figshare, arXiv) Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013. Database: figshare [Internet]. Accessed: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214.

Multimedia (videos, movies, or TV shows) Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All Supporting Information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 10 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a Supporting Information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting files should be publication-ready, as they are not copyedited.

Supporting Information captions

List Supporting Information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite Supporting Information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite Supporting Information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Read the Supporting Information guidelines for more details about submitting Supporting Information and multimedia files.

Figures and tables

Figures

Do not include figures in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Read the guidelines for figures.

Figure captions

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

A figure label with Arabic numerals, and “Figure” abbreviated to “Fig” (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of “Fig 1” must refer to a figure file named “Fig1.tif”).

A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

Read more about figure captions.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

Read the guidelines for tables.

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

Read our policy on data availability.

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types.

We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include Dryad and FlowRepository. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

Deposit data in the integrated repository of choice.

Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data. Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please email us.

Accession numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Suggested databases include, but are not limited to:

ArrayExpress
BioModels Database
Database of Interacting Proteins
DNA Data Bank of Japan [DDBJ]
DRYAD
EMBL Nucleotide Sequence Database
GenBank
Gene Expression Omnibus [GEO]
Protein Data Bank
UniProtKB/Swiss-Prot
ClinicalTrials.gov

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

Ensembl
Entrez Gene
FlyBase
InterPro
Mouse Genome Database (MGD)
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
PubChem

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Striking image

You can choose to upload a “Striking Image” that we may use to represent your article online in places like the journal homepage or in search results.

The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the submission, i.e., a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows.

If no striking image is uploaded, we will designate a figure from the submission as the striking image.

Striking images should not contain potentially identifying images of people. Read our policy on identifying information.

The PLOS content license also applies to striking images. Read more about the content license.

Additional Information Requested at Submission

Funding statement

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

This information will be published with the final manuscript, if accepted, so please make sure that this is accurate and as detailed as possible. You should not include this information in your manuscript file, but it is important to gather it prior to submission, because your financial disclosure statement cannot be changed after initial submission.

Your statement should include relevant grant numbers and the URL of any funder's web site. Please also state whether any individuals employed or contracted by the funders (other than the named authors) played any role in: study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If so, please name the individual and describe their role.

Read our policy on disclosure of funding sources.

Competing interests

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

All potential competing interests must be declared in full. If the submission is related to any patents, patent applications, or products in development or for market, these details, including patent numbers and titles, must be disclosed in full.

Read our policy on competing interests.
Manuscripts disputing published work

For manuscripts disputing previously published work, it is PLOS ONE policy to invite input from the disputed author during the peer review process. This procedure is aimed at ensuring a thorough, transparent, and productive review process.

If the disputed author chooses to submit a review, it must be returned in a timely fashion and contain a full declaration of all competing interests. The Academic Editor will consider any such reviews in light of the competing interest.

Authors submitting manuscripts disputing previous work should explain the relationship between the manuscripts in their cover letter, and will be required to confirm that they accept the conditions of this review policy before the manuscript is considered further.

Related manuscripts

Upon submission, authors must confirm that the manuscript, or any related manuscript, is not currently under consideration or accepted elsewhere. If related work has been submitted to PLOS ONE or elsewhere, authors must include a copy with the submitted article. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

We strongly discourage the unnecessary division of related work into separate manuscripts, and we will not consider manuscripts that are divided into “parts.” Each submission to PLOS ONE must be written as an independent unit and should not rely on any work that has not already been accepted for publication. If related manuscripts are submitted to PLOS ONE, the authors may be advised to combine them into a single manuscript at the editor's discretion.

Guidelines for Specific Study Types

Human subjects research

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or by equivalent ethics committee(s), and must have been conducted according to the principles expressed in the

Declaration of Helsinki. Authors should be able to submit, upon request, a statement from the IRB or ethics committee indicating approval of the research. We reserve the right to reject work that we believe has not been conducted to a high ethical standard, even when formal approval has been obtained.

Subjects must have been properly instructed and have indicated that they consent to participate by signing the appropriate informed consent paperwork. Authors may be asked to submit a blank, sample copy of a subject consent form. If consent was verbal instead of written, or if consent could not be obtained, the authors must explain the reason in the manuscript, and the use of verbal consent or the lack of consent must have been approved by the IRB or ethics committee.

All efforts should be made to protect patient privacy and anonymity. Identifying information, including photos, should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF). More information about patient privacy, anonymity, and informed consent can be found in the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Privacy and Confidentiality guidelines.

Manuscripts should conform to the following reporting guidelines:

Studies of diagnostic accuracy: STARD

Observational studies: STROBE

Microarray experiments: MIAME

Other types of health-related research: Consult the EQUATOR web site for appropriate reporting guidelines

Methods sections of papers on research using human subjects or samples must include ethics statements that specify:

The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s). If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed

Whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:

Why written consent could not be obtained

That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent

How oral consent was documented

For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:

Explicitly describe their methods of categorizing human populations

Define categories in as much detail as the study protocol allows

Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency

Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis

In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: “Caucasian” should be changed to “white” or “of [Western] European descent” (as appropriate); “cancer victims” should be changed to “patients with cancer.”

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must download the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF), which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about PLOS ONE policies regarding human subjects research, see the Publication Criteria and Editorial Policies.