

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



THICIANE ARAUJO CHAVES

**INFECÇÕES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E TRIAGEM DE
CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DAS TRIBOS YANOMAMI, MACUXI E
WAPISHANA**

**ARACAJU
2016**

THICIANE ARAUJO CHAVES

**INFECÇÕES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E TRIAGEM DE
CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DAS TRIBOS YANOMAMI, MACUXI E
WAPISHANA**

Monografia apresentada ao colegiado do curso de Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Medicina.

Orientadora: Daniela Siqueira Prado

**Aracaju-SE
2016**

THICIANE ARAUJO CHAVES

**INFECÇÕES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E TRIAGEM DE
CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DAS TRIBOS YANOMAMI, MACUXI E
WAPISHANA**

Monografia apresentada ao colegiado do curso de
Medicina da Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em
Medicina.

Autora: Thiciane Araujo Chaves

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Siqueira Prado

**ARACAJU
2016**

THICIANE ARAUJO CHAVES

**INFECÇÕES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E TRIAGEM DE
CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DAS TRIBOS YANOMAMI, MACUXI E
WAPISHANA**

Monografia apresentada ao colegiado do curso de
Medicina da Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em
Medicina.

Orientadora: Daniela Siqueira Prado

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois tudo só acontecesse com a Sua permissão.

À minha família e ao meu amor, por serem minha maior inspiração, meu grande incentivo e minha fortaleza.

A essa Instituição que me acolheu com tanto carinho e me ajudou a buscar sempre o melhor que eu posso me tornar.

À Universidade Federal de Roraima, que me deu todo o suporte necessário para a conclusão da pesquisa, objeto desse trabalho, e me fez acreditar que, se sonharmos, podemos ir além.

À minha orientadora, Dra. Daniela Siqueira Prado, pelo seu apoio, confiança e empenho dedicado a esse trabalho.

Ao Dr. Alex Jardim Fonseca, idealizador do projeto, exemplo de competência e dedicação ao paciente.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- HPV: papilomavírus humano
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- CCU: Câncer do Colo Uterino
- INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- DSEI: Distritos Sanitários Especiais Indígenas
- DST: Doenças Sexualmente Transmissíveis
- ZT: Zona de Transformação
- SIL: Lesão escamosa intraepitelial
- NIC I: Neoplasia intraepitelial cervical grau I
- HSIL: Lesão escamosa intraepitelial de alto grau
- SIL II: Lesão escamosa intraepitelial II
- NIC II: Neoplasia intraepitelial cervical grau II
- NIC II: Neoplasia intraepitelial grau III
- ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado
- AGUS: Células glandulares atípicas de significado indeterminado

SUMÁRIO

Introdução	8
Papiloma vírus humano (HPV)	9
Definição e Características	9
Epidemiologia	10
Fatores de Risco para Infecção pelo HPV	16
Formas de Transmissão	17
Patogênese (fases da infecção pelo HPV)	18
Sintomas	20
Diagnóstico	22
Prevenção	24
Tratamento	28
Referências bibliográficas	31
Apêndice I - Artigo Traduzido	38
Apêndice II - Artigo Original	58

INFECÇÕES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E TRIAGEM DE CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DAS TRIBOS YANOMAMI, MACUXI E WAPISHANA

Introdução

A infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV) é a mais frequente doença sexualmente transmissível na mulher e no homem. Estima-se que pelo menos 50% dos indivíduos sexualmente ativos irão entrar em contato com o HPV, em algum momento de suas vidas, e que 80% das mulheres terão esse contato até os 50 anos de idade. Como acontece com a prevalência, a incidência da infecção por HPV é alta em mulheres jovens, no início da atividade sexual e a cada novo parceiro, e diminui com a idade, observando-se também segundo pico em mulheres mais velhas. No Brasil, a positividade para o HPV na população geral de mulheres varia de 21 a 48%, sendo o HPV de alto risco encontrado em 48 a 53% (FEDRIZZI, 2011).

Atualmente existem mais de 200 tipos diferentes identificados de HPV, entre os quais mais de 100 estão completamente sequenciados geneticamente e mais de 120 com sequenciamento parcial. Cerca de 45 tipos infectam o epitélio do trato anogenital masculino e feminino (MUÑOZ et al., 2006). Destes, 13 a 18 são considerados de alto risco oncogênico, principalmente os tipos 16 e 18, associados ao câncer anogenital e do trato aerodigestivo (TROTIER et al., 2006). Os HPV de baixo risco oncogênico, principalmente o 6 e 11, causam as lesões benignas anogenitais (verrugas, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) e na laringe (papilomatose laringea recorrente), com substancial morbidade e alto custo de tratamento (TROTIER et al., 2006).

Populações diferentes, especialmente grupos indígenas isolados, podem apresentar infecções de HPV diferentemente caracterizadas, de acordo com seus antepassados, estilo de vida e comportamento sexual. Além disso, é necessário conhecimento sobre a epidemiologia do HPV para que se entenda o papel etiológico dos diferentes tipos e variantes de HPV nessas populações, a fim de se desenvolver estratégias de prevenção contra o Câncer de Cérvix Uterina. Grupos indígenas isolados (Yanomami) e grupos com uma interação permanente com a sociedade (Macuxi e Wapishana) habitam o extremo norte da Amazônia brasileira, apresentando assim uma diferença ecológica que pode ser utilizada para investigar a influência do isolamento e condições de vida pré-históricas sobre a diversidade do HPV e das

doenças cervicais associadas. O objetivo dessa investigação é avaliar a prevalência de lesões cervicais intra epiteliais e do HPV em grupos indígenas da região amazônica.

Papiloma vírus humano (HPV)

Definição e Características

O Papilomavírus humano é um vírus com DNA de dupla hélice, com aproximadamente 8.000 pares de bases nitrogenadas que codificam todas as funções do vírus. A partícula viral tem 55 nanômetros (nm) de diâmetro, sem envelope lipídico (CARVALHO, 2007), que pode ser transmitido pela via sexual ou pelo contato direto com a pele (MELLO et al., 2010). O HPV é responsável pelo aparecimento das verrugas comuns da pele e pelas verrugas genitais, conhecidas também como condiloma acuminado ou crista de galo. Mas o que torna esse vírus de grande relevância médica é o fato dele estar relacionado a praticamente 100% dos casos de câncer de colo do útero, um dos tipos de câncer mais comuns na população feminina (PINHEIRO, 2016).

Conhecidas desde a antiguidade, as infecções genitais pelo HPV chamaram atenção a partir da década de 80, quando se identificou a correlação destas lesões com o câncer de colo uterino. Mais de 150 tipos até o momento foram identificados, dos quais apenas 35 podem infectar a região anogenital feminina e masculina (CARVALHO, 2007).

O HPV pode se instalar em qualquer região do corpo, bastando haver uma porta de entrada através de micro-abrasões (micro-traumas) da pele ou mucosa. Já se detectou o vírus não só na região genital, mas também extragenital como olho, boca, faringe, vias respiratórias, ânus, reto e uretra. E ainda, sua presença foi encontrada no líquido amniótico (líquido que envolve o feto na vida intra-uterina) (CARVALHO, 2007).

O HPV infecta, exclusivamente, os seres humanos, acometendo as células do epitélio da pele e da mucosa, provocando na região infectada alterações localizadas que resultam no aparecimento de lesões decorrentes do crescimento celular irregular. A ação do vírus sobre as células da pele favorece a formação de tumores, a maioria dos quais pequenos e benignos, tais como as verrugas comuns de pele ou as verrugas genitais. Porém, quando área infectada é a mucosa do colo do útero, da vagina, do pênis ou do ânus, o vírus pode induzir a formação de tumores malignos, gerando, por exemplo, o câncer do colo do útero e o câncer anal (PINHEIRO, 2016).

Cada subtipo do vírus tem atração por uma determinada área do corpo. Por exemplo, o HPV-2 e o HPV-4 estão associados às verrugas comuns de pele, enquanto o HPV-1 provoca verrugas que acometem preferencialmente as plantas dos pés. Já o HPV-6 e o HPV-11 estão relacionados ao

desenvolvimento das verrugas genitais. O câncer do colo uterino pode ser provocado por vários subtipos, conforme veremos a seguir, mas a maioria dos casos ocorre quando a mulher se infecta com o HPV-16 ou o HPV-18 (PINHEIRO,2016).

No tocante à oncogênese, a infecção pelo HPV é responsável por 99% dos cânceres de colo de útero, 93% dos cânceres de ânus, 60% dos cânceres da vulva e 50% dos cânceres de pênis e vagina. Os subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são considerados os mais oncogênicos, enquanto outros são menos agressivos, com baixo risco de transformação maligna, como os subtipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81 (MUÑOZ, 2003).

Cerca de 70% dos casos de câncer do colo de útero são provocados por apenas 2 subtipos, 50% pelo HPV-16 e 20% pelo HPV-18. O HPV-16 também está associado aos cânceres anal, peniano, vaginal, vulvar e de orofaringe, sendo este, portanto, o subtipo de HPV mais oncogênico, tanto para homens quanto para mulheres (MUÑOZ et al., 2003).

Além do subtipo do HPV, outro fator importante para a gênese de um tumor maligno é o tempo de infecção. A maioria das pessoas contaminadas pelo HPV consegue se livrar espontaneamente do vírus após 1 ou 2 anos. Cerca de 10% dos indivíduos contaminados, porém, desenvolvem infecção persistente, apresentando maior risco de desenvolver neoplasias (SCHIFFMAN, 2003).

O HPV necessita, em média, de 10 a 20 anos para provocar alterações celulares capazes de gerarem tumores malignos. Por isso, os exames de rastreio do câncer de cérvix uterino são essenciais para que se possa identificar a ocorrência de alterações pré-malignas, as quais surgem anos antes do tumor maligno se instalar (SMITH et al.,2007).

Epidemiologia

A incidência da infecção pelo HPV depende do método de diagnóstico utilizado e da população avaliada. A faixa etária de maior acometimento situa-se entre 20 e 40 anos, com o pico de incidência entre 20 e 24 anos, tanto na população feminina como masculina. Há estudos demonstrando que a prevalência de infecção pelo HPV é maior na raça branca que na raça negra, sendo encontrada também nos indígenas (CARVALHO et al., 2007).

Em relação à distribuição mundial, temos países com maior incidência que outros, como ocorre na Colômbia onde a incidência de HPV e câncer de colo uterino é muito elevada, ao contrário do que ocorre na Espanha. Em relação ao câncer de esôfago e associação com o HPV, sabemos que o povo chinês e africano apresenta maior incidência. No Brasil, na região Nordeste, em especial em Recife, temos um maior índice de HPV e câncer de colo uterino (CARVALHO, et al., 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 630 milhões de homens e mulheres (1:10 pessoas) estão infectadas pelo HPV14. No Brasil, estima-se que haja 9 a 10 milhões de infectados por esse vírus e que, a cada ano, 700 mil casos novos surjam, podendo ser considerada, portanto, uma epidemia. Cerca de 105 milhões de pessoas são positivas para o HPV 16 ou 18 no mundo (FEDRIZZI, 2011).

A infecção pelo vírus do HPV está diretamente relacionada ao início das atividades sexuais, sendo, portanto, mais evidente no período da adolescência. Nesta fase, a atividade biológica cervical está em nível máximo. A replicação celular e substâncias e o meio cervical facilitam a infecção pelo Papiloma vírus humano (HPV). Após a adolescência, a frequência da infecção pelo HPV nas mulheres diminui com a idade (MURTA et al., 2001).

Nos últimos 20 anos, o jovem passou a ter acesso às mais diversas fontes de informação no que diz respeito às questões sexuais. No final dos anos 80, destacou-se o advento da AIDS, e a precocidade da iniciação sexual entre adolescentes, na última década. Estudos diversos mostraram que adolescentes com baixa escolaridade iniciam a vida sexual de forma mais precoce e que os jovens de menor nível educacional e de menor idade possuem menos conhecimento sobre métodos anticoncepcionais (ALMEIDA et al., 2003; AZEVEDO, 2001).

O aumento da precocidade nas relações sexuais, do número de parceiros, bem como a falta do uso constante do preservativo acarretam uma maior probabilidade de infecções pelo HPV (ISOLAN et al., 2001).

Como já dito anteriormente, o Brasil, por ser um país com dimensões continentais e altos índices de desigualdades socioeconômicas regionais, possui grande incidência de câncer cervical nas regiões norte e nordeste (MELLO, et al., 2010). Estima-se que mais de 75% de adolescentes e adultos sexualmente ativos, com idade entre 15 e 49 anos, adquiram ao menos um tipo de infecção pelo HPV durante sua vida (PALEFSKY, 2001).

Nos Estados Unidos, 50% das adolescentes e mulheres jovens adquirem HPV dentro de três anos após o início da relação sexual. Infecções pelo HPV detectadas em adolescentes em geral refletem doença benigna e infecções detectadas em mulheres mais velhas, caracterizam-se, via de regra, por serem infecções persistentes, com um maior risco de lesão intraepitelial cervical avançado. O que pode levar a câncer cervical invasivo (WIDDICE e MOSCICKI, 2008).

A literatura tem mostrado que o risco de uma mulher infectada pelo HPV desenvolver câncer de colo uterino, comparada com outra não infectada, é 50 a 70 vezes maior (PAULA, 2006). Assim, torna-se necessário que as mulheres, e também seus parceiros, sejam orientados

quanto à infecção por HPV, sendo impossível realizar a prevenção contra o câncer cérvico-uterino sem mencionar os riscos e implicações da infecção por esse vírus (GILLISON et al., 2008).

A maior parte dos estudos, sobre Doenças Sexualmente Transmissíveis, publicados no país, até o momento, avaliou a incidência da infecção pelos diferentes agentes etiológicos nos seguintes grupos de pacientes: populações de alto risco, como profissionais do sexo, e pacientes atendidas em clínicas especializadas em DST's, ou investigou quais as DST's mais prevalentes em pacientes internados, populações indígenas, adolescentes e prisioneiros (PASSOS, et al, 1994; SANTOS, et al., 2003; PENNA, et al., 2005).

Epidemiologia em populações indígenas do Extremo Norte do Brasil

Apesar de a saúde indígena ser apontada como prioritária por organizações de saúde, estudos sobre prevalência de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero nas populações nativas do Brasil são escassos. Mais de 15% da população de Roraima é formada por indígenas aldeadas, mas seu risco de câncer do colo do útero é praticamente desconhecido (FONSECA et al., 2014).

Com uma estimativa de 23 casos novos por 100 mil mulheres, a região Norte é a única do Brasil onde o câncer de colo uterino supera o câncer de mama, assumindo a liderança dos cânceres femininos. Em Roraima, esse problema parece ser ainda mais grave (FONSECA et al., 2016). O Estado de Roraima faz parte da Amazônia Brasileira e apresenta elevada incidência do Câncer do Colo Uterino (CCU). Dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimam incidência de 22/100.000, em 2014, para Roraima, o que vem se mantendo estável nos últimos anos. Entretanto, um estudo de base populacional demonstrou taxa de incidência bruta de CCU maior que as estimativas do INCA (46/100.000) em 2010 em Roraima (FONSECA et al., 2014).

Em estudo direcionado à população indígena, 25% dos casos de Câncer de Colo Uterino (CCU) foram registrados em mulheres provenientes de áreas de reserva, sugerindo maior vulnerabilidade desse grupo étnico (que corresponde a aproximadamente 10% da população do Estado de Roraima no ano estudado) (FONSECA et al., 2014).

Apesar dessa prioridade dada pelas Organizações de Saúde (WHO, 2007), o perfil epidemiológico dos povos indígenas é pouco conhecido no Brasil, em virtude da exiguidade de investigações, da ausência de inquéritos regulares, e da precariedade dos sistemas de

registro de informações sobre morbidade e mortalidade nesses grupos étnicos (COIMBRA,2003).

No caso do extremo Norte da Região Amazônica, devido a fatores culturais, étnicos e antropomórficos, os povos indígenas foram divididos em dois Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI): o DSEI Leste (composto principalmente pelas etnias Makuxi e Wapichana); e o DSEI Yanomami (etnias Yanomami, Yekuana, Xirixana e Sanum.) (FONSECA et al., 2014).

Os grupos étnicos de ambos DSEI não são homogêneos e se caracterizam por graus distintos de interação com a sociedade envolvente. As comunidades indígenas do DSEI Leste se caracterizam por possuírem fronteiras étnicas tênues com a sociedade ocidental envolvente, com contato social iniciado no período da ocupação colonial portuguesa, no meado do século XVIII. Nesses dois séculos de interação, registram-se a ocupação das terras indígenas do Leste por atividades agropecuárias e garimpeiras, e a expulsão dos indígenas de suas aldeias originais (FONSECA et al., 2014).

Atualmente, a maioria dos integrantes das etnias que fazem parte do DSEI Leste é classificada como de interação recente ou interação permanente com a sociedade não indígena, fluentes em língua portuguesa, e comumente aderentes aos costumes sociais, culturais e hábitos ocidentais (DANGOUR, 2003). Por outro lado, os povos Yanomami permaneceram até o início do século XX isolados em seus territórios, nas regiões fronteiriças entre Brasil e Venezuela, de tal forma que os únicos e raros contatos que eles mantiveram por vários séculos foram restritos a outros grupos indígenas do próprio DSEI (FONSECA et al., 2014).

Somente entre 1910 e 1940 foram registrados os primeiros contatos com não índios. O acesso às suas comunidades somente é possível por via aérea (avião pequeno), controlado pelo governo brasileiro. Os grupos formam uma sociedade de caçadores, agricultores e coletores da floresta amazônica, permanecendo aldeados e mantendo seus costumes como língua nativa, estrutura social típica e hábitos como união conjugal precoce e multiparidade (FONSECA et al., 2014).

Geneticistas e antropólogos, ao estudarem os Yanomami, concluíram que a ausência de afinidade genética, antropométrica e linguística com os grupos indígenas do DSEI Leste motivou o isolamento dessa etnia desde os tempos remotos (CREWS et al., 1993 e WARD et al., 1975). Dados sobre a epidemiologia da saúde da mulher indígena na Amazônia ainda são escassos, principalmente a respeito de estimativas de risco de Câncer de Colo Uterino em minorias étnicas especiais (FONSECA et al., 2014).

Em tempo, vale esclarecer que o DSEI Yanomami situa-se nas regiões fronteiriças entre Brasil e Venezuela, e seu território do lado brasileiro cobre 92.000 km² de floresta amazônica densa, de difícil acesso. Os Yanomami pertencem à unidade étnica *Yanomamö*, possuem filiação linguística própria (*Yanomamam*), e correspondem a aproximadamente 18.000 habitantes, distribuídos em mais de 228 comunidades registradas (FONSECA et al., 2014).

O DSEI Leste situa-se nas regiões fronteiriças entre Brasil e Guiana Inglesa, com extensão territorial de 78.000 km² de áreas de savana, de acesso terrestre (ou fluvial) facilitado. Sua população corresponde a quase 40.000 habitantes distribuídos em aproximadamente 80 comunidades. É representada principalmente pelas etnias Macuxi e Wapichana, mas também por Waimiri, Ingaricó, Atroari, Wai-wai, Taurepang. Tais etnias pertencem à mesma filiação linguística *Karib*, e à unidade étnica *Pemon* (FONSECA et al., 2014).

Faz-se necessário, entender melhor a realidade da população indígena brasileira em suas mais diversas etnias, levando em consideração todas as particularidades de cada grupo indígena avaliado. Avanços significativos podem ser observados nas últimas décadas referentes a publicações sobre saúde reprodutiva da mulher no contexto brasileiro. Nota-se, entretanto, que os progressos científicos desenvolveram-se, sobretudo, em contexto urbano. Os estudos socioantropológicos e investigações epidemiológicas sobre etnicidade e saúde da mulher trabalham em sua maioria com mulheres negras, permanecendo uma grande lacuna no conhecimento dos determinantes de saúde e doença das mulheres indígenas no Brasil (FONSECA et al., 2014).

Em estudo feito em Roraima, com revisão dos registros e exames patológicos de mulheres indígenas aldeadas, submetidas a exame citopatológico na Casa de Saúde do índio (RR), entre 2004 e 2012, demonstrou-se elevada prevalência de lesões pré-malignas (LSIL=3,0% e HSIL=4,6%), bem como de lesões invasivas (1,1%), nessa população, se comparado a estudos realizados em mulheres não indígenas no Brasil. O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de ética em Pesquisa (CONEP) e publicado em 2014. Tal estudo buscou avaliar a prevalência de lesões citológicas pré-malignas e malignas do colo do útero de indígenas aldeadas nos DSEI Leste e Yanomami, no extremo Norte da Amazônia Brasileira (FONSECA et al., 2014).

Como referência, Lippman et al. descreveram os resultados do rastreamento de 818 mulheres não indígenas assintomáticas (procedentes de zonas urbanas e rurais brasileiras), com baixa prevalência de LSIL (1,4%), e nenhum caso de HSIL ou câncer invasivo. Estudo

de corte transversal realizado em 2.329 mulheres brasileiras assintomáticas (não indígenas) revelou apenas 1,0% de LSIL e 0,2% de HSIL (FONSECA et al., 2014).

Outras pesquisas trazem relatos de elevada prevalência de lesões cervicais em indígenas no Brasil. SPECK et al. realizaram rastreamento do CCU no parque indígena do Xingu, Brasil em 2005. Das 518 mulheres rastreadas, 12,6% apresentaram atipias citológicas (9,4% de LSIL; 2,8% de HSIL e 0,4% de cancer invasivo). No Estado do Pará (Amazônia Brasileira), foi realizada uma pesquisa semelhante em um pequeno grupo de mulheres indígenas aldeadas (etnia Parakã.), com detecção de HPV por PCR em 14,1% das pacientes examinadas. Quanto ao exame citológico, LSIL foi descrito em 7,5%, e HSIL em 1,2%, sem ocorrência de câncer invasivo (BRITO et al., 2002).

Outro estudo realizado no Pará, envolvendo 424 indígenas rastreadas de 16 etnias, revelou LSIL em 2,1%, HSIL em 3,3% e carcinoma invasor em 1,8% (MENDES et al., 2004). As evidências acima corroboram em classificar mulheres indígenas como de risco para CCU. O estudo, já citado, revelou ainda uma significativa diferença de prevalências de lesões cervicais entre os dois grupos étnicos estudados, que diferem em dois séculos de contato com a sociedade envolvente, e que coexistem geograficamente; porém historicamente separados entre si. Trata-se, portanto, de um cenário especialmente interessante para estudos de enfoque étnico racial (FONSECA et al., 2014).

Os impactos sobre a saúde feminina das mudanças socioculturais e ambientais que se processam em praticamente todas as comunidades indígenas têm apontado para elevação da incidência de doenças crônicas degenerativas, como o câncer nos povos indígenas, em decorrência do contato cada vez maior com a sociedade ocidental (NEEL et al., 1977). Nesse contexto, seria esperado que as comunidades do DSEI Leste, por terem mais tempo de interação com a sociedade envolvente em relação aos Yanomami, pudessem apresentar maior prevalência de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero. Entretanto, os dados apontam consistentemente para o oposto, sugerindo que outros estudos epidemiológicos são necessários para melhor investigar a relação de determinantes sociais e fatores de risco do CCU na região (FONSECA et al., 2014).

Um importante fator que pode contribuir para a maior prevalência de lesões pré-malignas e malignas entre as Yanomami é a sua própria condição de isolamento geográfico na floresta amazônica (HAYD et al., 2008). Dificuldades de entendimento e aceitação por parte das mulheres, deficiências de infraestrutura e barreiras geográficas e logísticas relacionadas às dificuldades de acesso podem explicar a baixa inclusão das mulheres Yanomami aos programas de prevenção do CCU, e, conseqüentemente, a maior prevalência de lesões

intraepiteliais cervicais. Outro fator, de grande relevância, consiste no fato de que quase 80% das Yanomami analisadas nunca haviam sido rastreadas ao longo da vida corrobora nesse sentido (FONSECA et al., 2014).

Daí a extrema importância de se organizarem ações de Saúde que englobem essa população e que, a despeito das dificuldades inerentes do próprio isolamento geográfico e cultural, permitam que a assistência médica possa chegar efetivamente nessas comunidades.

Fatores de Risco para Infecção pelo HPV

Vários são os fatores que podem contribuir para a infecção pelo HPV. Dentre esses fatores destacam-se os fatores virais (como patogenicidade), os fatores do hospedeiro, dentre os quais se destacam os fatores imunológicos e os fatores externos (como o tabagismo). Apesar de o vírus ser necessário para o desenvolvimento das lesões pré-malignas e do câncer invasivo, ele não é causa suficiente (PRIMO, et al., 2007). Diante disso, verifica-se que vários elementos colaboram para que haja a infecção pelo HPV, como más condições de vida, promiscuidade e início precoce da atividade sexual (PAULA, 2006).

Em geral a infecção por HPV acomete jovens no início da atividade sexual, um fenômeno transitório em cerca de 80% dos casos. Entretanto, uma pequena fração de mulheres apresenta persistência da infecção, provavelmente por falha de mecanismos imunológicos, o que pode provocar alteração no epitélio cervical e transformação maligna. As mulheres que apresentam infecção persistente por tipos virais de alto risco do HPV são consideradas o verdadeiro grupo de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. (RAMA et al., 2008). Das pacientes infectadas, o risco de progressão para câncer cervical invasivo é de 1 a 2 por 1.000 mulheres não tratadas num período acima de 24 meses (PRIMO, et al., 2007).

O número de parceiros sexuais durante a vida é um dos fatores associados mais importantes, além de hábitos dos parceiros e da idade do parceiro masculino em relação à da mulher, com elevação do risco quanto maior a idade do parceiro (BASEMAN e KOUTSKY, 2005). Ainda não está elucidado como o avançar da idade influencia na prevalência do HPV nas distintas populações do mundo. Estudos mostram que as maiores prevalências são encontradas em mulheres abaixo dos 25 anos, com progressivo decréscimo linear após esta idade, alcançando valores inferiores a 5% após os 55 anos (BURK, et al., 1996; GIULIANO, et al., 2001; KJAER, et al., 2000 e SANJOSE et al., 2003).

A explicação para a redução da prevalência com a elevação da idade resultaria de mudanças nos hábitos sexuais, que tornariam as mulheres menos expostas. Entretanto, alguns

estudos relatam queda na prevalência da infecção por HPV com o avanço da idade mesmo em mulheres que mantêm contínua e intensa atividade sexual. Isso sugere que essa queda não é só decorrente do comportamento sexual e parece estar mais relacionada ao desenvolvimento de imunidade tipo-específica à infecção (BURK, et al., 1996; KJAER, et al., 2000).

Além da faixa etária, fatores relacionados à maior frequência de infecção pelo HPV, como a gravidez, tabagismo, método anticoncepcional e infecções genitais, têm sido estudados. Apesar de ainda existirem controvérsias sobre a questão, alguns autores demonstraram maior incidência de infecção por HPV em gestantes, sugerindo ser a gestação um fator de risco independente para infecção por HPV (MURTA et al., 2001).

Dados da literatura mostram que o uso de anticoncepcional é um fator de risco para a infecção por HPV. Outros autores sugerem que o anticoncepcional atuaria como cofator, juntamente com alterações genéticas e alguns tipos de HPV, na transformação de células e na progressão das lesões de baixo para alto grau (MURTA et al., 2001). O tabagismo tem sido relacionado à infecção por HPV e com neoplasia cervical, devido principalmente à imunossupressão local causada pelo mesmo, que permite com maior facilidade a penetração do vírus nas células (CASTELLSAGUÉ et al., 2002).

Dados de CONFORTINI, et al. (2010), demonstraram que mulheres fumantes, de diferentes faixas etárias, apresentam maior incidência de infecção pelo HPV que as não-fumantes. A presença de coinfeções genitais, transmitidas sexualmente ou não, pode ter importância para a proliferação celular associada ao HPV, devido provavelmente, a umidade do meio vaginal. Aliado a tal fato, é descrito que as mulheres jovens estão mais predispostas a infecções tanto por HPV quanto por outros agentes infecciosos, pela imaturidade biológica da cérvix devido à maior exposição do epitélio colunar da endocérvice (MURTA, et al., 2001; MELLO, et al. 2010).

Outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) como sífilis, herpes simples, gonorréia, clamídia e HIV podem contribuir para a evolução das lesões por HPV. Essas infecções poderiam atuar como cofatores na ativação de mecanismos de transformação celular ou deprimindo a imunidade local do trato genital (CAVALCANTI, et al, 2000). Pacientes HIV positivos possuem maior prevalência de infecção por HPV e maior susceptibilidade em desenvolver lesões de alto grau (HO, et al, 1994).

Formas de Transmissão

Há, basicamente, duas formas de contágio pelo Papiloma Vírus Humano, quando há contaminação prévia de um dos envolvidos, pelo contato de pele com pele e por via sexual.

Há que se atentar ao fato de que as manifestações da contaminação pelo vírus podem variar, e que, sobretudo, nas formas iniciais nem sempre é fácil identificar o indivíduo contaminado (MCCANCE et al., 1994).

O HPV é um vírus com distribuição universal. As verrugas cutâneas são afecções virais muito freqüentes, com uma incidência estimada de 7% a 10% na população européia e de 1% na população americana (HENGGE, 2004).

O HPV é transmitido pelo contato direto ou indireto com o indivíduo que tem a lesão. Disfunções na barreira epitelial por traumatismos, pequenas agressões ou macerações provocam perda de solução de continuidade na pele, possibilitando a infecção viral (LETO et al., 2011).

Os subtipos de HPV que provocam as verrugas comuns não têm relação com os cânceres que ocorrem na mucosa da genitália, do ânus ou do colo do útero, pois eles não têm capacidade de infectar esta região. O oposto também é verdadeiro, já que os subtipos que habitualmente provocam lesão das mucosas não costumam acometer a pele (PINHEIRO, 2016). Entretanto, existem algumas exceções à regra acima. Alguns subtipos capazes de provocar verrugas na pele também podem, eventualmente, provocar verrugas genitais, tais como o HPV-1, HPV-2 e HPV-4. Esses subtipos, porém, raramente causam verrugas genitais e quando o fazem têm baixa capacidade de gerar tumores malignos (PINHEIRO, 2016).

O contágio das mucosas da vagina, vulva, ânus, pênis e colo do útero se dá através da via sexual. Hoje, sabe-se que a infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo, muito mais freqüente que AIDS, gonorréia, sífilis ou qualquer outra DST. A transmissão do HPV pelo sexo oral é possível, mas é bem menos comum do que a transmissão através do sexo vaginal ou anal. Alguns casos de câncer da orofaringe, laringe e esôfago estão relacionados a este tipo de contaminação (PINHEIRO, 2016).

Exceto pelo compartilhamento de objetos sexuais, a transmissão do HPV por outros tipos de objetos inanimados, como toalhas, roupa de cama ou roupas íntimas, não parece ocorrer. Da mesma forma, não se pega HPV em banheiros públicos, piscina, sauna ou praia (PINHEIRO, 2016). Após a inoculação, o período de incubação varia de três semanas a oito meses (HARWOOD et al., 2000). Observa-se regressão espontânea na maioria dos casos (JABLONSKA et al., 1997).

Patogênese (fases da infecção pelo HPV)

O HPV é um vírus que afeta exclusivamente as células epiteliais e sua replicação está relacionada ao processo de diferenciação dessas células no hospedeiro (FELLER et al., 2009). O vírus do HPV penetra na célula por meio da membrana basal, provavelmente pela formação

de microporos, e inicia sua replicação no núcleo da célula infectada, enquanto que a produção de vírus maduros ocorre na membrana suprabasal (HASS et al., 2010). Ao penetrar na célula ele irá se utilizar da mesma para futuramente se reproduzir. Esta fase de “hospedagem” na célula alvo é considerada fase latente da infecção (CARVALHO et al., 2000).

Podemos dividir as fases da infecção pelo HPV, da seguinte forma (CARVALHO, 2007):

1. Entrada no hospedeiro (ataque)

Após o contato com uma pessoa infectada, o HPV inicia o ataque que ocorre em uma célula alvo (geralmente células da camada basal ou parabasal), que apresenta um receptor específico.

O vírus penetra através de:

- Solução de continuidade, que são lesões na pele ou mucosa.
- Zonas de Transformação (ZT), que é a transição entre dois epitélios diferentes:
- Colo uterino;
- Locais do trato respiratório superior (cavidade nasal, paranasal e seios da face);
- Brônquios.

2. Replicação primária (penetração)

- Ocorre nas células basais e parabasais do epitélio escamoso.
- Tem centenas de partículas virais imaturas.
- Não está integrado ao genoma do hospedeiro (forma epissomal).

3. Abertura e dispersão no hospedeiro (uncoating)

- Após penetração no citoplasma, a cápsula é total ou parcialmente removida e o genoma viral é exposto.
- Espalha-se de célula para célula.

4. Tropismo celular e tecidual (transcrição)

O vírus entra no núcleo da célula alvo e continua seu ciclo de replicação executando a transcrição do seu DNA em RNA. A transcrição é restrita às células epiteliais escamosas. Existe uma predileção para a pele e mucosas.

5. Resposta imunológica do hospedeiro (translação)

Seguindo a transcrição, o RNA transcrito é traduzado em proteínas E (early) ou L (later).

6. Replicação secundária (replicação)

- O genoma do HPV pode replicar em várias linhagens celulares indiferenciadas, quando as proteínas E1 e E2 se expressam.

- Somente a porção do vírus que alcança o núcleo sofre replicação.

7. Montagem das partículas virais (dano celular)

Há estudos recentes tentando elucidar como as proteínas L1 e L2 interagem na fase de montagem da cápsula.

8. Maturação e liberação (persistência)

Esses estágios finais do ciclo de vida viral (montagem, maturação e liberação) são difíceis de serem interpretados isoladamente, pois frequentemente ocorrem simultaneamente.

- **Maturação:** fase na qual o vírus se torna infeccioso ocorrem mudanças estruturais na partícula viral, com mudanças estruturais no capsídeo, detectado com diferença na antigenicidade.
- **Liberação:** fase em que o vírus é eliminado da célula, ocorrendo uma ruptura celular, conhecido como desabrochamento. Talvez o gene E4 esteja envolvido na liberação por alterar a integridade do esqueleto celular, pois é encontrado aos filamentos de queratina.

As células da pele e mucosa sob ação do HPV sofrem modificações se multiplicando, ficando abauladas, com citoplasma cheio de vacúolos; o núcleo fica deformado e é jogado para a periferia da célula.

Alterações Citológicas Observadas

- **Coilocitose:** A célula apresenta o seu citoplasma vacuolizado, com o núcleo localizado na periferia.
- **Discariose:** Os núcleos estão mais hiperocrômicos e alterados em sua forma (divididos em dois, disformes, etc.).
- **Disceratose:** A queratinização está alterada (hiperceratose ou paraceratose). Essas alterações nas células são observadas, externamente, como uma elevação da pele ou mucosa, ou seja, são as verrugas características da infecção pelo vírus.

Sintomas

Geralmente a infecção pelo HPV não apresenta sintomas. Muitas vezes, o único sinal indicativo da infecção é a presença de verrugas, pápulas ou manchas, em algum lugar da pele

e mucosa. O risco e a sintomatologia da infecção pelo HPV são distintos entre os gêneros. Os homens são geralmente assintomáticos, e as mulheres podem desenvolver inflamações no trato reprodutivo (CASTRO-VÁSQUEZ; ARELLANO-GÁLVEZ, 2010).

Ainda que a maioria das infecções siga um curso benigno e se resolva espontaneamente, a infecção persistente, por certos sorotipos de HPV, está associada com o desenvolvimento de cânceres (PIQUÉ; JOSÉ, 2008). Dentre estes, incluem-se os de cérvix, vagina, vulva, pênis, cavidade oral, pescoço, cabeça e região anal.

Os homens podem apresentar verrugas genitais assintomáticas, daí o fato de muitos homens conviverem com as verrugas por anos sem procurar um tipo de tratamento. O que encontramos com frequência é a associação da infecção pelo HPV em pacientes com fimose e balanopostite. Antes de fazer uma peniscopia essa infecção deve ser tratada. Já as mulheres podem apresentar além das verrugas, infecções associadas que se expressam como corrimentos vaginais, vulvovaginites e colpites (inflamação do colo uterino) (CARVALHO et al., 2007).

A maior prevalência de HPV é observada em mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 25 anos. O HPV genital é encontrado em aproximadamente 10-40% dessas mulheres. A maioria dessas infecções parece ser auto-limitada e não está associada com alterações citológicas detectáveis pela triagem do Papanicolaou. Uma minoria de mulheres que apresentam diagnóstico positivo para HPV desenvolvem alterações citológicas de baixo grau (SCHIFFMAN, 1992; DE VILLIERS et al., 1992).

A maior incidência de lesões de alto grau ocorre em mulheres com mais de 25 anos de idade (SCHIFFMAN, 1992). Esses achados sugerem que HPV de alto risco, normalmente produz uma infecção inaparente transitória na área cérvico-vaginal. Algumas mulheres desenvolvem uma infecção persistente nesse tecido, talvez como resultado de um mecanismo de defesa deficiente. Lesões persistentes podem progredir para câncer cervical nessas mulheres (LIMBERGER et al., 2012).

Caso a verruga se localize na uretra, podemos ter hematúria e disúria; na boca podemos ter sangramento oral e a percepção da lesão pela língua; nos olhos, podem apresentar incômodo ao piscar e dependendo da localização, alterações visuais (CARVALHO et al., 2007).

Como já dito anteriormente, há diversos subtipos de HPV, e cada um tem preferência por determinada área do corpo (PIQUÉ; JOSÉ, 2008):

- Os subtipos 1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65 e 75 a 78 costumam causar as verrugas comuns de pele.
- Os subtipos 3, 10, 27, 28, 38, 41 e 49 também provocam verrugas na pele, mas são geralmente as chamadas verrugas planas.
- Os subtipos 1, 2, 4, 60, 63 provocam as verrugas nas plantas dos pés.
- Os subtipos subtipos 1 a 6, 10, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39 a 45, 51 a 59, 70 e 83 podem provocar verrugas genitais ou anais (condiloma acuminado). Obs: 90% das verrugas genitais são provocadas pelos subtipos 6 e 11.

Os HPV-16 e HPV-18, que são os mais relacionados ao câncer do colo do útero, não costumam provocar sintoma algum. O diagnóstico da infecção ocorre geralmente através do exame citológico de *papanicolaou* e a colposcopia com biópsia (MUÑOZ et al., 2003).

Diagnóstico

Quanto à apresentação da infecção, esta pode manifestar-se na forma *latente*, cujo diagnóstico é realizado unicamente por métodos de biologia molecular; *subclínica*, onde não são visualizados sintomas clínicos, mas há alterações sutis, tais como coilocitose, disqueratose e multinucleação; detectados por peniscopia, colpocitologia, colposcopia e/ou biópsia; ou *clínica*, na qual há lesões clínicas evidentes chamadas condilomas ou papilomas (XAVIER *et al.*, 2007).

Nos casos das verrugas de pele ou genitais, o diagnóstico do HPV é clínico, através de um simples exame físico com detecção da presença da verruga, não são necessários outros testes. No caso específico das verrugas genitais, apesar do diagnóstico do HPV ser óbvio, é importante que o(a) paciente seja testado(a) para outras DSTs, pois é muito comum que uma pessoa tenha mais de uma DST ao mesmo tempo (PINHEIRO, 2016).

Já o diagnóstico do HPV nas mulheres com o colo do útero infectado é mais complexo. Não há sintomas e nem sempre os achados no exame *Papanicolaou* são característicos de infecção pelo HPV. Para pesquisar a presença do vírus, o ginecologista precisa colher durante o exame ginecológico uma pequena amostra de material do colo do útero e do interior da vagina. Esse material é enviado para o laboratório para que se possa procurar a presença do HPV. Se houver HPV presente, o laboratório é capaz de informar qual é o subtipo do vírus responsável pela infecção (PINHEIRO, 2016).

Recomenda-se a realização de colpocitologia a mulheres sexualmente ativas ou com idade igual ou superior a 25 anos, com repetição em um ano caso o resultado seja normal, e a seguir trienal. O exame colpocitológico, para ter maior ação preventiva, deve ser realizado, também,

na presença de fatores de risco como início precoce da atividade sexual e história de múltiplos parceiros, ou bianual quando não há fatores de risco (DERCHAIN et al., 2005; NOVAES, 2006).

As adolescentes e mulheres mais jovens não estão inclusas nos programas de rastreamento, porque nelas há predominância de lesões de baixo grau com elevada taxa de regressão. Dessa forma, devem-se realizar práticas educativas e assistenciais que possam atuar sobre a realidade cultural das adolescentes e suas famílias, já que aquelas estão iniciando, cada vez mais cedo, sua vida sexual (ORÍÁ e ALVES, 2004).

Na adolescência, o colo normal, na maioria das vezes, apresenta uma ectopia com zona de transformação imatura. Na menacme, 20% das mulheres apresentarão o que chamamos de colo padrão, isto é, presença de epitélio escamoso original e colunar, com a junção escamo colunar no orifício externo. É comum a presença de ectopia com zona de transformação imatura ou madura, principalmente nas usuárias de contraceptivos hormonais (PANISSET e FONSECA, 2009).

Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países do mundo a introduzir o exame *Papanicolaou*, na década de 1940, para a detecção precoce do câncer de colo do útero, a doença continua a ser um grave problema de saúde pública, principalmente em regiões menos privilegiadas como a região norte, onde a iniciação sexual é cada vez mais precoce. Isto porque apenas 30% das mulheres submetem-se ao exame citopatológico pelo menos três vezes na vida, o que resulta em diagnósticos já em fase avançada em 70% dos casos (MELLO et al., 2010).

A citologia cérvico-vaginal, ou colpocitologia oncótica, é o método mais difundido mundialmente para rastreamento da neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Essa técnica de detecção, conhecida popularmente como *Papanicolaou*, ou simplesmente exame preventivo ou de prevenção, vem sendo utilizada em alguns países, com sucesso, por mais de 30 anos e resultou em importante redução dos índices de mortalidade por câncer cervical, ao redor de 50% a 70%. Entretanto, as taxas de mortalidade por câncer cervical permaneceram estáveis e até aumentaram em países com poucos recursos para implantação de programas de rastreamento organizados (RAMA, et al., 2006; PRIMO, et al., 2007).

Quanto mais precoce for o diagnóstico e a intervenção, maior a chance de sobrevivência da mulher, tornando o tratamento mais simples, menos agressivo e de menor custo (PAULA, 2006).

Os métodos diagnósticos das lesões induzidas por HPV são morfológicos e incluem o exame clínico, a colposcopia, a citologia oncológica e a histologia. Já a identificação da

infecção por HPV propriamente dita inclui os métodos biológicos, como as hibridizações moleculares de ácidos nucleicos, tipo Southern Blot, captura de híbridos, hibridização in situ e reação em cadeia de polimerase (PCR) (RAMA, et al, 2008).

- No ano de 2004 as lesões relacionadas ao HPV foram assim divididas pelo Ministério da Saúde (MS):
- Lesões de baixo grau, lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão escamosa intraepitelial (SIL), neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I), infecção pelo HPV e displasia leve;
- Lesões de alto grau, lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL), lesão escamosa intraepitelial II (SIL II), neoplasia intraepitelial cervical grau II (NIC II), ou displasia moderada;
- Carcinoma in situ, neoplasia intraepitelial grau III (NIC III), ou displasia acentuada.

Há ainda outros diagnósticos:

- Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS);
- Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS): em que se percebem anormalidades, mas não são suficientes para a conclusão de que realmente existe doença (OLIVEIRA, et al., 2007).

Muitas vezes, somente a avaliação clínica não é suficiente, porque não detecta as lesões subclínicas, que são identificadas somente com o uso de um instrumento óptico de magnificação. O estágio subclínico é considerado o principal responsável pela transmissão sexual da infecção pelo HPV, como também, é capaz de tornar o homem um reservatório e agente perpetuador da infecção (HATCH; 1999).

Prevenção

Um dos métodos mais simples de prevenção é o uso do preservativo. No entanto, não pode ser considerada uma medida 100% eficaz contra a transmissão do HPV, porque o vírus pode estar presente em áreas da genitália que não ficam cobertas pelo preservativo (PINHEIRO, 2016).

Percebe-se que a realização do exame citopatológico é uma das principais estratégias da equipe de saúde para o controle do câncer do colo uterino. Segundo publicação do Ministério da Saúde, a principal estratégia utilizada no Brasil para detecção precoce/rastreamento do câncer do colo do útero é a realização da coleta de material para

exames citopatológicos cervico-vaginal e microflora, conhecido popularmente como exame preventivo do colo do útero (BRASIL, 2016).

As vacinas contra HPV são muito eficazes, com taxas de sucesso acima de 95%, principalmente quando administradas em meninas jovens, que ainda não começaram a sua vida sexual e, portanto, nunca tiveram contato com o vírus HPV (PINHEIRO, 2016).

Vacina

Estudos epidemiológicos internacionais têm mostrado que o HPV 16 é o responsável pela maioria dos cânceres do colo do útero, seguido pelo HPV 18. Juntos, perfazem cerca de 70% dos casos. Os HPVs 6 e 11 são responsáveis por 90% das verrugas genitais (condilomas acuminados) (MUÑOZ et al., 2004).

Existem duas vacinas disponíveis contra o HPV: Gardasil (*guardian of squamous intraepithelial lesion*) também conhecida por Silgard, desenvolvida por Merck Sharp & Dohme (New Jersey, Estados Unidos) e Cervarix (cervical + Rixensart) desenvolvida por GlaxoSmithKline (Rixensart, Bélgica). Ambas as vacinas são produzidas através de engenharia genética, utilizando a tecnologia do DNA recombinante (vírus cujo genoma deriva-se da combinação dos genomas de duas ou mais cepas virais diferentes), e constituídas de “pseudopartículas virais”, ou *virus-like particles* (VLPs) (SIMÕES, 2010).

Ambas as vacinas são destinadas contra o HPV 16 e 18, associados com 70% dos casos de câncer cervical e 40% dos carcinomas da vulva. Porém, a quadrivalente também é dirigida contra os HPVs 6 e 11, relacionados com 90% das verrugas anogenitais (USHER et al., 2008).

No Brasil, desde o início de 2014, o Ministério da Saúde tem disponibilizado no SUS a vacina quádrupla para meninas entre 9 e 13 anos de idade (BRASIL, 2004). A vacina contra o HPV foi desenvolvida com o objetivo de reduzir os casos de câncer do colo de útero nas mulheres. Porém, por ser uma causa importante de câncer peniano e anal, correspondendo a cerca de 40% dos casos, a vacinação contra o HPV também pode ser feita em homens (CARVALHO et al., 2007).

A meta dessas vacinas é prevenir a infecção primária ou persistente do HPV e prevenir as lesões pré-invasivas e o câncer cervical, através da indução de uma resposta de anticorpos neutralizantes contra epítomos (um local específico de um antígeno onde os anticorpos se ligam) conformacionais das proteínas da cápside (L1) dos HPVs (LOWY et al., 2006).

Um mês após a terceira dose da vacina de HPV, aproximadamente 100% das mulheres com idade entre 15 e 26 anos têm anticorpos detectáveis para cada genótipo HPV, com os

níveis sendo de 10 a 104 vezes maior do que nas infecções naturais (HARPER et al., 2004; HARPER et al., 2006; VILLA et al., 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a vacina quadrivalente para uso em meninas e mulheres com 9 a 26 anos e a bivalente para administração a meninas e mulheres na faixa etária de 9 a 25 anos (PANISSET e FONSECA, 2009). Em casos selecionados, quando o médico entender que a vacinação trará reais benefícios para o paciente, a vacina pode ser indicada também para pessoas acima dos 26 anos.

Do ponto de vista de saúde pública, entretanto, a vacinação em massa da população é feita de forma diferente. No Brasil, o calendário vacinal só indica a vacinação em meninas entre 9 e 13 anos de idade, visto que é muito mais eficaz se tomada por pessoas que nunca foram expostas ao HPV. Isso não significa que homens ou mulheres até 26 anos não possam recorrer ao sistema privado de saúde para se vacinarem (PINHEIRO, 2016).

Já ter sido contaminado previamente com um subtipo de HPV não contraindica a realização da vacinação. Atualmente, por falta de estudos que comprovem sua segurança para o feto, a vacinação contra o HPV não está indicada para as gestantes. Por outro lado, durante o aleitamento materno não há contraindicações. Como a vacina é feita com vírus inativo, ela pode ser administrada em pessoas com HIV ou qualquer outra causa de imunossupressão (PINHEIRO, 2016).

A duração da imunidade após a vacinação e a titulação mínima de anticorpos protetores para evitar a doença ainda não estão claras (MARKOWITZ et al., 2007). Após a terceira dose, os títulos de anticorpos caem por dois anos até atingir um platô, apesar de a quantidade de anticorpos produzidos por estímulo vacinal ser maior do que por infecção natural. Estudos só confirmaram proteção por cinco anos. Um seguimento de 15 anos nos sujeitos vacinados na Europa irá prover informações essenciais sobre a durabilidade da proteção (BORSATTO et al., 2011).

Quando administrada ainda na infância, antes do início da vida sexual, a vacinação tem uma eficácia de quase 100% na prevenção de tumores malignos do colo do útero provocados pelos subtipos 16 e 18. Quando administrada em mulheres mais velhas, já com vida sexual ativa e, portanto, com maior risco de já terem sido previamente expostas ao HPV, a eficácia cai para 44%. Nos homens nunca expostos ao HPV, a eficácia da vacina é um pouco mais baixa que nas mulheres, mas, ainda assim, atinge os 90% (PINHEIRO, 2016).

Ao contrário do que ocorre em várias doenças infecciosas, ainda não existem sorologias pós-vacinação para o HPV, ou seja, exames de sangue que sirvam para medir a concentração sanguínea de anticorpos contra o papiloma vírus humano após a vacina. Entre os grandes estudos científicos que comprovam a eficácia da vacina contra o HPV, podemos destacar 3 deles (PINHEIRO, 2016):

- **The FUTURE I trial** – No qual a vacina quadrivalente foi 100% efetiva na prevenção de verrugas anogenitais, neoplasias vulvar e vaginal, NIC1, NIC 2, NIC 3 e adenocarcinoma *in situ*.
- **The FUTURE II trial** – No qual a vacina quadrivalente apresentou 98% de eficácia na prevenção de casos de NIC 2, NIC 3, adenocarcinoma *in situ* ou câncer de colo de útero.
- **PATRICIA (Papilloma trial against cancer in young adults)** – No qual a vacina bivalente apresentou eficácia de 93% na prevenção de casos de NIC 2, NIC 3, adenocarcinoma *in situ* ou câncer de colo de útero.

No que diz respeito ao preparo e à administração, a vacina quadrivalente é preparada de maneira estéril para injeção intramuscular de 0,5 ml no seguinte esquema: mês 0; 2; 6. Esse é o esquema vacinal padrão, porém já estão definidos os intervalos mínimos. Entre a primeira e segunda dose, o intervalo mínimo é de um mês; entre a segunda e terceira, três meses. Em caso de administração de dose menor do que a recomendada, a dose correta deve ser readministrada (MARKOWITZ *et al.*, 2007).

Caso a vacinação seja interrompida, o esquema não deve ser reiniciado. Se a série for interrompida após a primeira dose, a segunda deve ser administrada assim que possível e o intervalo entre a segunda e terceira doses pode ser reduzido para três meses. Se apenas a terceira dose estiver atrasada, deve ser administrada assim que possível (MARKOWITZ *et al.*, 2007).

A vacina quadrivalente tem sido amplamente licenciada em vários países pelo risco-benefício assumido. Em ensaio clínico fase III, Gardasil® foi avaliada em grupo de 5.455 mulheres, com 16 a 24 anos, sem histórico de lesões clínicas e citologia normal. Nesse ensaio, foram apontadas taxas de eficácia de 100% frente aos quatro subtipos de HPV, 100% na prevenção de NIC e adenocarcinoma *in situ* (AIS), 95% para lesões anogenitais, 98% para todos os graus de lesões cervicais, 91% para lesões vulvar ou vaginal de alto grau e 100% para AIS (GARLAND *et al.*, 2007).

A vacina bivalente, em ensaio com 1.113 mulheres (15- 25 anos), também mostrou ser segura, bem tolerada e altamente imunogênica. A eficácia foi de 91,6% durante infecção incidente e 100% na infecção persistente, com diagnóstico confirmado de HPV 16 e 18 (HARPER *et al.*, 2004).

Apesar da vacina contra o HPV ser considerada bastante segura, é importante lembrar que ela pode causar efeitos colaterais leves, como dor no local na injeção, dores de cabeça, tonturas e náuseas. Como a vacina será administrada em milhões de pessoas, é natural que nos próximos meses e anos sejam reportados vários casos de efeitos colaterais leves. Isso, porém, não significa que a

vacina seja perigosa e não deva ser tomada. Várias outras vacinas presentes no calendário vacinal há décadas também apresentam efeitos colaterais leves frequentes (PINHEIRO, 2016).

Os eventos adversos decorrentes da vacinação podem ser classificados em locais ou sistêmicos. Na maioria dos indivíduos, houve uma boa tolerância e os efeitos adversos mais relatados foram os locais (LEPIQUE et al., 2009). Esses eventos foram 6% a 8% mais frequentes do que os produzidos pelo placebo (DAWAR et al., 2007), e a maioria deles (94%) foi de intensidade leve ou moderada. Os mais comuns foram: reação no local de aplicação com dor, edema e eritema (TEJEDA et al., 2007).

Em relação aos efeitos sistêmicos, não houve diferença na frequência entre os que receberam a vacina ou o placebo (DAWAR et al., 2007). Os mais observados foram febre, náusea, diarreia, vômito, tontura, mialgia, dor de dente, infecção de trato respiratório, indisposição, artralgia, insônia e congestão nasal, todos de intensidade leve ou moderada (MCLEMORE, 2006). Óbitos, Síndrome de Guillain-Barré, trombose e outros sintomas graves já foram reportados, mas não se pôde estabelecer relação causal direta com a vacina (PINHEIRO, 2016).

Tratamento

Com base nos levantamentos epidemiológicos realizados em todo o mundo, admite-se a importância de esclarecer quanto aos aspectos clínicos e subclínicos da infecção pelo HPV, bem como sugerir tratamentos capazes de eliminar ou amenizar as lesões, uma vez que não existe uma terapêutica comprovadamente capaz de eliminar o HPV nem um protocolo clínico estabelecido para cada grau da infecção. Nesse caso, a escolha do tratamento tem como base principal o grau de agressividade da lesão, os custos e recursos envolvidos e os efeitos adversos (FIGUEIRÊDO et al., 2013).

A abordagem terapêutica atual consiste basicamente em eliminar as lesões clínicas utilizando agentes químicos, físicos e imunomoduladores. Ainda assim, mesmo diante das alternativas disponibilizadas, não existe até o momento uma padronização terapêutica, sendo distintas as abordagens realizadas clinicamente (SQUIQUERA, 2006).

O tratamento do HPV tem como objetivo inicial eliminar os sintomas, amenizar a carga psicológica decorrente do estigma social e melhorar o aspecto estético do paciente, principalmente no que se refere aos condilomas. Além disso, tenta-se com a eliminação das lesões diminuir a transmissibilidade da infecção, que parece ser mais significativa na presença das verrugas. Entretanto não há, até o momento, uma terapêutica comprovadamente capaz de erradicar o HPV, nem um tratamento ideal para todos os pacientes. Desta forma, a

individualização do tratamento, feito ora de maneira conservadora, ora invasiva ou até mesmo combinada, parece ser a conduta mais adequada (CARVALHO *et al.*, 2010).

Entre os fatores que podem influenciar a escolha do tratamento estão o tamanho, o número, a morfologia e o local da lesão; além da preferência do paciente, custos, disponibilidade de recursos, conveniência, efeitos adversos e experiência do profissional de saúde. Estão disponíveis para a terapêutica contra o HPV os tratamentos químicos, físicos e imunomoduladores (BRASIL, 2016).

De modo geral, os tratamentos conservadores são indicados para indivíduos com lesões de menor extensão. Neste sentido, a aplicação de agentes químicos constitui uma abordagem terapêutica citodestrutiva, estando disponíveis opções como podofilina, podofilotoxina, ácidos bi e tricloroacéticos, 5-fluorouracil (5-FU), imiquimode e cidofovir (CARVALHO *et al.*, 2010; BRASIL, 2016).

Os métodos físicos utilizam técnicas abrasivas e excisionais importantes, tais como eletrocauterização, conização, laser e crioterapia (WOLSCHICK *et al.*, 2007). Frequentemente estes procedimentos são dolorosos, podem resultar em cicatrizes e requerem o uso de anestesia. Além disso, a recorrência do quadro ocorre com frequência (BRANDT *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao tratamento utilizando agentes imunomoduladores, observa-se o corrente uso do Imiquimode, o qual se trata de um agente imunomodulador sintético pertencente à classe das aminoquinolinas com atividade antitumoral e antiviral. O medicamento foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento do condiloma anogenital em 1997. No Brasil, seu uso foi liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para maiores de 12 anos (MANZIONE *et al.*, 2010).

O imiquimode não destrói as lesões, mas induz a secreção local de citocinas, que contribuem para a eliminação das lesões. Ao mesmo tempo, mantendo a imunidade favorável, as taxas de recorrência com este medicamento são menores do que com a podofilotoxina (BALAGUERA *et al.*, 2006). Deve ser administrado por via tópica uma vez ao dia, três vezes por semana, em noites alternadas, durante oito a dezesseis semanas (MANZIONE *et al.*, 2010). Após 6 a 10 horas da aplicação, o creme de imiquimode a 5% deve ser lavado com água e sabão neutro. Com este seguimento, o medicamento provou ser bem tolerado, seguro e eficaz (GOTOVTSEVA *et al.*, 2008; DIAMANTIS *et al.*, 2009).

Outro imunomodulador bastante utilizado é o *Interferon*. Os interferons (IFNs) são um grupo de proteínas imunoreguladoras sintetizadas por linfócitos T, macrófagos, fibroblastos e outros tipos de células, após estimulação por vírus, antígenos, mitógenos, DNA de dupla fita

ou lectinas. Eles se ligam a receptores específicos nas membranas celulares e exibem seus efeitos aumentando a capacidade dos macrófagos para destruir células tumorais, vírus e bactérias e reforçando a atividade citotóxica dos linfócitos T (LT) (YANG *et al.*, 2009).

Devido à ação imunoestimulante e antiviral, o tratamento com IFN é indicado para verrugas, sendo administrado localmente (injeções intralesionais e aplicações tópicas) ou sistemicamente (injeções subcutânea e intramuscular). Ao contrário dos tratamentos convencionais utilizando os métodos físicos ou químicos, que destroem as lesões apenas visivelmente e possibilitam a persistência do HPV no epitélio adjacente às lesões tratadas, o IFN possui capacidade de erradicar o vírus de todas as células afetadas devido ao seu efeito imunomodulador (YANG *et al.*, 2009).

O uso do IFN pode ser indicado em alguns casos, mas seu uso rotineiro não é recomendado devido aos efeitos colaterais (febre, calafrios, cefaléia, alterações de comportamento, náusea, supressão da medula óssea, neurotoxicidade) e o elevado custo, além da necessidade de frequentes visitas à clínica (SQUIQUERA, 2006; MARIANELLI & NADAL, 2011), sendo contra-indicado para pacientes em lesões de mucosas e em pacientes imunodeprimidos (BALAGUERA *et al.*, 2006).

No colo do útero, as lesões provocadas pelo HPV são classificadas em Lesões Intra-epiteliais de Baixo Grau/Neoplasia Intra-epitelial grau I (NIC I), que refletem apenas a presença do vírus, e em Lesões Intra-epiteliais de Alto Grau/Neoplasia Intra-epitelial graus II e III (NICII ou III), que são as verdadeiras lesões precursoras do câncer do colo do útero. As lesões de baixo grau não oferecem maiores riscos, tendendo a desaparecer mesmo sem tratamento na maioria das mulheres. A conduta recomendada é a repetição do exame preventivo em seis meses. O tratamento apropriado das lesões precursoras é imprescindível para a redução da incidência e mortalidade pelo câncer do colo uterino. As diretrizes brasileiras recomendam, após confirmação colposcópica ou histológica, o tratamento excisional das Lesões Intra-epiteliais de Alto Grau, por meio de exérese da zona de transformação (EZT) por eletrocirurgia. Só o médico, após a avaliação de cada caso, pode recomendar a conduta mais adequada (INCA, 2016).

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, M. C. C et al. Uso de contracepção por adolescentes de escolas públicas na Bahia. **Rev Saúde Pública**.2003;37(5):566-75.
- AZEVEDO, M. R. D. Educação sexual: uma questão em aberto. In: Saito MI, Leal MM, Silva LEV, editores. Adolescência: prevenção e risco. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 129-43.
- BALAGUERA CJ, GARCÍA-ALMENTA MM, TORRES ODS, SEGOVIA CJ, GAMARRA PL, MAESTRO GP, ISABEL FP, CIUDAD VS, SÁNCHEZ AP, HERNÁNDEZ CMC. Condiloma acuminado gigante inguinal y perineal: cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento. *Mapfre med*. 17(2): 144-150, 2006.
- BASEMAN JG, KOUTSKY LA. The epidemiology of Human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S16-S24.
- BORSATTO, A.Z.; VIDA, M.L.B.; ROCHA, R.C.N.P. Vacina contra o HPV e a Prevenção do Câncer do Colo do Útero: subsídios para a prática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 67-74, 2011.
- BRANDT HR, FERNANDES JD, PATRIOTA RC, CRIADO PR, BELDA-JUNIOR W. Treatment of *human papillomavirus* in childhood with imiquimod 5% cream. *An Bras Dermatol*. 85(4): 549-553, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e hepatites virais. Disponível em: <http://aids.gov.br>>. Acesso em junho de 2016.
- BRITO EB, MARTINS SJ, MENEZES RC. Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. *Epidemiol Infect* 2002 Jun; 128(3): 485-9.
- BURK, R.D.; KELLY, P.; FELDMAN, J.; BROMBERG, J.; VERMUND, S.H.; DEHOVITZ, J.A. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus
- CARVALHO, J. J. M. ; CARVALHO, J. Z. M. ; ROSA, N. T. ; CARVALHO, L. Z. M.; SYRJÄNEN, K. J. . Identification of males at increased risk for genital human papillomavirus (HPV) infection among patients referred for urological consultation. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 39, p. 1029-1037, 2007.
- CARVALHO, J.J.L;OYAKAWA,N.I. Consenso Brasileiro de HPV, 2000, 1ª edição, São Paulo, BG Cultural, 2000.
- CASTELLSAGUE X, BOSCH FX, MUNOZ N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89(2): 191-199
- CASTRO-VÁSQUEZ, M. C.; ARELLANO-GÁLVEZ, M. C. Acceso a La información de mujeres con VPH, displasia y câncer cervical in situ. *Salud Pública de México*, Cuernavaca, v. 52, p. 207-212, 2010.

CAVALCANTI, S. M. B.; ZARDO, L. G.; PASSOS, M. R. L.; OLIVEIRA, L. H. S.. Epidemiological aspects of Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *Journal of Infection*, 2000; 40: 80-87.

COIMBRA Jr CEA, GARNELO L. Questões de saúde reprodutiva da mulher indígena no Brasil. Porto Velho, RO: Centro de Estudos de Saude do Indio de Rondonia; 2003 [cited 2013 jul 13]. Available from: <http://www.cesir.unir.br/pdfs/doc7.pdf>.

CONFORTINI, M.; CAROZZI, F.; ZAPPA, M., VENTURA, L., LOSSA, A., CARIAGGI, P., BRANDIGI, L., FRANCHINI, M., MIRRI, F., SCARFANTONI, A., BAZZANTI, D., SANI, C.. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort os Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BioMed Central Infec.Diseases*, v.10, p.1-11, 2010.

CREWS DE, KAMBOH MI, MANCILHA-CARVALHO JJ, KOTTKE B. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Hum Biol* 1993 Apr; 65(2): 211-24.

DANGOUR AD. Cross-sectional changes in anthropometric variables among Wapishana and Patamona Amerindian adults. *Hum Biol* 2003 Apr;75(2):227-40.

DAWAR M, DEEKS S, DOBSON S. Human papillomavirus vaccines launch a new era in cervical cancer prevention. *CMAJ* 2007; 177(5): 456-61.

DE VILLIERS EM. Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. *Genitourin Med.* 1992 Feb;68(1):50-4

DERCHAIN, S.F.M., FILHO, A.L., SYRJÄNEN, K. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.27, p. 425- 33, 2005.

DIAMANTIS ML, BARTLETT BL, TYRING SK. Safety, efficacy & recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts. *Skin Therapy Letter.* 14(5): 1-3, 2009. FEDRIZZI, E.N.. Epidemiologia da Infecção genital pelo HPV. *Rev Bras Pat Trato Gen Inf* 2011;1(1):3-8.

FELLER LL, KHAMMISSA RAG, WOOD NH, LEMMER J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer.* 2009;25(4):16.

FIGUEIRÊDO et al. Abordagem terapêutica para o Papilomavírus humano (HPV). *Rev. Bras. Farm.* 94(1): 4-17, 2013.

FONSECA AJ, AMORIM LDC, MURARI RSW, ARCOVERDE LC, FERREIRA LCL. Prevalência de Alterações Citológicas Cervicai

FONSECA AJ, FERREIRA LP, DALLA-BENETTA AC, ROLDAN CN, FERREIRA ML. Epidemiologia e impacto econômico do cancer de colo de utero no Estado de Roraima: a perspectiva do SUS. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2010 Aug;32(8):386-92.

GILLISON ML, CHATURVEDI AK, LOWY DR. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 2008; 113 (10 Suppl):3036-46.

GIULIANO, A.R.; PAPENFUSS, M.; ABRAHAMSEN, M.; DENMAN, C.; ZAPIEN, GOTOVTSEVA EP, KAPADIA AS, SMOLENSKY MH, LAIRSON DR. Optimal frequency of imiquimod (aldara) 5% cream for the treatment of external genital warts in

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M.; MOSCICKI, A. B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C. M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; COSTA CLEMENS, S. A.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *The Lancet*, London, v. 367, p. 1247-1255, 2006.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C.; FERRIS, D. G.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; ZAHAF, T.; INNIS, B.; NAUD, P.; DE CARVALHO, N. S.; ROTELI-MARTINS, C. M.; TEIXEIRA, J.; BLATTER, M. M.; KORN, A. P.; QUINT, W.; DUBIN, G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. *The Lancet*, London, v. 364, p. 1757-1765, 2004.

HARWOOD CA, SURENTERAN T, MCGREGOR JM, SPINK PJ, LEIGHT IM, BREUER J, et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol*. 2000;61:289-97.

HASS, P; BRAGAGNOLO, A. T; ELI,D. Papiloma Vírus Humano (HPV). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Santa Catarina, v. 42, n. 2, p. 91-96, 2010.

HATCH, K. D., HACKER, N. F. Doença intra – epitelial do colo, vagina e vulva. In: BEREK, J. S. **Novak tratado de ginecologia**. 12.Ed . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

HAYD RLN, OLIVARES AIO, FERREIRA MLS, LUITGARDS-MOURA JF. Um olhar sobre a saúde indígena no estado de Roraima. *Mens Agitat* 2008; 3(1):10.

HENGGE UR. Papillomavirus diseases. *Hautarzt*. 2004;55:841-51.

HO GY, BURK RD, FLEMING I. KLEIN RS. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 1994;56:788—92.

immunocompetent adults: a meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 35: 346-351, 2008.

infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*, v.23, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA [Internet]. Estimativa 2014: incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014. [citado 2014].Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>

ISOLAN, B.I.; CARVALHO, A.V.V., ALMEIDA FILHO, G. L., PASSOS, M.R.L.; BRAVO, R.S.;PINHEIRO, V.M.S. Perfil do atendimento ao adolescente no setor de doenças

sexualmente transmissíveis da Universidade Federal Fluminense J. Bras Doenças Sex Transm, v.13, p.9 -30, 2001.

J.G.; HENZE, J.L. et al. Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., v. 10, p1129- 36, 2001.

JABLONSKA S, MAJEWSKI S, OBALEK S, ORTH, G. Cutaneous wart. Clin Dermatol. 1997;15:309-19.

KJAER, S.K.; SVARE, E.I.; WORM, A.M.; WALBOOMERS, J.M.; MEIJER, C.J.; VAN DEN BRULE, A.J. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers: decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. Sex Transm. Dis., v. 27, p.438-45, 2000.

LEPIQUE AP, RABACHINI T, VILLA LL. HPV vaccination: the begining of the end of cervical câncer? A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(1):1-10.

LETO, M. G. P. et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LIMBERGER, A. et. al. Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 33, n. 1, p. 111-122, jan./jun. 2012.

LOWY DR, SCHILLER JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Clin Invest. 2006;116(5):1167-73.

MANZIONE CR, FORMIGA FB, NADAL SR. Uso de imiquimode tópico no tratamento da infecção anal pelo *papilomavírus humano*. *Rev Bras Coloproct.* 30(1): 92-94, 2010.

MARIANELLI R & NADAL SR. Infecções anais pelo *papilomavírus humano*, crioterapia e crioimunologia. *Ver Bras Coloproct.* 31(1): 94-97, 2011.

MARKOWITZ LE, DUNNE EF, SARAIYA M, LAWSON HW, CHESSON H, UNGER ER. Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2007; 56 (RR-2): 1-24.

MCCANCE DJ. Human papillomaviruses. *Infect Dis Clin North Am.* 1994;8(4):751–764.

MELLO, E. J. C. J., SILVA, D. F., BRITO, L. M.O., LOBÃO, W. J. M; SOUSA , M. D. G.; NASCIMENTO, M.D. S. B. Epidemiologia do Papilomavírus Humano (HPV) em Adolescentes - Revisão Bibliográfica NewsLab. Ed. 101, 2010.

MENDES ECS. Colposcopic, cytological and anatomopathological aspects of indigenous women from state of Para. *Revista paraense de medicina* 2004;18(1): 11-8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Programa nacional de controle do câncer do colo uterino. Brasília (DF): Centro de Documentação; 2004. Disponível em World Web www.inca.org.br/programas.

MUÑOZ N, BOSCH FX, CASTELLSAGUÉ X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004;111(2):278-85.

MUÑOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSE S, HERRERO R, CASTELLAGUÉ X, SHAH KV, et al. Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical carcinoma. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.

MUÑOZ N, CASTELLSAGUÉ X, BERRINGTON GA, GISSMANN L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24(S3):1-10.

MURTA, E. F. C., SOUZA, M. A.H., ADAD, S.J.; ARAÚJO JÚNIOR, E. Papilomavírus Humano em Adolescentes: Relação com o Método Anticoncepcional, Gravidez, Fumo e Achados Citológicos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 23, p.217- 221, 2001.

NEEL JV, TANIS RJ, MIGLIAZZA EC, SPIELMAN RS, SALZANO F, OLIVER WJ. Genetic studies of the Macushi and Wapishana Indians. I. Rare genetic variants and a "private polymorphism" of esterase A. *Hum Genet* 1977 Apr 7; 36(1):81-107.

NOVAES, J.M.D.C. Importância da Colpocitologia na Adolescência. *Adolescência & Saúde*, v. 3, n.1, p.18-21, 2006.

OLIVEIRA, F.A., PFLEGER, V., LANG, K., HEUKELBACH, J., MIRALLES, I., FRAGA F. et al. Infecções sexualmente transmissíveis, vaginose bacteriana e candidíase em mulheres em idade reprodutiva no nordeste do Brasil rural: um estudo de base populacional. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n.6, p. 751-756, 2007.

ORIÁ, M.O.B., ALVES, M.D.S. Adolescente com Papilomavírus Humano no Contexto Familiar. *Revista de Enfermagem – UERJ*, v. 12, p. 44-48, 2004.

PALEFSKY, J. Screening for Anal and Cervical Dysplasia in HIV-Infected Patients. *The PRN notebook*, v.6, p.24-31, 2001.

PANISSET, K.S.P., FONSECA, V.L.M. Patologia cervical na gestante adolescente. *Adolescência & Saúde*, v.6, n.4, 2009.

PASSOS, E.P.; FOCCHI, J.; CUNHA FILHO, J.S.L.; BARCELLOS, S.; GOLDIM, J.R.; VASSERMAN, J. Incidência De Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae Em Mulheres Assintomáticas Promíscuas e Não Promíscuas. *Jornal Brasileiro de Ginecologia*, Rio de Janeiro, v. 104, p. 7-9, 1994.

PAULA, A.F. 2006 Câncer cérvico-uterino: ameaça (in)evitável? *Rev. Enferm. UERJ*. Rio de Janeiro, v.14, p.123-9, 2006.

PENNA, I. A.; DUARTE, G.; FERRIANI, R. A.; MACHADO, A. A.; ROMÃO, G. S.; REIS, R. M.; MOURA, M. D. Frequência de infecção pelo Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum em mulheres inférteis e relação com repercussões clínicas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 64-68, 2005.

PINHEIRO P. O que é HPV – sintomas, transmissão e tratamento. 2016, em <http://www.mdsaude.com/2015/04/hpv.html> (acessado em 25/06/2016).

PIQUÉ, X. C.; JOSÉ, F. X. Vacunas frente al virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Barcelona, v. 26, n. 1, p. 65-77, 2008.

PRIMO, F. L.; MACAROFF, P. P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate form cancer treatment, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 310, p. 2838-2840, Mar. 2007.

RAMA, C.H.; ROTELI-MARTINS, C.M.; DERCHAIN, S.F.M. OLIVEIRA, E.Z.; MARIANI NETO, C.; ALDRIGHI, J.M. et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev. Saúde Pública*, v. 42, p.123-30, 2006.

s em Indígenas do Extremo Norte da Amazônia Brasileira (Artigo Original: Citologia Cervical em Indígenas da Amazônia) *Revista Brasileira de Cancerologia* 2014; 60(2): 101-108

SANJOSE, S.; ALMIRALL, R.; LLOVERAS, B.; FONT, R.; DIAZ, M.; MUÑOZ, N. et al. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm. Dis.* v. 30, p.788-93, 2003.

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; ASTOLFI-FILHO, S. Detection of *C. trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*, v. 7, n. 2, p. 91-95, 2003.

SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, Carry, v. 84, p. 394-398, 1992.

SCHIFFMAN, Mark. Castle, PHILIP E. Human Papillomavirus: Epidemiology and Public Health. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: August 2003, Vol. 127, No. 8, pp. 930-934. 2003.

SIMÕES, C. B. Vacinas contra o HPV: Uma visão crítica. 2010. Disponível em:<<http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2010/v15n2/a92-95.pdf>>. Acesso em 13 nov. 2010.

SMITH J, LINDSAY L, HOOTS B et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-632.

SPECK NMG, PEREIRA ER, SCHAPER M, RODRIGUES D, ALMEIDA P, SAKANO CR, et al. Cytopathological screening in indigenous women from Parque Indígena do Xingu. *Eur J Gynaecol Oncol* 2009;30(5): 512-3.

SQUIQUERA L. Virus de papiloma humano. Revisión e indicaciones terapéuticas. *Rev argent dermatol.* 87: 28-41, 2006.

TEJEDA MDD, VELASCO MS, GÓMEZ-PASTRANA Nieto F. Câncer de cuello uterino: estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología* 2007; 30 (2): 42-59. [citado em 2009 nov 18]. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo>.

TROTTIER H, FRANCO EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24(SI):S1-15.4.

USHER C, TILSON L, OLSEN J, JEPSEN M, WALSH C, BARRY M. Cost effectiveness of *human papillomavirus* vaccine in reducing the risk of cervical cancer in Ireland due to HPV types 16 and 18 using transmissiondynamic model. *Vaccine*. 26(44): 5654-5661, 2008.

VILLA, L. L.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; BROWN, D. R.; FERENCZY, A.; HARPER, D. M.; KOUTSKY, L. A.; KURMAN, R. J.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; OLSSON, S. E.; RONNETT, B. M.; SKJELDESTAD, F. E.; STEINWALL, M.; STOLER, M. H.; WHEELER, C. M.; TADDEO, F. J.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; MARCHESE, R.; ESSER, M. T.; BRYAN, J.; JANSEN, K. U.; SINGS, H. L.; TAMMS, G. M.; SAAH, A. J.; BARR, E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine*, Amsterdam, v. 24, p. 5571-5583, 2006.

WARD RH, GERSHOWITZ H, LAYRISSE M, NEEL JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians XI. Gene frequencies for 10 blood groups and the ABH-Le secretor traits in the Yanomama and their neighbors; the uniqueness of the tribe. *Am J Hum Genet* 1975 Jan; 27(1): 1-30.

WHO. Health of indigenous people. Geneva 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs326/en/>.

WIDDICE, L.E., MOSCICKI, A.B. Update for papanicolaou tests, colposcopy, and human papillomavirus testing in adolescents. *J Adolesc Health*, v. 43, p. 41-51, 2008.

WOLSCHICK NM, CONSOLARO MEL, SUZUKI LE, BOAER CG. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *Rev Bras Anal Clin*. 39(2):123-129, 2007.

XAVIER SD, BUSSOLOTI-FILHO I, CARVALHO JM, FRAMIL VMS, CASTRO TMPPG. Frequency of appearance of *human papillomavirus* (HPV) in oral mucosa of men with anogenital HPV by a molecular technique. *Arq. Inter. Otorrinolaringol*. 11(1): 36-44, 2007.

YANG J, PU YG, ZENG ZM, YU ZJ, HUANG N, DENG QW. Interferon for the treatment of genital warts: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 21(9): 156-164, 2009.

APÊNDICE A – ARTIGO TRADUZIDO

ARTIGO TRADUZIDO**INFECÇÕES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO E TRIAGEM DE CÂNCER
CERVICAL EM MULHERES DAS TRIBOS YANOMAMI, MACUXI E WAPISHANA**

Allex Jardim da Fonseca^{1,2}, Daniela Taeko², Thiciane Araujo Chaves², Lucia Dayanny da Costa Amorim², Raisal Saron Wanderley Murari², Angélica Espinosa Miranda³, Zigui Chen⁴, Robert David Burk^{4,5,*}, Luiz Carlos de Lima Ferreira^{1,*}.

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Fundação de medicina tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.
2. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Brasil.
3. Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Maruípe, Vitória, Brasil.
4. Department of Pediatrics, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA.
5. Department of Microbiology & Immunology, Epidemiology & Population Health, and Obstetrics, Gynecology & Women's Health, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA.

* Co-autores Seniores

RESUMO

Objetivo: Avaliar a citologia cervical, com foco na prevalência e identificação de sorotipos do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres indígenas nativas do extremo norte da Amazônia vivendo em áreas com diferentes estilos de vida e interações com a sociedade ocidental: mulheres da tribo Yanomani, que se encontram isoladas, no interior da Amazônia, com um estilo de vida baseado em caça e colheita; e mulheres das tribos Macuxi e Wapishana que vivem nas proximidades da sociedade ocidental.

Métodos: Para selecionar um grupo representativo de cada área, foram utilizadas amostragens aleatórias por conglomerados, considerando-se cada aldeamento como representante de um dos grupos. Amostras de material da cérvix uterina foram coletadas para classificação citológica e identificação e determinação dos tipos de HPV, utilizando-se os métodos de última geração de amplificação da PCR e sequenciamento do genoma. O estudo foi aprovado pelo IRB Nacional e pelos líderes das tribos.

Resultados: 664 nativas de 13 aldeias indígenas foram registradas, com uma taxa de participação de 76%. Yanomami apresentaram maiores taxas de citologia anormal (5,1% versus 1,8%, $p=0,04$) e predominância do tipo HPV de Alto Risco (37,4% versus 2,5%, $p<0,001$). Mulheres Yanomami > 35 anos tinham risco significativamente mais elevado de apresentar HPV de Alto Risco, diferença não observada em mulheres < 35 anos dos diferentes grupos. A predominância do HPV diferiu significativamente no grupo de mulheres Yanomami geograficamente isoladas ($p<0,004$). Os tipos de HPV mais comuns foram: HPV 31 (8,7%), HPV 16 (5,9%) e HPV 18 (4,4%).

Conclusão: Mulheres de origem Yanomami isoladas tinham um maior risco de serem HPV+, com as taxas proporcionalmente mais elevadas com o aumento da idade. Os estudos do HPV em grupos isolados, com sociedades baseadas em coleta/caça, sugerem que sua persistência de longo prazo é uma característica presente desde humanos pré-históricos e que os padrões que mostram uma redução de acordo com a idade nas sociedades ocidentais parecem representar uma mudança recente. Esses estudos têm implicações na prevenção do câncer cervical e na melhor compreensão das relações vírus-hospedeiro.

Palavras chave: Indígenas, Serviços de saúde. Índios, América do Sul. Grupos étnicos. Saúde da Minoria. Neoplasia cervical intraepitelial. Vírus do Papiloma Humano.

Considerações iniciais

Estima-se que ocorram 500.000 novos casos de câncer cervical (CC) por ano no mundo. Destes, 80% ocorrem em países de renda baixa ou media, como o Brasil¹, país onde são registrados 15.900 casos por ano, correspondendo a uma incidência de 19/100.000 habitantes². Na Região Amazônica do Brasil, o CC é um sério problema para a saúde pública. Um estudo baseado na população de 2010 revelou uma taxa anual de incidência de 46/100.000 nessa região, que apresenta a maior taxa de incidência do país. Estima-se que aproximadamente 15% da população amazônica no Brasil seja de indígenas⁴. Entretanto, 23% dos casos de câncer cervical dessa região ocorrem em mulheres nativas³, o que sugere um maior risco de CC (taxa estimada de 110/100.000), representando uma das maiores taxas reportadas do mundo⁵.

Apesar da melhoria da saúde das populações indígenas constituir uma prioridade para as organizações de assistência médica, os perfis de saúde e epidemiológico das mulheres indígenas continuam desconhecidos, em parte, pela falta de pesquisa e pela precariedade dos sistemas de informação sobre a morbidade e mortalidade desses grupos⁷. Na América do Sul, alguns estudos têm avaliado a prevalência do HPV e de lesões intraepiteliais cervicais em mulheres indígenas nas florestas, enquanto muitos outros investigam grupos indígenas das regiões mais urbanizadas do continente. Em grupos da América do Sul com interações permanentes com a sociedade ocidental, foi mencionado o predomínio do HPV em mulheres sem sintomas, numa faixa de 14 a 60%⁸⁻¹⁰. Um estudo que analisou as variantes do HPV16 em mulheres da tribo Quechua (grupo étnico integrado com a sociedade ao redor) que habitam a região de fronteira entre a Argentina e o Brasil mostrou que variantes Europeias foram detectadas em 69% dos genótipos do HPV16, refletindo assim a possível influência da colonização Luso-Hispânica nos Incas e nos seus descendentes naquela região¹¹.

Atualmente, os grupos indígenas mais isolados encontram-se na Floresta Amazônica. Esses apresentam altas taxas de CC e pouco se conhece a respeito do HPV. Um estudo realizado por Ong et al.¹² investigou infecções causadas pelo HPV em mulheres de três grupos indígenas isolados, pertencentes a Amazônia Brasileira, 20 anos atrás (Tiriyo, Waiapi e Mundurukú). Foi constatada uma prevalência de 14,4% do HPV, mas foram avaliados

apenas 19 tipos de HPV genital. O sequenciamento dos genomas das amostras revelou mais de 10% de variabilidade em relação ao genótipo mais próximo, e isso sugere que, possivelmente, esses grupos apresentem tipos originais, particulares da população Amazônica nativa.

Populações diferentes, especialmente grupos indígenas isolados, podem apresentar características distintas das infecções pelo HPV, de acordo com seus antepassados, estilo de vida e comportamento sexual. Além disso, é necessário conhecimento sobre a epidemiologia do HPV para que se entenda o papel etiológico dos diferentes tipos e variantes de HPV nessas populações, a fim de se desenvolver estratégias de prevenção contra o CC. Grupos indígenas isolados (Yanomami) e grupos com uma interação permanente com a sociedade (Macuxi e Wapishana) habitam o extremo norte da Amazônia brasileira, apresentando assim uma diferença ecológica que pode ser utilizada para investigar a influência do isolamento e condições de vida pré-históricas sobre a diversidade do HPV e das doenças cervicais associadas. Até hoje, o predomínio e diversidade do HPV nesses grupos não havia sido estudado. O objetivo da presente investigação é avaliar a prevalência de lesões cervicais intraepiteliais e do HPV em grupos indígenas da região amazônica.

Metodologia

Planejamento do Estudo

Foi realizado um estudo transversal, que se baseou na seleção de amostras aleatórias de mulheres indígenas provenientes do norte da região amazônica brasileira, para coleta de amostras biológicas (swabs cervicais), entre fevereiro e julho de 2013. Esse estudo foi projetado para avaliar a prevalência de lesões cervicais intraepiteliais, utilizando citologia, e infecções por HPV, utilizando amplificação por PCR e sequenciamento do genoma de última geração (NGS) em populações previamente não vacinadas contra o HPV, comparando os dois grupos definidos a seguir.

Local e Participantes

Devido a fatores culturais, étnicos e antropomórficos, o Governo Federal do Brasil dividiu os grupos indígenas do Norte da Amazônia em duas regiões geográficas (i.e., Distritos de Saúde Indígena): Distrito Indígena do Leste (composto principalmente pelos grupos Macuxi e Wapishana), e o Distrito Indígena Yanomami (composto pelos grupos Yanomami e Yekuana) (**Figura 1**).

Com uma população estimada de 40.000 habitantes⁴, os povos indígenas do Distrito Indígena do Leste são representados principalmente pelos Macuxi e pelos Wapishana. Eles pertencem à filiação linguística *Karib* e ao grupo étnico *Pemom*. Esses grupos podem ser caracterizados por terem uma barreira étnica muito tênue com a sociedade não indígena¹³. O primeiro contato dos Macuxi com a civilização ocidental ocorreu durante a colonização portuguesa, na metade do Século 18. Atualmente, a maioria dos membros desses grupos étnicos pode ser considerado como tendo um contato recente ou permanente com sociedades não indígenas¹⁴. Normalmente eles são fluentes na língua portuguesa e aderiram parcialmente à cultura, estilo de vida e crenças da civilização ocidental. A maioria das moradias oferece privacidade e são providas de água corrente encanada.

Também localizados na porção norte da Amazônia, na fronteira entre Brasil e Venezuela, a população da tribo Yanomami chega a aproximadamente 20.000 habitantes no Brasil⁴. Eles pertencem ao grupo étnico *Yanomamō* e possuem sua própria afiliação linguística: *Yanomamam*¹⁵. Eles são uma sociedade nômade de caçadores, fazendeiros e coletores provenientes da Floresta Amazônica, e seu contato com a sociedade não indígena é algo bem recente em sua história^{16, 17}. Os Yanomami permaneceram geograficamente isolados até o início do Século 20. Os primeiros contatos com esses povos não indígenas foram registrados entre as décadas de 1910 e 1940, principalmente entre militares e antropologistas. Até hoje, as comunidades são caracterizadas por viverem em pequenos grupos isolados dentro da floresta (acessíveis apenas por vias aéreas), mantendo assim seus costumes, idioma, estrutura social e práticas, como infanticídio, atividade sexual precoce (ao debutarem) e de múltiplos parceiros¹⁸. Esse grupo vive em palhoças, com piso de terra e sem água corrente ou encanamento próprio. Geneticistas e antropólogos que estudam tal tribo concluíram que a ausência de similaridades genéticas, antropomórficas e linguísticas com os povos do Distrito Leste apoia o fato de que os Yanomami são isolados desde os tempos antigos^{15, 19-22}.

Amostragem Aleatória

O tamanho da amostra necessário para detectar uma Razão de Probabilidades ajustada (aOR) maior que 1,5 (erro $\alpha = 0,10$, bicaudal) entre os grupos foi calculado estimando a prevalência de infecções por HPV em 20%, baseado nos resultados de estudos em mulheres amazônicas^{9, 12}. Considerando o intervalo de confiança de 95% e aceitação de um erro de 4%, a menor amostra utilizada foi de 300 pacientes por Distrito. Visto que as populações indígenas se encontram espalhadas na Floresta Amazônica (difícil acesso), o processo de amostragem consistiu em uma representação aleatória dos grupos, considerando cada vilarejo como um grupo. Quarenta e duas aldeias no distrito Yanomami e 34 no Distrito Leste foram

numeradas e uma sequência aleatória (<http://www.random.org/>) foi gerada, considerando o tamanho de cada vila. Os grupos selecionados foram visitados na sequência fornecida, até que o tamanho amostral desejado fosse alcançado.

O acesso ao Distrito Leste foi realizado por terra e por água, enquanto ao Distrito Yanomami foi realizado por vias aéreas (pequenos aviões e/ou helicópteros). Incluindo ambos os grupos, 664 pacientes foram registrados. Três mulheres foram excluídas do estudo por recusar a coleta de amostras (n=1) ou por não exibirem sinais de relações sexuais antes dos exames ginecológicos (n=2). Entre as 661 mulheres incluídas no estudo, 18 não puderam fornecer amostras para citologia devido a um fluxo menstrual intenso (n=15) ou por falta de swabs de cervix e/ou vaginal secos (n=3). Dentre as 643 amostras cervicais coletadas, 607 (93,5%) foram consideradas tecnicamente satisfatórias para análise citológica. As principais causas para amostras não serem aceitas foram ressecamento de amostras (n=13, 2,0%) e/ou presença de mais de 75% de células inflamatórias (n=20, 3,1%).

Coleta dos espécimes e extração do DNA

Foram necessárias duas visitas para cada aldeia indígena. A primeira para obter o consentimento de seus líderes, explicando o propósito do estudo e para visitar as famílias, para convidar as mulheres para participar dos mesmos. Durante a segunda visita, entrevistas, exames ginecológicos e coletas de amostras cervicais foram realizados nas unidades médicas básicas, mantidas pelo Governo Federal Brasileiro, localizadas estrategicamente perto das tribos (em áreas remotas), após obtenção de consentimento formal, traduzido para suas línguas nativas, e voluntário das mulheres das tribos. Intérpretes que falavam os dialetos nativos foram utilizados durante o estudo. Mulheres sexualmente ativas que responderam ao convite foram registradas, incluindo mulheres de todas as idades, grávidas e pós-parto. Mulheres que não possuíam experiência sexual, não indígenas (mesmo que morassem na comunidade) e aquelas que não entenderam o propósito do estudo foram excluídas.

Entrevistas realizadas individualmente coletaram informações demográficas e clínicas. Após essas, as participantes foram submetidas a exames ginecológicos, incluindo exame especular com coleta de células cervicais, utilizando um bastão cervical e espátulas de madeira, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO)²³. As amostras foram expostas em lâminas, preparadas e analisadas por dois patologistas seniores. Uma segunda amostra cervical foi coletada em um container para transporte de espécime (STM; Qiagen, CA) e o DNA foi isolado utilizando kits QIAamp DNA[®] (Qiagen, CA), seguindo os protocolos padrão. Todas as amostras foram separadas utilizando um volume igual de solução tampão (TE). Todas as amostras foram processadas em uma capela com

fluxo laminar em um laboratório fisicamente isolado, onde a amplificação por PCR foi realizada.

Desenho de iniciadores (*primers*) NGS (Next Generation Sequencing) e origens das amostras

Visto que o espectro dos tipos de HPV presentes nessa população era desconhecido, foi utilizado um novo ensaio de sequenciamento de última geração desenvolvido recentemente no laboratório Burk (manuscrito em preparação). Resumidamente, duas regiões alvo foram utilizadas para determinar o genótipo do HPV (informações adicionais no anexo). Para cada ensaio, vários *primers* degenerativos específicos para diferentes gêneros, espécies ou tipos de HPV foram agrupados e um código de barras de DNA (8-bp Hamming) único foi anexado ao 5' terminal de cada *primer*. Cada código de barra era diferente em pelo menos 2-bp em comparação com os outros *primers*²⁴.

Amplificação e Sequenciamento de Next-Gen PCR

Uma alíquota de cada DNA foi amplificada usando *primers* oligonucleotídeos codificados por 8-bp para cada ensaio NGS. Para todas as amostras, um único código de barras foi introduzido ao amplicon de PCR pelos *primers* diretos e reversos. Resumidamente, uma amostra de um µL de DNA em uma reação com 25 µL contendo quantidade igual de AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life Technologies, CA) e HotStart-IT Fidelity DNA Polymerase (Affymetrix, CA). As condições da PCR incluíram uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C seguido por 15 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto, 25 ciclos a 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto, e uma extensão final a 68°C por 10 minutos. As temperaturas de aquecimento do ensaio fapR foram ajustadas a 57°C pelos primeiros 15 ciclos e 62°C para os 25 ciclos seguintes.

Uma amplificação bem-sucedida do fragmento de HPV previsto foi estimada para cada “amplicon” de acordo com intensidade relativa da banda quando colocada em gel de etídio e comparada a um controle; os produtos da PCR codificados de todas as amostras foram agrupados ajustando-se de acordo com a concentração de DNA dos produtos da PCR adicionando-se menos para amostras com produtos de PCR abundantes. Caso não fosse observado amplicon pela coloração com brometo de etídio, 20 µL de reação eram adicionados à mistura. As misturas de produtos da PCR foram purificadas com QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA); uma alíquota de amplicons de DNA purificados foi preparada usando a IlluminaTruSeq DNA SamplePreparation Kit e sequenciada em uma IlluminaHiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA) na Instalação compartilhada de Epigenética Albert Einstein utilizando uma leitura de 150bp Paired-End.

Limite de OTU e Determinação de HPV Positivo

Os valores de corte foram definidos com a finalidade de remover “clusters de baixa frequência”. Em cada ensaio foram suprimidos raros OTUs, dependendo da quantidade de sequências de cada coleção de illumina ou listas de sequência. Por exemplo, O *taxon* (tipo de HPV) era considerado negativo quando o numero de leituras em uma amostra era menor que 0.5% do máximo de leituras do mesmo tipo em outra amostra. Uma amostra era considerada negativa quando o total de leituras de HPV era menor que um limite definido para cada ensaio. Para um dado tipo de HPV ser considerado presente em uma dada amostra, o numero de leituras deveria ser maior que 1% do total de leituras de HPV da amostra.

Controle de qualidade dos procedimentos laboratoriais

Cem amostras (15%) foram aleatoriamente selecionadas para Re-amplificação e sequenciamento NG. Os ensaios foram realizados de forma cega. De acordo com a prevalência dos genotipos de HPV entre os dados originais e o grupo de controle foi maior que 96% ($\kappa = 0.90$). Os seguintes tipos de HPV foram considerados de alto risco: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66³⁰.

Métodos de análise de dados

Análises estatísticas descritivas padrão foram realizadas, incluindo distribuições de frequência por variáveis categóricas, medianas e amplitude interquartil ou médias e desvios padrão (DP) para variáveis contínuas com distribuições não normais ou normais (gaussianas), respectivamente. Foram estimados prevalência e um intervalo de confiança de 95% baseados em uma distribuição binomial. Para comparar as médias das amostras (variáveis com distribuição normal e uma homogeneidade de variância) foi utilizado o teste T de Student. Para outros casos, o teste de Mann-Whitney foi utilizado. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar diferenças em proporções de variáveis categóricas. Taxas de chance e intervalos de confiança de 95% foram calculados em análises de uma variável e taxas de chance ajustadas para regressões logísticas de múltiplasvariáveis. O critério de seleção para variáveis em análises de múltiplasvariáveis foi o valor critico $p < 0.15$ nas análises de uma de variáveis individuais. O índice de diversidade de Shannon-Weiner foi utilizado para comparar a diversidade dos tipos de HPV entre grupos. O coeficiente de Cohen (κ) foi utilizado para avaliar a concordância entre observadores. Os dados foram expostos em tabelas e analisados utilizando o software MedCalc[®] versão 12.7.0 (Ostend, Belgica)

Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo IRB da instituição de origem e pelo Comitê Nacional de Éticas em pesquisas envolvendo seres humanos em Brasília - DF (Documento numero

325/2012; protocolo CONEP 16.800). Os líderes das tribos concordaram e autorizaram formalmente a execução do estudo, mas questões relativas à comportamento sexual e menarca não foram aprovadas e, por isso, excluídas dos questionários. As participantes foram bem informadas a respeito dos objetivos e métodos do estudo, e assinaram (ou carimbaram com impressões digitais) os formulários de consentimento. Foi necessária assistência de tradutores profissionais. Todas as amostras foram codificadas e não apresentam informações sobre a identidade das participantes.

Resultados

Para estudar as diferenças entre indígenas representados pelo antigo estilo de vida da floresta e aqueles com estilo de vida mais ocidental, foram selecionadas amostras aleatórias de duas regiões do norte do Brasil (ver figura 1). Treze vilas indígenas foram visitadas e 664 mulheres nativas foram registradas, representando 76% das mulheres sexualmente ativas dessas localidades, de acordo com o censo demográfico indígena (...). Dentre essas amostras, 359 (54%) mulheres eram Macuxi ou Wapishana de 5 tribos aleatoriamente selecionadas do Distrito Leste (Malacacheta, Pium-Taiano, Câmara, Boqueirao e Vista Alegre), e 305 (46%) eram de 8 vilas Yanomami (Dmini, Maturaca, Marari, Paimi-u, Surucucu, Alto Mucajai, Awaris e Erico).

A média de idade foi 35.8 (+/- 14.5) anos, variando entre 12 e 92 anos. Aproximadamente um terço das participantes tinham entre 3 ou 4 filhos (n=241, 36.4%) e 48 (7.2%) mulheres estavam grávidas durante o período dos exames. Das 46 mulheres sem filhos (6.9%), 27 haviam estado grávidas pelo menos uma vez. A média de idade entre as mulheres grávidas do primeiro filho foi de 18.6 anos (+/-4.1). A maioria das mulheres eram casadas ou viviam com um homem (n=359, 80.9%). Dentre essas, a média de idade de casamento foi de 20.6 anos (+/- 7.9). A Tabela 1 mostra as características demográficas entre os grupos étnicos. As mulheres Yanomami eram mais jovens, casaram mais cedo, tiveram os primeiros filhos mais cedo e apresentavam maior probabilidade de estarem grávidas.

Quando perguntadas se haviam realizado pelo menos um teste de Papanicolaou nos últimos três anos, 366 (58%) de 631 mulheres informaram que haviam realizado o mesmo. Dentre as mulheres com 25 anos ou mais velhas (n=517), 427 (82.6%) contaram ter realizado 3 ou mais testes de Papanicolaou. Apenas 22 (3.3%) mulheres sabiam dos resultados de seus testes antes de receberam a citologia, e todas eram do distrito Leste. Oito mulheres do distrito Leste (2.2%) haviam sido submetidas a histerectomias, das quais 2 por conta de câncer

cervical. Apenas 2 mulheres Yanomami haviam passado pelo mesmo procedimento e não sabiam a indicação de tal procedimento.

Entre as 607 amostras citológicas consideradas tecnicamente satisfatórias, a predominância de anomalias citológicas foi de 3.3% (95% IC: 2.1 até 5.1%) e um caso de carcinoma invasivo (0.17%). A prevalência de citologias anormais foi maior em mulheres indígenas do distrito Yanomami que do distrito Leste (5.1% vs 1.8%, respectivamente, $p=0.04$). Não houve uma diferença significativa em infiltrações inflamatórias nos espécimes obtidos dos grupos Yanomami e do Leste (68.0% vs 74.7%, respectivamente). A Tabela 2 mostra a citologia e os resultados sobre o HPV para cada grupo.

A prevalência global de HPV foi 39,7% (95% CI: 37.6% a 41. 8%). Infecção pelo HPV foi mais comum em mulheres Yanomami do que em mulheres Macuxi ou Wapishana (45.9% vs 34.5%, respectivamente, $p = 0.003$). Entre os casos positivos, infecções por múltiplos tipos de HPV foram detectados em 45.1%, e variaram de 2 tipos ($n = 58$) a 11 tipos de HPV ($n = 1$), com uma média de 1.9 tipos de HPV por participante positiva. A prevalência de infecções por múltiplos tipos foi maior em mulheres do distrito Yanomami quando comparadas com mulheres do distrito oriental (45,9% vs 34,5%, respectivamente; $p=0,02$).

Sessenta tipos diferentes de HPV (Representando 12 grupos de espécies de HPV) foram detectados (figura 3). Entre mulheres Yanomami, 42 espécies de HPV foram detectadas, comparado com 52 tipos entre mulheres Macuxi e Wapishana (tabela 2). Além disso, a análise de diversidade de tipos de HPV usando a medida de diversidade Shannon-Weiner indicou que existe uma maior diversidade de tipos de HPV entre mulheres Yanomami (dados complementares). Oito tipos de HPV tiveram variabilidade de sequência maior do que 5% em relação ao genótipo mais próximo no seguimento amplificado, a maioria ($n=7$; 87,5%) foram do grupo Oriental. Os tipos mais prevalentes entre mulheres Yanomami foram HPV 16 ($n = 29$, 9.5%), HPV 31 ($n = 27$, 8.8%). Enquanto HPV 31 ($n = 17$, 8.3%), HPV 68 ($n = 14$, 3.8%), HPV 53 ($n = 11$, 3.0%) foram os grupos mais comuns em mulheres do distrito Oriental. A prevalência de tipos HPV Alto Risco foi de 26.5% ($n = 173$) e foi maior em mulheres Yanomami (34.1% vs 19. 2%, $p< 0.0001$). As mulheres Yanomami também tiveram maior prevalência de infecções por HPV16 (9,5% vs 2,8%, $p=0,001$) e HPV18 (7,2% vs 1,9%, $p=0,003$) comparado com mulheres Macuxi ou Wapishana. Não houve diferença de prevalência de HPV (HPV de alto risco) entre grupos étnicos para participantes abaixo dos 35 anos de idade (figura 4). Entretanto, considerando mulheres com mais que 35 anos, o grupo Yanomami teve maior prevalência de infecção por HPV, HR-HPV, HPV16 e HPV18 em relação ao grupo oriental (tabela 3). Três casos de HSIL e/ou carcinoma foram identificados

em mulheres Yanomami com mais de 45 anos infectadas com tipos de HR-HPV (16 e 31). A prevalência de infecção por HPV em casos de ASC-US e LSIL ($n = 17$) foi 88% e os tipos mais comuns foram HPV31 (41,1%) e HPV16(17,3%).

Considerando um teste citológico anormal (ASC-US, LSIL e HSIL), uma análise univariada revelou que pertencer ao grupo Yanomami aumentava o risco de atipia ($OR = 2,64$; $IC95\% = 1,5 - 7,1$). Idade menor do que 35 anos e/ou gestação também aumentaram significativamente o risco de anormalidade citológica (Tabela 3). Etnia, idade, gestação, e teste Papanicolaou prévio foram avaliados em uma análise multivariada. Pertencer ao grupo étnico continuou como fator de risco dobrando a chance de ter uma citologia cervical alterada. Estar grávida também aumentou significativamente o risco da citologia normal. A idade e teste Papanicolaou prévio foram fatores de risco para citologia anormal neste modelo

Usando infecção por HPV Alto Risco como um desfecho, pertencer ao grupo Yanomami dobrou o risco de infecção em relação a ser Macuxi ou Wapishana ($OR = 1,98$; $IC95\% = 1,2 - 2,6$). Ser solteira, ter 35 anos de idade ou menos e declarar mais de quatro gestações também foram fatores de risco significantes em uma análise multivariada de infecção pelo HPV. Identificaram 2 fatores de risco independentes: ser Yanomami aumentou em 64% o risco de Infecção por HPV Alto Risco ($aOR = 1,64$; $IC 95\% = 1,1 - 2,4$), e ser solteira quase dobrou o risco de HPV Alto Risco ($aOR = 1,96$; $IC 95\% = 1,2 - 3,2$) (tabela 3).

Avaliação da prevalência de HPV por aldeia revelou um agrupamento geográfico das regiões com maior prevalência de HPV. No grupo Yanomami, as aldeias localizadas no nordeste do distrito Yanomami (figura um) e marcadas como 4, 7 e 8 ($n = 60$) apresentaram uma maior prevalência de infecção por HR-HPV do que as outras aldeias Yanomamis dispersas (50,0% vs 30,3%; $p = 0,005$; $OR = 2,29$; $IC95\% = 1,2 - 4,0$). As aldeias Yanomamis localizadas no Nordeste também apresentaram uma maior prevalência de HPV 31, HPV 16 e HPV 66 do que outras aldeias. Entre o grupo Oriental, a aldeia marcada como B ($n = 70$), localizada no norte do distrito, teve uma maior prevalência de infecções por HPV Alto Risco comparativamente com os outros grupos (30,0% vs 16,5%; $p = 0,01$; $OR = 2,16$; $IC95\% = 1,1 - 3,9$).

Discussão

Um progresso significativo pode ser observado nas últimas décadas referente a publicações sobre a saúde reprodutiva da mulher no contexto brasileiro. É notável, no entanto, que esse progresso científico se desenvolveu principalmente na população urbana, deixando

uma importante lacuna no entendimento das determinantes de saúde e doença de mulheres indígenas no Brasil.

Este estudo é a primeira amostragem aleatória de um grupo de mulheres de difícil acesso e revelou uma elevada prevalência de HPV em grupos indígenas do norte da Amazônia Brasileira que alcançou o valor de 45.9% em mulheres Yanomami. Essa prevalência é maior do que aquela relatada normalmente no Brasil. Estudos sobre a prevalência do HPV são frequentemente concentrados em regiões mais desenvolvidas do país Sul e Sudeste atingindo valores de 10.4 a 24.5% em mulheres sintomáticas (não-indígenas). Dois estudos foram feitos em regiões amazônicas. Rocha et al. conduziu um estudo de base populacional avaliando mulheres não indígenas da região amazônica do Brasil (área rural e urbana). A prevalência do HPV foi 29.1%, considerada elevada pelos autores. Semelhante ao nosso estudo, 97% das citologias foi normal. Castro et al. também acessou a prevalência HPV em mulheres urbanas da Amazônia central (Brasil). Eles detectaram uma prevalência de HPV no valor de 25% entre mulheres assintomáticas que procuravam o serviço de prevenção, menor do que a encontrada no nosso estudo. No entanto, é notável que nesses estudos avaliando mulheres de áreas urbanas da Amazônia, a prevalência relativa de HPV 16 foi substancialmente maior do que em mulheres indígenas. Rocha et al. descreveu que quase 60% dos vírus detectados foram HPV 16 (58.1%), seguido pelo HPV 58 (20. 0%), enquanto Castro et al. reportou uma prevalência do HPV 16 de 56% entre mulheres positivas. No grupo Yanomami, o HPV 16 contabilizado foi somente 19% das amostras positivas, e no grupo Makushi e Wapishana somente 8%. O oposto foi encontrado quando se tratou do HPV tipo 18. O HPV 18 não foi comumente detectado nos estudos Brasileiros, ou ele teve uma prevalência abaixo de 1% em mulheres assintomáticas. No estudo de Rocha et al. Nenhum participante foi positivo para HPV 18 da mesma maneira no estudo de Castro. No entanto, HPV 18 foi o terceiro tipo mais comum no nosso estudo, presente em 7% das mulheres e Yanomami (15% das amostras positivas), e 2% no grupo indígena Oriental (5% das amostras positivas).

Uma grande diversidade genotípica de HPV foi observada nos dois grupos indígenas. Enquanto Rocha et al. encontrou 14 tipos de HPV (16, 33, 81, 6, 70, 31, 35, 45, 52, 53, 61, 68, 71 e 89) e Castro et al. descreveu 7 tipos de HPV (16, 33, 66, 13, 33, 58, 68), em mulheres da Amazônia, nosso estudo detectou mais de 60 tipos de HPV. Essa diversidade revelou uma grande prevalência de HPV Alto Risco não vacinados nos distritos indígenas, indicando que 69% das mulheres indígenas infectadas pelo HR-HPV não estariam protegidas pela vacina, a não ser que tenha ocorrido proteção cruzada com o tipo de HPV filogeneticamente mais próximo. Embora proteção cruzada tenha sido descrita entre os tipos de HPV 45 e 31, estudos

sobre proteção cruzada ainda são limitados. Mesmo assim, o desenvolvimento de uma vacina nanovalente para o HPV recentemente aprovada pela FDA nos Estados Unidos representa a possibilidade de uma melhor cobertura vacinal para mulheres indígenas.

Os resultados acima classificam mulheres indígenas, particularmente mulheres Yanomami, como pertencentes ao grupo de alto risco para infecção pelo HPV e câncer de colo do útero. Nosso estudo também revelou uma diferença significativa na prevalência de lesões cervicais entre os dois grupos étnicos estudados, os quais diferiram em dois séculos da interação com a sociedade adjacente, com a qual tem coexistido geograficamente, mas historicamente e socialmente separados. O impacto das mudanças ambientais e sócio-culturais, que acontecem em praticamente todas as comunidades indígenas na saúde da mulher tem apontado para uma crescente incidência de doenças degenerativas como diabetes, hipertensão e câncer em indígenas americanos. Isso se deve ao crescente contato com a sociedade ocidental e o seu estilo de vida. Nesse contexto, era esperado que as comunidades do distrito Oriental tivessem uma maior prevalência de HPV Alto Risco e lesões precursoras de câncer de colo de útero, pois eles tiveram uma interação mais prolongada com a sociedade adjacente em relação ao grupo Yanomami. No entanto, os dados apontam o contrário. Ser um membro de um grupo indígena mais isolado foi um fator de risco para lesões intra-epiteliais cervicais. Isso sugere que os Yanomami têm sustentado infecções pelo HPV por um maior período histórico.

Características relevantes e práticas culturais da saúde reprodutiva das mulheres Yanomami foram destacadas por Early et al. e podem ajudar a explicar o risco elevado de HPV e câncer cervical. Esse estudo antropológico reportou que garotas Yanomami moram na casa dos seus pais até dois anos após a menarca (12,4 anos em média), momento em que se mudam para casa dos pais do noivo e iniciou atividade sexual. De acordo com nosso estudo, a média de idade materna no momento do nascimento do primeiro filho foi de 16 anos. Somado a exposição sexual precoce, eles reportaram um curto período entre gestações, multiparidade (Taxa de fertilidade = 8 crianças por mulher) E múltiplos parceiros sexuais. Os autores também destacaram que durante o período reprodutivo (15 a 40 anos), as mulheres Yanomami passam aproximadamente 90% do tempo grávidas e/ou amamentando. O importante fator que pode contribuir para uma maior prevalência de lesões intra-epiteliais cervicais em mulheres Yanomami é o seu isolamento geográfico na floresta. Dificuldades para as mulheres entenderem e aceitarem o rastreamento, deficiências na infraestrutura e barreiras logísticas relacionadas a dificuldade de acesso podem explicar a pequena inclusão das mulheres Yanomami a um programa de prevenção completo e eficiente. A maior prevalência de

mulheres Yanomami que nunca fizeram exame citológico relatada no presente estudo corrobora essa noção.

Um tópico que merece atenção é a relação entre HPV e idade nesses grupos. A prevalência do HPV por idade no grupo indígena do distrito Oriental apresentou uma curva em L, similar àquela descrita para mulheres brasileiras não-indígenas. No entanto o distrito Yanomami apresentou uma curva em U. Isso enfatiza a elevada e crescente prevalência de HPV e HR-HPV em mulheres Yanomami a partir dos 35 anos, alcançando a prevalência de aproximadamente 80% após os 55 anos. Um interessante estudo descreveu o perfil da citologia cervical (mais de 4 milhões de testes) realizados em mulheres indígenas e não-indígenas através do Brasil (Entre 2008 e 2012). Quando grupos étnicos foram comparados, a prevalência de HSIL foi duas a três vezes maior em mulheres indígenas do que não-indígenas no grupo mais velho (maior que 64 anos de idade). A maior prevalência de HR HPV demonstrada no nosso estudo pode ajudar a explicar este achado. Uma curva similar foi observada em mulheres nativas da Nigéria rural e outras regiões da África Subsaariana. Clarke et al. realizou um estudo de base populacional sobre a prevalência de HR-HPV em mulheres africanas e, apesar deles terem uma menor prevalência de HPV comparado com o nosso estudo, os autores também descreveram um aumento da prevalência de infecção por HR-HPV após os 35 anos de idade. A explicação para esta elevada prevalência de HR-HPV em idades mais velhas permanece indefinida. Problemas culturais e comportamentais, levando a exposição sexual continua em idades mais velhas, e uma menor capacidade de combate ao vírus entre indígenas de idade mais avançada podem estar relacionados com esse processo. A implicação da persistência ao longo prazo da infecção pelo HPV em comunidades de caçadores-coletores isoladas da Amazônia e da África sugere que isso pode ser uma característica do homem ancestral e esse padrão que reflete uma diminuição da prevalência com a idade na sociedade ocidental representa uma mudança recente. Essas características da história natural do HPV implicam uma adaptação viral a comportamentos e características da população de hospedeiros para uma adequação viral continua objetivando ter sucesso como organismo simbiótico.

Este estudo teve limitações. Primeiro, o desenho em corte transversal não permite o uso do critério casualidade e temporalidade, pois desfecho e fatores de risco foram medidos simultaneamente, portanto viés e causalidade reversa não puderam ser eliminados. Segundo, a maioria das mulheres Yanomami não conhecia o calendário cristão, elas informaram suas idades baseadas em ciclos lunares, o que faz com que esse dado seja relativamente impreciso, principalmente para os participantes mais velhos, requerendo cautela em sua análise. No

entanto, nós avaliamos os dados de idade usando o padrão IARC de categorias etárias, o que deu maior credibilidade aos resultados obtidos.

Apesar da identificação de oito novos genomas de HPV, somente um foi identificado no grupo étnico mais isolado. Esses tipos foram raros, e nós fomos incapazes de identificar novos Papiloma vírus endêmicos em mulheres Yanomamique supostamente estavam socialmente isoladas de populações não indígenas por pelo menos 12.000 anos. Parece mais provável que a maioria, se não todos, os tipos de HPV evoluíram milhares de anos atrás em primatas pré-históricos e adquiriram formas Genômicas similares àquelas existentes hoje em dia. Mesmo assim, estudos futuros das variantes do HPV nessas mulheres deverão elucidar melhor suas origens.

Conclusão

Mulheres indígenas do extremo norte da Amazônia brasileira, especialmente o grupo étnico Yanomami, tem risco aumentado de câncer de colo de útero, devido à alta prevalência de HR-HPV e a uma maior diversidade de genótipos. Um aumento da prevalência de HPV com a idade também foi observado em mulheres Yanomami, o que pode representar um padrão caçador-coletor. Existe uma menor prevalência relativa e absoluta de HPV16 em relação ao que foi descrito para mulheres não indígenas no Brasil, e o oposto observado para o HPV18. Apesar da identificação de oito potenciais novos tipos de genoma de HPV, não fomos capazes de demonstrar a presença de um novo Papiloma vírus endêmico unicamente entre mulheres Yanomami.

Agradecimentos

Agradecemos primeiramente à colaboração do Instituto de Saúde Indígena (Ministério de saúde do Brasil), por prover interpretes e enfermeiras, além de transporte marítimo, terrestre e aéreo. Também estendemos os agradecimentos aos Líderes das tribos indígenas, pelo suporte, preocupação a respeito da saúde de seus povos e por abrir suas sociedades para esse estudo.

Bibliografia

1. FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. PubMed PMID: 21351269. Epub 2011/02/26. eng.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014. Rio de Janeiro [cited 2014]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
3. DA FONSECA, AJ.; FERREIRA, LP.; DALLA-BENETTA, AC.; ROLDAN, CN.; FERREIRA, ML. [Epidemiology and economic impact of cervical cancer in Roraima, a Northern state of Brazil: the public health system perspective]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010 Aug;32(8):386-92. PubMed PMID: 21180875. Epub 2010/12/25. Epidemiologia e impacto econômico do câncer de colo de utero no Estado de Roraima: a perspectiva do SUS. por.
4. Brasil. Ministério da Saúde. SIASI: Sistema de Informação da Atenção da Saúde Indígena. Brasília, 2013. Brasília. [cited 2013.]. Available from: www.saude.gov.br/siasi.
5. JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, MM.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. PubMed PMID: 21296855. Epub 2011/02/08. eng.
6. WHO. Health of indigenous people. Geneva 2007 [2013 jul 13]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs326/en/>.
7. COIMBRA JR, CEA.; SANTOS, RV.; Saúde, minorias e desigualdade: algumas teias de inter- relações, com ênfase nos povos indígenas no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2000;5(1):125-32.
8. KIGHTLINGER, RS.; IRVIN, WP.; ARCHER, KJ.; HUANG, NW.; WILSON, RA.; DORAN, JR.; et al. Cervical cancer and human papillomavirus in indigenous Guyanese women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010 Jun;202(6):626 e1-7. PubMed PMID: 20430361. Epub 2010/05/01. eng.
9. BRITO, EB.; MARTINS, SJ.; MENEZES, RC. Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. *Epidemiology and infection*. 2002 Jun;128(3):485-9. PubMed PMID: 12113494. Pubmed Central PMCID: 2869846. Epub 2002/07/13. eng.
10. TONON, SA.; PICCONI, MA.; ZINOVICH, JB.; NARDARI, W.; MAMPAEY, M.; BADANO, I.; et al. Human papillomavirus cervical infection in Guaraní Indians from the rainforest of Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis*. 2004 Jan;8(1):13-9. PubMed PMID: 14690776. Epub 2003/12/24. eng.
11. PICCONI, MA.; ALONIO, LV.; SICHERO, L.; MBAYED, V.; VILLA, LL.; GRONDA, J.; et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *J Med Virol*. 2003 Apr;69(4):546-52. PubMed PMID: 12601763. Epub 2003/02/26. eng.

12. Ong CK, Bernard HU, Villa LL. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. *The Journal of infectious diseases*. 1994 Nov;170(5):1086-8. PubMed PMID: 7963697. Epub 1994/11/01. eng.
13. DANGOUR, AD. Cross-sectional changes in anthropometric variables among Wapishana and Patamona Amerindian adults. *Hum Biol*. 2003 Apr;75(2):227-40. PubMed PMID: 12943160. Epub 2003/08/29. eng.
14. SALZANO, FM.; JACQUES, SM.; NEEL, JV. Demographic and genetic relationships among Brazilian Wapishana Indians. *Annals of human biology*. 1980 Mar-Apr;7(2):129-38. PubMed PMID: 7425539. Epub 1980/03/01. eng.
15. SPIELMAN, RS.; MIGLIAZZA, EC.; NEEL, JV. Regional linguistic and genetic differences among Yanomama indians. *Science*. 1974 May 10;184(137):637-44. PubMed PMID: 4820848. Epub 1974/05/10. eng.
16. Early J. *The Population Dynamics of the Mucajai Yanomama*: Elsevier Science; 1990.
17. Early JD, Peters JF. *The Xilixana Yanomami of the Amazon: History, Social Structure, and Population Dynamics*: University Press of Florida; 2000.
18. GIBBONS, A. Yanomami people threatened. *Science*. 1991 Jun 21;252(5013):1616. PubMed PMID: 2047870. Epub 1991/06/21. eng.
19. ROTHHAMMER, F.; NEEL, JV.; DA ROCHA, F.; SUNDLING, GY. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. 8. Dermatoglyphic differences among villages. *American journal of human genetics*. 1973 Mar;25(2):152-66. PubMed PMID: 4689037. Pubmed Central PMCID: 1762519. Epub 1973/03/01. eng.
20. SOKAL, RR.; SMOUSE, PE.; NEEL, JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. XV. Patterns inferred by autocorrelation analysis. *Genetics*. 1986 Sep;114(1):259-87. PubMed PMID: 3770468. Pubmed Central PMCID: 1202935. Epub 1986/09/01. eng.
21. WARD, RH.; GERSHOWITZ, H.; LAYRISSE, M.; NEEL, JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians XI. Gene frequencies for 10 blood groups and the ABH-Le secretor traits in the Yanomama and their neighbors; the uniqueness of the tribe. *American journal of human genetics*. 1975 Jan;27(1):1-30. PubMed PMID: 50736. Pubmed Central PMCID: 1762774. Epub 1975/01/01. eng.
22. NEEL, JV.; TANIS, RJ.; MIGLIAZZA, EC.; SPIELMAN, RS.; SALZANO, F.; OLIVER, WJ.; et al. Genetic studies of the Macushi and Wapishana Indians. I. Rare genetic variants and a "private polymorphism" of esterase A. *Hum Genet*. 1977 Apr 7;36(1):81-107. PubMed PMID: 870412. Epub 1977/04/07. eng.
23. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo de útero. Rio de Janeiro.: INCA.; 2011.

24. SMITH, BC.; MCANDREW, T.; CHEN, Z.; HARARI, A.; BARRIS, DM.; VISWANATHAN, S.; et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One*. 2012;7(7):e40425. PubMed PMID: 22792313. Pubmed Central PMCID: Pmc3392218. Epub 2012/07/14. eng.
25. SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011 Mar 15;27(6):863-4. PubMed PMID: 21278185. Pubmed Central PMCID: 3051327.
26. MAGOC, T.; SALZBERG, SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011 Nov 1;27(21):2957-63. PubMed PMID: 21903629. Pubmed Central PMCID: 3198573.
27. EDGAR, RC.; HAAS, BJ.; CLEMENTE, JC.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011 Aug 15;27(16):2194-200. PubMed PMID: 21700674. Pubmed Central PMCID: 3150044.
28. EDGAR, RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2460-1. PubMed PMID: 20709691.
29. EDGAR, RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):996-8. PubMed PMID: 23955772.
30. COGLIANO, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*. 2005 Apr;6(4):204. PubMed PMID: 15830458. Epub 2005/04/16. eng.
31. COIMBRA JR, CEA.; GARNELO, L. Questões de saúde reprodutiva da mulher indígena no Brasil. Porto Velho, RO.: Centro de Estudos de Saúde do Índio de Rondônia.; 2003 [cited 2013 2013 jul 13]. Available from: <http://www.cesir.unir.br/pdfs/doc7.pdf>.
32. CRUZ ICFD. A sexualidade, a saúde reprodutiva e a violência contra a mulher negra: aspectos de interesse para assistência de enfermagem. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2004;38:448-57.
33. RISCADO, JLDS.; OLIVEIRA, MABD.; BRITO ÂMBBD. Vivenciando o racismo e a violência: um estudo sobre as vulnerabilidades da mulher negra e a busca de prevenção do HIV/aids em comunidades remanescentes de Quilombos, em Alagoas. *Saúde e Sociedade*. 2010;19:96-108.
34. ROSA, MI.; FACHEL, JM.; ROSA, DD.; MEDEIROS, LR.; IGANSI, CN.; BOZZETTI, MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-7. PubMed PMID: 18799155. Epub 2008/09/19. eng.
35. GIRIANELLI, VR.; THULER, LC.; SZKLO, M.; DONATO, A.; ZARDO, LM.; LOZANA, JA.; et al. Comparison of human papillomavirus DNA tests, liquid-based cytology and conventional cytology for the early detection of cervix uteri cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2006 Dec;15(6):504-10. PubMed PMID: 17106330. Epub 2006/11/16. eng.

36. AYRES, AR.; SILVA, GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2010 Oct;44(5):963-74. PubMed PMID: 20877926. Epub 2010/09/30. eng

por.

37. ROCHA, DAP.; BARBOSA FILHO, RAA.; DE QUEIROZ, FA.; DOS SANTOS, CMB. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2013;2013.

38. CASTRO, MM.; FARIAS, IP.; BORBOREMA-SANTOS, CM.; CORREIA, G.; ASTOLFI-FILHO, S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res*. 2011;10(1):186-96. PubMed PMID: 21341210. Epub 2011/02/23.

39. KRAMBECK, WM.; CADIDE, RM.; DALMARCO, EM.; DE CORDOVA, CM. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008;35(3):175-8. PubMed PMID: 18754286. Epub 2008/08/30. eng.

40. ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUNOZ, N.; BOSCH, FX.; MEIJER, CJ.; WALBOOMERS, JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*. 1994 Jan;69(1):114-9. PubMed PMID: 8286192. Epub 1994/01/01. eng.

41. WHO. ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. [cited 2007]. Available from: <https://www.who.int/hpvcentre>.

42. BONANNI, P.; BOCCALINI, S.; BECHINI, A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine*. 2009 May 29;27 Suppl 1:A46-53. PubMed PMID: 19480962. Epub 2009/06/02. eng.

43. DA ROCHA, AK.; BOS, AJ.; HUTTNER, E.; MACHADO, DC. [Prevalence of metabolic syndrome in indigenous people over 40 years of age in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Rev Panam Salud Publica*. 2011 Jan;29(1):41-5. PubMed PMID: 21390418. Epub 2011/03/11. Prevalencia da síndrome metabólica em indígenas com mais de 40 anos no Rio Grande do Sul, Brasil. por.

44. OLIVEIRA, GF.; OLIVEIRA, TR.; RODRIGUES, FF.; CORREA, LF.; IKEJIRI, AT.; CASULARI, LA. [Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in indigenous people from Aldeia Jaguapiru, Brazil]. *Rev Panam Salud Publica*. 2011 May;29(5):315-21. PubMed PMID: 21709935. Epub 2011/06/29. Prevalencia de diabetes melito e tolerância a glicose diminuída nos indígenas da Aldeia Jaguapiru, Brasil. por.

45. SOLÉ PLA MC, FM; CLARO, IB; SILVA, MAF; DIAS, MBK; BORTOLON, PC. Descriptive Analysis of the Profile of Cytopathologic Cervical Exams Carried out in Indigenous and Non-Indigenous Women in Brazil, 2008-2011. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2012;58(3):461-9.

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL

Human papillomavirus infection and cervical cancer screening in Yanomami, Macuxi and Wapishana women

Allex Jardim da Fonseca^{1,2}, Daniela Taeko², Thiciane Araújo Chaves², Lucia Dayanny da Costa Amorim², Raísa Saron Wanderley Murari², Angélica Espinosa Miranda³, Zigui Chen⁴, Robert David Burk^{4,5, *}, Luiz Carlos de Lima Ferreira^{1, *}.

1. Postgraduate Program in Tropical Medicine, Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.
2. Center for Health Sciences Research, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Brazil.
3. Center for Infectious Diseases, Universidade Federal do Espírito Santo, Maruípe, Vitória, Brazil.
4. Department of Pediatrics, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA.
5. Department of Microbiology & Immunology, Epidemiology & Population Health, and Obstetrics, Gynecology & Women's Health, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA.

* co-senior authors

Corresponding author:

Allex Jardim da Fonseca.

Av. Itaubá, 745, Bairro Caçari, Boa Vista, Roraima. CEP 69307-610

Tel: +55 95 981126172

Email: allex.j.fonseca@gmail.com

Authors' declaration:

There is no conflict of interest to be declared.

ABSTRACT

Objective: Indigenous women from the Amazon regions have some of the highest rates of cervical cancer in the world. This study evaluated cervical cytology and human papillomavirus (HPV) in native women that differ by lifestyle and interaction with western society. Yanomami women are isolated deep in the Amazon with a hunter/gatherer lifestyle. Macuxi and Wapishana women live in proximity to western society.

Methods: To select a representative group of women from each district, random cluster sampling was used, considering each registered village as a cluster. Cervical samples were collected for cytology and HPV detection and typing by PCR amplification and next generation sequencing. The study was approved by the National IRB and by tribal leaders.

Results: 664 native women were enrolled from 13 indigenous villages with a 76% participation rate. Yanomami women had higher rates of abnormal cytology (5.1% vs. 1.8%, $p=0.04$) and prevalent HR-HPV (37.4% vs. 2.5%, $p<0.001$). Yanomami women $>35y$ of age were significantly more likely to have HR-HPV, whereas women $\leq 35y$ did not significantly differ between groups. Prevalence of HPV was significantly different amongst geographically clustered Yanomami women ($p<0.004$). The most prevalent HPV types in the entire group were HPV31 (8.7%), HPV16 (5.9%) and HPV18 (4.4%).

Conclusion: Isolated endogenous Yanomami women were more likely to be HPV+ and rates increased with age. Study of HPV in isolated hunter-gather peoples suggests that long-term persistence is a characteristic of prehistoric humans and patterns reflecting decreased prevalence with age in western society represents recent change. These studies have implications for cervical cancer prevention and viral-host relationships.

Keywords: Indigenous, Health Services. Indians, South American. Ethnic Groups. Minority Health. Cervical Intraepithelial Neoplasia. Human Papillomavirus.

BACKGROUND

Among the nearly 500,000 new cases of cervical cancer (CC) estimated annually worldwide, 80% occur in middle or low income countries such as Brazil¹, where 15,900 new cases of cervical cancer occur each year (19/100,000)². In the Brazilian Amazon region, CC is a major public health problem. A population-based study³ conducted in 2010 revealed an annual incidence rate of 46/100.000 in the Amazonian region, which is the highest incidence rate in Brazil. Demographically approximately 15% of the Brazilian Amazonian population is constituted by indigenous peoples⁴. However, 23% of cervical cancer cases in this region are reported in native women³, suggesting a higher risk of CC (estimate incidence rate 110/100,000) which is amongst the highest rates reported in the world⁵.

Despite improving the health of indigenous populations being identified as a priority for Healthcare Organizations⁶, the health and epidemiological profile of indigenous women remains unknown, due, in part, to the lack of research and the precariousness of information systems on morbidity and mortality in these groups⁷. In South America, few studies have assessed the prevalence of HPV and cervical intraepithelial lesions in indigenous women in the jungle, whereas many studies have investigated indigenous groups from the most urbanized regions of the continent. In indigenous groups in South America with permanent interactions with western society, the reported prevalence of HPV in asymptomatic women ranged from 14 to 60%⁸⁻¹⁰. A study that analyzed the HPV16 variants in Quechua indigenous women (an ethnic group integrated within the surrounding society) that inhabit the border region between Argentina and Brazil reported that 69% of HPV16 genotypes detected were European variants, reflecting the possible influence of Portuguese - Spanish colonization of the Inca and their descendants of that region¹¹.

Currently most isolated indigenous groups in the Americas are inhabitants of the Amazonian rainforest, with high rates of cervical cancer and little knowledge of the HPV within these groups. A study by Ong et al.¹² investigated HPV infection in women of three isolated indigenous tribes from the Brazilian Amazon twenty years ago (Tiriyó, Waiapi and Mundurukú). They reported a HPV prevalence of 14.4% but only evaluated 19 types of genital HPV. Genetic sequencing of samples not typing revealed more than 10% nucleotide variability in relation to the nearest genotype, and it was suggested that these isolates were possibly novel types, endemic to native Amazonian population.

Different populations, especially isolated indigenous people, may exhibit distinct characteristics of HPV infections, related to their ancestry, lifestyle and sexual behavior.

Moreover, knowledge about the epidemiology of HPV is necessary to understand the etiologic role of different HPV types and variants in these populations in order to develop effective preventative strategies against CC. Isolated indigenous groups (Yanomami) and groups with permanent interaction with the surrounding society (Macuxi and Wapishana) inhabit the extreme north of the Brazilian Amazon, presenting an ecological difference that can be used to investigate the influence of isolation and prehistoric living conditions on HPV diversity and associated cervical disease. To date, the prevalence and diversity of HPV in these groups have not been studied. The objective of this investigation was to evaluate the prevalence of cervical intraepithelial lesions and HPV in indigenous groups from the Amazon region.

METHODS

Study Design

A cross-sectional study was performed, which consisted of selecting a random sample of indigenous women in remote areas of the northern Amazon region of Brazil, to collect biological samples (cervical swabs), between February and July 2013. The study was designed to evaluate the prevalence of cervical intraepithelial lesions by cytology, and HPV infection by PCR amplification and next generation sequencing (NGS) in a pre-HPV vaccination population comparing two groups of women defined below.

Study site and participants

Due to cultural, ethnic and anthropomorphic factors, the Federal Government of Brazil has divided the indigenous groups from northern Amazonian region into two geographic regions (i.e., Indigenous Health Districts): the Eastern Indigenous District (composed mainly by Macuxi and Wapishana groups), and the Yanomami Indigenous District (Yanomami and Yekuana groups) (Figure 1).

With an estimated population of 40,000 inhabitants⁴, indigenous people from the Eastern Indigenous District are mainly represented by Macuxi and Wapishana. They belong to the *Karib* linguistic affiliation and the *Pemon* ethnic group. These groups are characterized by having very tenuous ethnic borders with non-indigenous society¹³. The initial contact of Macuxi with western civilization occurred during the Portuguese colonial occupation in the mid eighteenth century. Today most members of these ethnic groups are classified as having recent or permanent interactions with the non-indigenous society¹⁴. They are usually fluent in Portuguese language, and partially adhering to Western culture, life styles and beliefs. Most dwellings allow privacy and usually include running water and plumbing.

Also located in the northern Amazon, in the border region between Brazil and Venezuela, the Yanomami people are made up of approximately 20,000 inhabitants in Brazil⁴. The Yanomami belong to the *Yanomamö* ethnic unity, and have their own linguistic affiliation: *Yanomamam*¹⁵. They are a typical nomadic society of hunters, farmers and gatherers of the Amazon rainforest, and their contact with non-indigenous people is only very recent in their history^{16, 17}. The Yanomami have remained geographically isolated until the early twentieth century. In the decades between 1910 and 1940 the first contact with non-indigenous people was recorded, mainly with military soldiers and anthropologists. Even today, the Yanomami communities are characterized by living in small, isolated groups in the rainforest (accessible only by air), keeping their customs, native languages, social structure and practices such as infanticide, early sexual activity (debut) and multiparity¹⁸. They live in community thatched huts with dirt floors and neither running water nor plumbing. Geneticists and anthropologists studying the Yanomami have concluded that the absence of genetic, anthropometric and linguistic similarity with indigenous people from the Eastern District supports the view that the Yanomami have been isolated since ancient times^{15, 19-22}.

Random sampling

The sample size needed to detect an adjusted Odds Ratio (aOR) higher than 1.5 (alpha error = 0.10, two sided) between groups was calculated estimating the prevalence of HPV infection at 20%, based on the results of studies in indigenous Amazonian women^{9, 12}. Considering a confidence interval of 95% and an acceptable error of 4%, a minimum sample size of 300 patients was surveyed in each District. As indigenous people are distributed in small villages spread in the Amazon forest with difficult access, the sampling process consisted of random cluster sampling, considering each registered village as a cluster. Forty-two villages in the Yanomami District and 34 in the Eastern District were numbered, and a random sequence was generated (<http://www.random.org/>) weighted by the size of the villages. The selected villages were visited in order of randomization until the target sample size was achieved.

The access to the Eastern District was made by land or waterway, and the access to the Yanomami District was by air (small plane and/or helicopter). Including both groups, 664 were enrolled. Three women were excluded from the study who either declined sample collection (n=1) or did not have signs of prior sexual activity during the gynecological examination (n=2). Among the 661 women included in the study, 18 did not have cytology specimens obtained due to excessive menstrual flow (n=15) or absence of a cervix and/or dry vaginal swabs (n=3). Among 643 cervical samples collected, 607 (93.5%) were considered technically satisfactory for

cytologic evaluation. The major causes of unsatisfactory samples were desiccation artefacts (n=13, 2.0%) and/or presence of more than 75% inflammatory cells (n=20; 3.1%).

Specimen collection and DNA extraction

Two visits to each indigenous village were necessary. The first to obtain the consent of tribal leaders by explaining the purpose of the study, and to visit families of the village, in order to invite women to participate. During the second visit, interviews, gynecological examination and cervical sample collections were performed in basic health units maintained by the Federal Government of Brazil, located strategically near indigenous villages in remote areas, after formal informed consent of volunteer women, translated to their native language, was obtained. Interpreters speaking the native dialects were used throughout the study. Sexually active women who responded to the invitation were enrolled including women of all ages, pregnant women and postpartum women. Women without prior sexual activity, non-indigenous women (even living in the community), and those who could not understand the purposes of the study were excluded.

A structured individual interview collected demographic and clinical information, after which the participants underwent a gynecological examination including speculum examination with collection of cervical cells, using a cervical brush and wooden spatula, according to the recommendations of the World Health Organization (WHO)²³. The cells were applied to slides, fixed in the field and analyzed by two senior pathologists. A second cervical sample was collected into specimen transport medium (STM; Qiagen, CA) and DNA was isolated using QIAamp DNA[®] kits (Qiagen, CA) following the recommended protocol. All samples were eluted in an equal volume of TE buffer. All samples were processed in a BioSafety Cabinet in a laboratory physically separated from where the PCR amplification was performed.

NGS Primer design and sample sources

Since the spectrum of HPV types present in this isolated population was unknown, we utilized a novel next-gen sequencing assay recently developed in the Burk laboratory (manuscript in preparation). Briefly, two targeted regions were used for HPV genotyping (Supplementary data). For each assay, several degenerate primers specific to different HPV genera, species or types were pooled and a unique 8-bp Hamming DNA barcode was appended

to the 5' terminal end of each primer. Each barcode was at least 2-bp different from all other primers²⁴.

Next-Gen PCR amplification and sequencing

An aliquot of each DNA was amplified using 8-bp barcoded oligonucleotide primers for each NGS assay. For all samples, a unique barcode was introduced to the PCR amplicon by the forward and reverse primers. In brief, 1µl DNA sample in a 25µl reaction with an equal amount of AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life Technologies, CA) and HotStart-IT Fidelity DNA Polymerase (Affymetrix, CA). The PCR conditions included an initial 5 min denaturation at 95°C followed by 15 cycles at 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 68 °C for 1 min, 25 cycles at 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 68 °C for 1 min, and a final extension at 68 °C for 10 min. The annealing temperatures of the assay fapR were adjusted to 57 °C for the first 15 cycles and 62 °C for the second 25 cycles.

Successful amplification of the predicted HPV fragment was estimated for each amplicon by relative band intensity in an ethidium gel compared to a control; barcoded PCR products from all samples were pooled adjusting for DNA concentration of the PCR products by adding less for samples with abundant PCR product. If no amplicon was observed by ethidium bromide staining, 20µl of reaction was added into the pooled mixture. The PCR product mixtures were purified with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA); an aliquot of purified DNA amplicons was prepared using the Illumina TruSeq DNA Sample Preparation Kit and sequenced on an Illumina HiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA) at the Albert Einstein Epigenomics Shared Facility using 150bp paired-end reads.

Bioinformatics pipeline and taxonomic classification

The paired-end short Illumina reads were demultiplexed according to their sample-specific barcodes using Novobarcoder v1.00 (<http://www.novocraft.com/>), filtered for low quality reads (Q20) and short length (50 bp) using prinseq-lite v0.20.4²⁵, and merged to single reads using FLASH v1.2.7²⁶. The single-end reads that failed to merge were appended. These sequences were then subjected to cull the chimeras using UChime²⁷ in USEARCH v 7.0.1001²⁸ against a “gold” PV reference database. All reads passing the QC filter were then clustered into 95% identity operation taxonomic units (OTUs) and assigned an HPV taxonomy using USEARCH and a training PV dataset. A table of counts for the number of times each HPV type was observed in each sample was created; the taxonomy was classified at the type level (Figure 2).

We created a training PV dataset for taxonomic assignments using the UPARSE algorithm²⁹. In brief, all of merged reads were sorted by abundance to discard the singletons in order to improve specificity. The sequence abundances were then OTU clustered within the 95% identify threshold. After chimeric sequences were culled from the data sets, the clustered OTUs were classified using UPARSE-REF algorithm and a PV reference database. Note that the reference sequences were trimmed to only include the region amplified by each NGS assay. If OTUs hitting the reference database had 60% - 90% identities to an exiting PV type, they represented potential novel PV types. A representative OTU set was then assigned with a novel virus (NV) ID and added to the training PV dataset using the most abundant OTU from each bin. The OTUs with less than 60% identities to an exiting PV type were assigned to be non-PV sequences. Several scripts, consisting of a combination of publicly available software and those developed in-house using R v3.0.2, python v2.7.5, perl v5.12.4 and shell to handle the different data and formats were used to assist the reads assignment.

OTU cutoff and definition of HPV positivity

Cutoff values were set to remove “low frequency clusters”. Depending on the total number of sequences, we pruned rare OTUs by each NGS assay, each illumina library, or each sequencing lane. For each sample, the taxon (HPV type) was considered negative if the number of reads in the sample was less than 0.5% of the maximum read number of this type in another sample. A sample was considered negative if the total number of HPV reads was less than a defined threshold for each assay. Within each sample, for a given HPV type to be considered present, the number of reads had to be greater than 1% of the total number of HPV reads in the sample.

Quality control of laboratory procedures

One hundred samples (15%) were randomly selected for repeat amplification and NG sequencing. The assays were performed in a blinded fashion. The concordance of the prevalence of HPV genotypes between the original data and the quality control set was greater than 96% (kappa = 0.90). The following types were considered high-risk HPV (HR-HPV) types: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66³⁰.

Methods of data analysis

Standard descriptive statistical analyzes were performed, including frequency distributions for categorical variables, and medians and interquartile ranges (IQR) or means and standard deviations (SD) for continuous variables with non-normal and normal distributions, respectively. Prevalence and 95% confidence intervals (CIs) were estimated based on the binomial distribution. For comparison of sample means (variables with normal distribution and homogeneity of variances) the Student's t test was used. Otherwise, the Mann-Whitney test was used. The χ -square test was used to compare differences in proportions of categorical variables. Odds Ratios (OR) and 95% CIs were calculated in univariate analyzes and adjusted Odds Ratio (aOR) in multivariate logistic regression analyzes. The selection criteria of variables to enter the multivariate analyzes was the critical value of $p < 0.15$ in the univariate analyzes. Shannon-Weiner diversity index was used to compare HPV type diversity between groups. Cohen's kappa coefficient was used to evaluate interobserver agreement. Data were tabulated and analyzed using the software MedCalc® version 12.7.0 (Ostend, Belgium).

Ethical Aspects

The study was approved by the IRB of the parent institution and by the National Committee for Ethics in Research involving Human Beings in Brasilia - DF (Document No. 325/2012; Protocol CONEP 16,800). Tribal leaders agreed and formally authorized the execution of the study, but questions on sexual behavior and menarche were not approved and excluded from the questionnaire. The female participants were widely informed about the study aims and methods, and signed (or fingerprinted) the consent form. Assistance from professional translators was used as necessary. All samples were coded and did not have individual identifying information.

RESULTS

In order to study differences between indigenous people representing an ancient life style in the jungle and a more western life style, we selected a random sample from 2 regions of northern Brazil (see figure 1). Thirteen indigenous villages were visited and 664 native women were enrolled, representing 76% of the sexually active women within these locals, according to indigenous demographic census (SIASI). Among this sample, 359 (54%) women were Macuxi or Wapishana from 5 randomly selected villages in the Eastern District

(Malacacheta, Pium-Taiano, Camará, Boqueirão and Vista Alegre), and 305 (46%) women were from 8 Yanomami villages (Demini, Maturacá, Marari, Palimi-ú, Surucucu, Alto Mucajaí, Awaris and Ericó).

The average age was 35.8 (± 14.5) years, and ranged from 12 to 92 years. Nearly one third of the participants had between 3 and 5 children ($n=241$, 36.4%) and 48 (7.2%) women were pregnant at the time of examination. Of 46 women without children (6.9%), 27 had been pregnant at least 1 time. The mean age of the women at first child birth was 18.6 years (± 4.1). Most women were married or living with a man ($n=539$, 80.9%). Among these, the average age at marriage was 20.6 years (± 7.9). Table 1 shows demographic characteristics between the ethnic groups (table 1). The Yanomami women were younger, married at an earlier age, had a first childbirth at a younger age and were more likely to be currently pregnant.

When asked if they had at least one Pap test within the last three years, 366 (58%) of 361 women reported having had a Pap test. Amongst the women aged 25 years or older ($n=517$), 427 (82.6%) women reported having been screened for cervical cancer one or more times with 264 (51.0%) women stating they had 3 or more Pap tests. Only 22 (3.3%) women were aware of the results of their prior cytology, and all were from the Eastern District. Eight women from the Eastern District (2.2%) had undergone prior hysterectomy of which 2 were for cervical cancer. Only 2 Yanomami women had undergone hysterectomy and were unaware of the reason for surgery.

Among the 607 cytologic samples considered technically satisfactory, the prevalence of cytologic abnormalities was 3.3% (95% CI: 2.1 to 5.1%). The abnormal smears included 10 cases of ASC-US (1.6%), 7 cases of LSIL (1.15%), 2 cases of HSIL (0.33%) and 1 case of invasive carcinoma (0.17%). The prevalence of abnormal cytology was higher in indigenous women from the Yanomami District than from the Eastern District (5.1% vs 1.8%, respectively, $p=0.04$). There was no significant difference in inflammatory infiltrates in the specimens obtained from the Yanomami and Eastern groups (68.0% vs 74.7%, respectively). Table 2 shows cytology and HPV results for each group.

The overall prevalence of HPV was 39.7% (95% CI: 37.6% to 41.8%). HPV infection was more common in Yanomami women than in Macuxi and Wapishana women (45.9% vs 34.5%, respectively, $p = 0.003$). Among the positive cases, HPV multiples type infections were detected in 45.1%, and ranged from 2 types ($n = 58$) to 11 types of HPV ($n = 1$), with a mean of 1.9 HPV types per positive participant. The prevalence of multiple type infections was higher in

women from the Yanomami District than from the Eastern District (45.9% vs 34.5%, respectively; $p = 0.02$).

Sixty different HPV types (representing 12 HPV species groups) were detected (figure 3). In the Yanomami women, 42 HPV types were detected, compared to 52 types in the Macuxi and Wapishana women (table 2). In addition, analysis of HPV type diversity using the Shannon-Weiner diversity measure indicated there was greater HPV type diversity amongst the Yanomami women (supplementary data). Eight HPV types had sequence variability higher than 5% in relation to the closest genotype in the amplified fragment, the majority ($n = 7$; 87.5%) were from the Eastern group. The most prevalent types in Yanomami women were HPV 16 ($n = 29$; 9.5%), HPV 31 ($n = 27$; 8.8%) and HPV 18 ($n = 22$; 7.2%). Whereas, HPV 31 ($n = 17$; 8.6%), HPV 68 ($n = 14$; 3.8%), HPV 53 ($n = 11$; 3.0%) were the most common in women from the Eastern District. The prevalence of HR-HPV types was 26.5% ($n = 173$), and was higher in Yanomami women (34.1% vs 19.2%, $p < 0.0001$). The Yanomami women also had a higher prevalence of HPV16 (9.5% vs 2.8%, $p = 0.001$) and HPV18 infections (7.2% vs 1.9%, $p = 0.003$) compared to Macuxi and Wapishana women. There was no difference in the prevalence of HPV (or high-risk HPV) between the ethnic groups for participants below 35 years of age (figure 4). However, considering women older than 35 years, the Yanomami group had a higher prevalence of HPV infection, HR-HPV, HPV16 and HPV18 in relation to the Eastern group (table 3). Three cases of HSIL and/or carcinoma were identified in Yanomami women over 45 years infected with HR-HPV types (HPV 16 and 31). The prevalence of HPV infection in cases of ASC-US and LSIL ($n = 17$) was 88%, and the most common types were HPV31 (41.1%) and HPV16 (17.3%).

Considering an abnormal cytological test (ASC-US, LSIL and HSIL), univariate analysis revealed that belonging to the Yanomami group increased the risk of atypia (OR= 2.64; IC95%= 1.5 – 7.1). Age younger than 35 years and/or pregnancy also significantly increased the risk of cytologic abnormality (see Table 3). Ethnicity, age, pregnancy and previous Pap smear tests were evaluated in multivariate analysis. Belonging to the Yanomami ethnic group remained a risk factor, doubling the chance of having altered cervical cytology (aOR= 2.10; 95% CI= 1.1 – 5.5). Being pregnant also significantly increased the risk of abnormal cytology (aOR= 5.82; IC95%= 2.0 – 16.6). Age and previous Pap smear were risk factors for cytologic abnormalities in this model.

Using HR-HPV infection as an outcome, belonging to the Yanomami group doubled the risk of infection in relation to being Macuxi or Wapishana (OR = 1.98; IC95%= 1.2 – 2.6). Being

single, 35 years old or less, and reporting more than four pregnancies were also significant risk factors. Multivariate analysis of HPV infection identified 2 independent risk factors: being Yanomami increased by 64% the risk of HR-HPV infection (aOR = 1.64; CI 95%= 1.1 – 2.4), and being single almost doubled the risk of HR-HPV (aOR = 1.96; CI 95%= 1.2 – 3.2) (see Table 3).

Evaluation of HPV prevalence by village revealed a geographic clustering of regions with a high HPV prevalences. In the Yanomami group, the villages located in the northeast of the Yanomami District (see figure 1) and marked as 4, 7 and 8 (n = 60) presented a higher prevalence of HR-HPV infection than the other dispersed Yanomami villages (50.0% vs 30.3%; p = 0.005; OR = 2.29; CI95% = 1.2 – 4.0). The Yanomami villages located in northeast also presented a higher prevalence of HPV 31, HPV 16 and HPV 66 than villages. Amongst the Eastern group, the village marked as B (n = 70), located in the north of the Eastern District, had a higher prevalence of HR-HPV infections compared to the other groups (30,0% vs 16,5%; p= 0,01; OR = 2.16; CI95% = 1.1 – 3.9).

DISCUSSION

Significant progress can be observed in recent decades regarding publications on women's reproductive health in the Brazilian context. It is noted however that scientific progress has developed mainly in the urban population^{31 32, 33}, remaining an important gap in understanding the determinants of health and disease of indigenous women in Brazil.

This study is the first random sampling of a difficult to access group of women and revealed a high prevalence of HPV in indigenous groups from northern Brazilian Amazonian region, reaching 45.9% in Yanomami women. This is a higher prevalence than those usually reported in Brazil. Studies on the HPV prevalence are generally concentrated in the more developed regions in the country (south and southeast), ranging from 10.4 to 24.5% in asymptomatic (non-indigenous) women³⁴⁻³⁶. Two studies were performed in Amazon regions. Rocha et al.³⁷ conducted a population-based study evaluating non-indigenous women of the Amazonian region of Brazil (rural and urban area). The prevalence of HPV was 29.1%, considered high by the authors. Similarly to our study, 97% of cytologies were normal. Castro et al.³⁸ also assessed the HPV prevalence in urban women from the central Amazon region (Brazil). They detected a HPV prevalence of 25% among asymptomatic women seeking the preventive service, lower than in our study. However it is remarkable that in these studies

evaluating urban women of Amazonia, the relative prevalence of HPV16 was substantially higher than in the indigenous women. Rocha et al.³⁷ described that almost 60% of HPVs detected were HPV16 (58.1%), followed by HPV 58 (20.0%), while Castro et al.³⁸ reported a HPV16 prevalence of 56% among positive women. In the Yanomami group, the HPV16 accounted for only 19% of positive samples, and in Makushi and Wapishana group only 8%. The opposite was found regarding the HPV18. The HPV18 has not been commonly detected in Brazilian studies^{36, 39}, or it usually has a prevalence below 1% in asymptomatic women^{40, 41}. In the study of Rocha et al.³⁷ no participant was positive for HPV-18 as well as in Castro's study³⁸. However, HPV18 was the third most common type in our study, present in 7% of Yanomami women (15% of the positive samples), and 2% in the Eastern indigenous group (5% of positive samples).

A high genotypic diversity of HPV in both indigenous groups was observed. While Rocha et al.³⁷ found 14 types of HPV (16, 33, 81, 6, 70, 31, 35, 45, 52, 53, 61, 68, 71, and 89) and Castro et al.³⁸ described 7 types of HPV (16, 33, 66, 13, 33, 58, 68) in women from Amazonia, our study detected more than 60 types of HPV. This diversity revealed a high prevalence of non-vaccine HR-HPV in the indigenous districts indicating that 69% of the indigenous women infected by HR-HPV would not be protected by the vaccine, unless cross-protection with the closest phylogenetical HPV-type occurred. Although cross-protection has been described⁴² for HPV45 and HPV31, studies concerning cross protection are limited. Nevertheless, development of a nonavalent HPV vaccine recently FDA approved in the USA presents the possibility of better coverage for indigenous women.

The above results classify indigenous women, particularly the Yanomami women, at high risk for HPV infection and cervical cancer. Our study also revealed a significant difference in prevalence of cervical lesions between the two ethnic groups studied, which differed in 2 centuries of interaction with the surrounding society, and that have been coexisting geographically but historically and socially separated. The impact of environmental and socio-cultural changes that take place in virtually all indigenous communities on women's health have pointed to increased incidence of degenerative diseases such as diabetes, hypertension and cancer in American indigenous peoples, due to increasing contact with western society and lifestyles^{43, 44}. In this context, it was expected that the communities of Eastern District would have a higher prevalence of HR-HPV and precursor lesions of cervical cancer, since they have a longer interaction with the surrounding society in relation to the Yanomami. However, the data consistently point to the opposite. Being a member of the most isolated indigenous

group was a risk factor for cervical intraepithelial lesions. This suggests that the Yanomami have sustained HPV infections over a long historical period.

Relevant characteristics and cultural practices of reproductive health of Yanomami women were highlighted by Early et al.¹⁷ and may help explain their risk of HPV and CC. This anthropological study reported that Yanomami girls reside in their parent's house up to 2 years after menarche (12.4 years on average), when they move into the house of the groom's parents and start sexual activity. According to our study, Early reported an average maternal age at the time of first birth of 16 years. In addition to early sexual exposure, they reported a short period between pregnancies, multiparity (fertility rate = 8 children per woman), and multiple sexual partners. The authors also highlighted that during the reproductive period (15 to 40 years), the Yanomami women spend approximately 90% of their time pregnant and/or breastfeeding. An important factor that may contribute to the higher prevalence of cervical intraepithelial lesions among the Yanomami is their geographical isolation in the forest³⁴. Difficulties of women's understanding and acceptance of the screening, infrastructure deficiencies and logistical barriers related to access difficulties may explain the low inclusion of Yanomami women to complete and effective prevention programs. The higher prevalence of Yanomami women who had never had a cytological examination reported in the present study corroborate this notion.

A topic that deserves attention is the relation between HPV and age in these groups. The prevalence of HPV in the Eastern indigenous District presented an L-shaped curve, similar to that described for non-indigenous Brazilian women⁴¹. However the Yanomami district presented a U-shaped curve. It emphasizes the high and increasing prevalence of HPV and HR-HPV in Yanomami women from 35 years of age, reaching a prevalence of approximately 80% after 55 years. An interesting study⁴⁵ described the profile of cervicovaginal cytology (more than 4 million tests) performed in indigenous and non-indigenous women throughout Brazil (between 2008 and 2012). When ethnic groups were compared, the prevalence of HSIL was 2-3 times higher in indigenous women than in non-indigenous women in the elderly group (> 64 year of age). The high prevalence of HR-HPV demonstrated in our study may help explain this finding. A similar curve shape has been observed in native women from rural Nigeria and other regions of Sub-Saharan Africa. Clarke et al. performed a population based study on HR-HPV prevalence in African women and, although they had a lower prevalence of HPV than our study, the authors also described an increasing prevalence of HR-HPV infection after 35 years old. The explanation for this high HR-HPV prevalence at older ages remains elusive. Cultural and behavioral issues, leading to continuing sexual exposure at older ages, and a lower ability

of viral clearance among older indigenous women may be implicated in this process. The implication of long-term persistence of HPV infection in isolated hunter-gather peoples from Amazonia and Africa suggests that it could be a characteristic of ancient man and that patterns reflecting decreased prevalence with age in western society represents recent change. These features of the natural history of HPV imply viral-host adaptation to the behaviors and characteristics of the host population for continued viral fitness and success as a replicating symbiotic organism.

This study has limitations. First, the cross-sectional design does not allow the use of temporality and causality criterion, since outcome and risk factors were measured synchronously, so bias and reverse causality could not be eliminated. Second, most Yanomami women did not know the Christian calendar, and they informed their age based on lunar cycles, making this data relatively imprecise, mainly for the older participants, requiring caution in this analysis. However, we have analysed age data using the standard IARC age categories, what strengthen the credibility of the results.

Despite the identification of 8 novel HPV genomes, only 1 was identified in the most isolated ethnic group. These types were rare, and we were unable to identify novel endemic papillomaviruses in the Yanomami women that are supposed to have been socially isolated from non-indigenous populations for at least 12,000 years. It seems more likely that most, if not all, HPV types evolved thousands of years ago in prehuman primates and took genomic forms similar to those existing today. Nevertheless, future studies of the HPV variants in these women should better disclose their origins.

CONCLUSION

Indigenous women from the extreme north of the Brazilian Amazon, especially the Yanomami ethnic group, have increased risk of CC, due to the high prevalence of HR-HPV and a high genotypic diversity. An increasing prevalence of HPV with age was observed in Yanomami women, which may represent a hunter-gatherer pattern. There was a lower relative and absolute prevalence of HPV16 in relation to that described in non-indigenous women from Brazil, and the opposite was observed for HPV18. Despite the identification of 8 potential novel HPV genomes, and we were unable to demonstrate the presence of novel endemic papillomaviruses unique to the Yanomami women.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the collaboration of the Indigenous Health Bureau (Brazilian Ministry of Health) for providing interpreters and nurses, and for waterway, ground and air transport. We are grateful for the support of tribal leaders and their concerns with the health of their population and opening up their society for this study.

REFERENCES

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. PubMed PMID: 21351269. Epub 2011/02/26. eng.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014. Rio de Janeiro [cited 2014]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
3. da Fonseca AJ, Ferreira LP, Dalla-Benetta AC, Roldan CN, Ferreira ML. [Epidemiology and economic impact of cervical cancer in Roraima, a Northern state of Brazil: the public health system perspective]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010 Aug;32(8):386-92. PubMed PMID: 21180875. Epub 2010/12/25. Epidemiologia e impacto economico do cancer de colo de utero no Estado de Roraima: a perspectiva do SUS. por.
4. Brasil. Ministério da Saúde. SIASI: Sistema de Informação da Atenção da Saúde Indígena. Brasília, 2013. Brasilia. [cited 2013.]. Available from: www.saude.gov.br/siasi.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. PubMed PMID: 21296855. Epub 2011/02/08. eng.
6. WHO. Health of indigenous people. Geneva 2007 [2013 jul 13]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs326/en/>.
7. Coimbra Jr CEA, Santos RV. Saúde, minorias e desigualdade: algumas teias de inter-relações, com ênfase nos povos indígenas no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2000;5(1):125-32.
8. Kightlinger RS, Irvin WP, Archer KJ, Huang NW, Wilson RA, Doran JR, et al. Cervical cancer and human papillomavirus in indigenous Guyanese women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010 Jun;202(6):626 e1-7. PubMed PMID: 20430361. Epub 2010/05/01. eng.
9. Brito EB, Martins SJ, Menezes RC. Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. *Epidemiology and infection*. 2002 Jun;128(3):485-9. PubMed PMID: 12113494. Pubmed Central PMCID: 2869846. Epub 2002/07/13. eng.
10. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, Badano I, et al. Human papillomavirus cervical infection in Guarani Indians from the rainforest of Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis*. 2004 Jan;8(1):13-9. PubMed PMID: 14690776. Epub 2003/12/24. eng.
11. Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J, et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *J Med Virol*. 2003 Apr;69(4):546-52. PubMed PMID: 12601763. Epub 2003/02/26. eng.
12. Ong CK, Bernard HU, Villa LL. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. *The Journal of infectious diseases*. 1994 Nov;170(5):1086-8. PubMed PMID: 7963697. Epub 1994/11/01. eng.

13. Dangour AD. Cross-sectional changes in anthropometric variables among Wapishana and Patamona Amerindian adults. *Hum Biol.* 2003 Apr;75(2):227-40. PubMed PMID: 12943160. Epub 2003/08/29. eng.
14. Salzano FM, Jacques SM, Neel JV. Demographic and genetic relationships among Brazilian Wapishana Indians. *Annals of human biology.* 1980 Mar-Apr;7(2):129-38. PubMed PMID: 7425539. Epub 1980/03/01. eng.
15. Spielman RS, Migliazza EC, Neel JV. Regional linguistic and genetic differences among Yanomama indians. *Science.* 1974 May 10;184(137):637-44. PubMed PMID: 4820848. Epub 1974/05/10. eng.
16. Early J. *The Population Dynamics of the Mucajai Yanomama*: Elsevier Science; 1990.
17. Early JD, Peters JF. *The Xilixana Yanomami of the Amazon: History, Social Structure, and Population Dynamics*: University Press of Florida; 2000.
18. Gibbons A. Yanomami people threatened. *Science.* 1991 Jun 21;252(5013):1616. PubMed PMID: 2047870. Epub 1991/06/21. eng.
19. Rothhammer F, Neel JV, da Rocha F, Sundling GY. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. 8. Dermatoglyphic differences among villages. *American journal of human genetics.* 1973 Mar;25(2):152-66. PubMed PMID: 4689037. Pubmed Central PMCID: 1762519. Epub 1973/03/01. eng.
20. Sokal RR, Smouse PE, Neel JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. XV. Patterns inferred by autocorrelation analysis. *Genetics.* 1986 Sep;114(1):259-87. PubMed PMID: 3770468. Pubmed Central PMCID: 1202935. Epub 1986/09/01. eng.
21. Ward RH, Gershowitz H, Layrisse M, Neel JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians XI. Gene frequencies for 10 blood groups and the ABH-Le secretor traits in the Yanomama and their neighbors; the uniqueness of the tribe. *American journal of human genetics.* 1975 Jan;27(1):1-30. PubMed PMID: 50736. Pubmed Central PMCID: 1762774. Epub 1975/01/01. eng.
22. Neel JV, Tanis RJ, Migliazza EC, Spielman RS, Salzano F, Oliver WJ, et al. Genetic studies of the Macushi and Wapishana Indians. I. Rare genetic variants and a "private polymorphism" of esterase A. *Hum Genet.* 1977 Apr 7;36(1):81-107. PubMed PMID: 870412. Epub 1977/04/07. eng.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo de útero. Rio de Janeiro.: INCA.; 2011.
24. Smith BC, McAndrew T, Chen Z, Harari A, Barris DM, Viswanathan S, et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One.* 2012;7(7):e40425. PubMed PMID: 22792313. Pubmed Central PMCID: Pmc3392218. Epub 2012/07/14. eng.
25. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011 Mar 15;27(6):863-4. PubMed PMID: 21278185. Pubmed Central PMCID: 3051327.
26. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011 Nov 1;27(21):2957-63. PubMed PMID: 21903629. Pubmed Central PMCID: 3198573.
27. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 2011 Aug 15;27(16):2194-200. PubMed PMID: 21700674. Pubmed Central PMCID: 3150044.
28. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010 Oct 1;26(19):2460-1. PubMed PMID: 20709691.
29. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013 Oct;10(10):996-8. PubMed PMID: 23955772.

30. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*. 2005 Apr;6(4):204. PubMed PMID: 15830458. Epub 2005/04/16. eng.
31. Coimbra Jr CEA, Garnelo, L. Questões de saúde reprodutiva da mulher indígena no Brasil. Porto Velho, RO.: Centro de Estudos de Saúde do Índio de Rondônia.; 2003 [cited 2013 2013 jul 13]. Available from: <http://www.cesir.unir.br/pdfs/doc7.pdf>.
32. Cruz ICFd. A sexualidade, a saúde reprodutiva e a violência contra a mulher negra: aspectos de interesse para assistência de enfermagem. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2004;38:448-57.
33. Riscado JLDs, Oliveira MABd, Brito ÂMBBd. Vivenciando o racismo e a violência: um estudo sobre as vulnerabilidades da mulher negra e a busca de prevenção do HIV/aids em comunidades remanescentes de Quilombos, em Alagoas. *Saúde e Sociedade*. 2010;19:96-108.
34. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-7. PubMed PMID: 18799155. Epub 2008/09/19. eng.
35. Girianelli VR, Thuler LC, Szklo M, Donato A, Zardo LM, Lozana JA, et al. Comparison of human papillomavirus DNA tests, liquid-based cytology and conventional cytology for the early detection of cervix uteri cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2006 Dec;15(6):504-10. PubMed PMID: 17106330. Epub 2006/11/16. eng.
36. Ayres AR, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2010 Oct;44(5):963-74. PubMed PMID: 20877926. Epub 2010/09/30. eng

por.

37. Rocha DAP, Barbosa Filho RAA, de Queiroz FA, dos Santos CMB. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2013;2013.
38. Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res*. 2011;10(1):186-96. PubMed PMID: 21341210. Epub 2011/02/23.
39. Krambeck WM, Cadide RM, Dalmarco EM, de Cordova CM. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008;35(3):175-8. PubMed PMID: 18754286. Epub 2008/08/30. eng.
40. Eluf-Neto J, Booth M, Munoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*. 1994 Jan;69(1):114-9. PubMed PMID: 8286192. Epub 1994/01/01. eng.
41. WHO. ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. [cited 2007]. Available from: <https://www.who.int/hpvcentre>.
42. Bonanni P, Boccalini S, Bechini A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine*. 2009 May 29;27 Suppl 1:A46-53. PubMed PMID: 19480962. Epub 2009/06/02. eng.
43. da Rocha AK, Bos AJ, Huttner E, Machado DC. [Prevalence of metabolic syndrome in indigenous people over 40 years of age in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Rev Panam Salud Publica*. 2011 Jan;29(1):41-5. PubMed PMID: 21390418. Epub 2011/03/11. Prevalencia da síndrome metabólica em indígenas com mais de 40 anos no Rio Grande do Sul, Brasil. por.
44. Oliveira GF, Oliveira TR, Rodrigues FF, Correa LF, Ikejiri AT, Casulari LA. [Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in indigenous people from Aldeia Jaguapiru, Brazil]. *Rev Panam Salud Publica*. 2011 May;29(5):315-21. PubMed PMID: 21709935. Epub 2011/06/29. Prevalencia de diabetes melito e tolerancia a glicose diminuida nos indígenas da Aldeia Jaguapiru, Brasil. por.

45. Solé Pla MC, FM; Claro, IB; Silva, MAF; Dias, MBK; Bortolon, PC. Descriptive Analysis of the Profile of Cytopathologic Cervical Exams Carried out in Indigenous and Non-Indigenous Women in Brazil, 2008-2011. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2012;58(3):461-9.

Table 1: Demographic and clinical features of native indigenous women from the northern Brazilian Amazonian region. (Brazil, 2013).

	Yanomami District	Eastern District	p value
Age (years)	33.1 ($\pm$ 13.1)	38,1 ($\pm$ 14.6)	0,001
Number of children	3.5 ($\pm$ 2.3)	4.6 ($\pm$ 2.9)	Ns
Number of previous pregnancies	4.5 ($\pm$ 2.8)	5.5 ($\pm$ 3.4)	Ns
Currently pregnant	32 (10.4%)	16 (4.4%)	0.004
Age by the birthdate of first child (years)	16.0 ($\pm$ 3.1)	20.1 ($\pm$ 4.8)	0.004
Marital status			
Single	34 (11.1%)	57 (15.8%)	ns
Married/living together	249 (81.6%)	290 (80.3%)	ns
Widow/divorced	20 (6.5%)	14 (3.9%)	ns
Age at the marriage (years) (n=573)	17.1 ($\pm$ 5.1)	21.5 ($\pm$ 8.3)	0.001
Had undergone at least 1 Pap test within last 3 years (n=631)	118 (42.0%)	248 (70.6%)	<0.0001
Had undergone at least 1 Pap test life long (>24 years old) (n=517)	158 (72.8%)	269 (89.6%)	<0.0001
Had undergone at least 3 Pap test life long (>24 years old) (n=517)	75 (34.5%)	189 (63.0%)	<0.0001
Previous hysterectomy	2 (0.6%)	8 (2.2%)	ns

Ns: not significative.

Table 2: Cervical cell cytology and HPV results.

	Yanomami District	Eastern District	p value
Satisfactory cytologic samples	275 (94.2%)	332 (94.5%)	ns
Any intraepithelial lesion	14 (5.1%)	6 (1.8%)	0.04
ASC-US	7 (2.5%)	3 (0.9%)	ns
LSIL	4 (1.5%)	3 (0.9%)	ns
HSIL	2 (0.7%)	0	ns
Invasive cancer	1 (0.4%)	0	ns
HPV positive (all ages)	140 (45.9%)	124 (34.5%)	0.003
≤35 years old	88 (44.6%)	79 (44.1%)	Ns
>35 years old	52 (49.0%)	45 (25.0%)	<0.0001
High-Risk HPV positive (all ages)^{&}	104 (34.1%)	69 (19.2%)	<0.0001
≤35 years old	65 (32.9%)	50 (27.9%)	ns
>35 years old	39 (36.8%)	19 (10.5%)	<0.0001
HPV16 positive (all ages)	29 (9.5%)	10 (2.8%)	0.001
≤35 years old	17 (8.6%)	7 (3.9%)	ns
>35 years old	10 (9.4%)	3 (1.6%)	0.005
HPV18 positive (all ages)	22 (7.0%)	7 (1.9%)	0.003
≤35 years old	14 (7.1%)	6 (3.5%)	ns
>35 years old	7 (6.6%)	1 (0.5%)	0.008
HPV multiple type positive (all ages)	140 (45.9%)	124 (34.5%)	0.003
≤35 years old	88 (44.6%)	79 (44.1%)	ns
>35 years old	52 (49.0%)	45 (25.0%)	<0.0001
Number of HPV types detected/woman (positive samples)	2.1	1.8	0.02
Diversity of HPV types in population			
Number of HPV types	42	52	-
HPV types/sample size	0.14	0.14	-
Shannon diversity index[#]	5.16	4.75	0.012

[&]High-risk HPV types: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66.

^{*}In decreasing order of prevalence (novel types not included).

[#]Calculated using logarithm base 2.

Ns: not significant; ASC-US: atypical squamous cell of unknown significance; LSIL: low grade squamous cell intraepithelial lesion; HSIL: high grade squamous cell intraepithelial lesion.

Table 3. Univariate and multivariate analyses of risk factors for HR-HPV-DNA detection in native indigenous women from northern Amazonian region.

Demographics and clinical features	Total	High-risk HPV infections*			
		Yes (%)	p value	OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)
Yanomami District	305	104 (34.1%)	<0.0001	2.01 (1.4–2.8)	1.64 (1.1–2.4)
Eastern District	332	69 (19.2%)		1	1
Pregnant during the test					
Yes	44	17 (35.4%)	Ns	1.32 (0.7–2.4)	1.24 (0.7–3.1)
No	563	176 (27.2%)		1	1
Age					
Less than 35 years old	326	129 (35.2%)	<0.001	1.84 (1.2–2.6)	1.33 (0.8–2.0)
Older than 35 years	279	64 (22.7%)		1	1
Had undergone at least 1 Pap test life long					
Yes	471	136 (29.4%)	Ns	0.74 (0.5–1.1)	1.11 (0.4–1.8)
No	136	54 (35.8%)		1	1
Marital status					
Single	86	41 (49.9%)	0.0001	2.57 (1.6–4.1)	2.22 (1.2–3.8)
Married–living together	521	136 (27.5%)		1	1
Had undergone at least 1 Pap test within last 3 years					
Yes	342	91 (26.8%)	0.01	0.64 (0.4–0.9)	0.77 (0.4–1.3)
No	233	91 (36.4%)		1	1
Age at the birthdate of 1st child					
< 20 years old	252	73 (28.9%)	Ns	1.31 (0.3–3.6)	1.11 (0.2–5.4)
≥ 20 years old	141	35 (24.8%)		1	1
Number of pregnancies					
>4 pregnancies	286	105 (36.8%)	0.002	1.75 (1.2–2.4)	1.52 (0.8–2.3)
≤4 pregnancies	317	81 (25.0%)		1	1

* High-risk HPV types: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66

Ns: not significative (p<0.05). All variables were adjusted for all other variables in multivariate analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0133635.t003

This study is the first random sampling of a difficult to access group of women and revealed a high prevalence of HPV in indigenous groups from northern Brazilian Amazonian region, reaching 45.9% in Yanomami women. Despite differences in laboratory methods, this seems to be a higher prevalence than those usually reported in Brazil. Studies on the HPV prevalence are generally concentrated in the more developed regions in the country (south and southeast), ranging from 10.4 to 24.5% in asymptomatic (non-indigenous) women [34–36]. Two studies were performed in Amazon regions. Rocha et al.[37] conducted a population-based study evaluating non-indigenous women of the Amazonian region of Brazil (rural and urban area). They used a Sanger-based sequencing of HPV-DNA, and the prevalence of HPV was 29.1%, considered high by the authors. Similarly to our study, 97% of cytologies were normal. Castro et al. [38] also assessed the HPV prevalence in urban women from the central Amazon region (Brazil). Also using Sanger-based sequencing, they found a HPV prevalence of 25% among asymptomatic women seeking the preventive service, lower than in our study. However it is remarkable that in these studies evaluating urban women of Amazonia, the absolute prevalence of HPV16 was substantially higher than in the indigenous women. Rocha et al.[37] described that almost 60% of HPVs detected were HPV16 (58.1%), an absolute HPV16 prevalence of 16.8%, while Castro et al.[38] reported an absolute HPV16 prevalence of 14.8%. In the

Figure 1: Map of the northern Amazonian region of Brazil. Geographical demarcation of the Eastern and Yanomami Indigenous Districts, Brazil, 2014. Location of the randomly selected villages, in order of visit. Yanomami District: 1-Auaris; 2-Maturacá; 3-Marari; 4-Ericó; 5-Surucucu; 6-Demini; 7-Palimi-ú; 8-Alto Mucajaí. Eastern District: A-Malacacheta; B-Camará; C- Vista Alegre; D-Pium; E-Boqueirão.

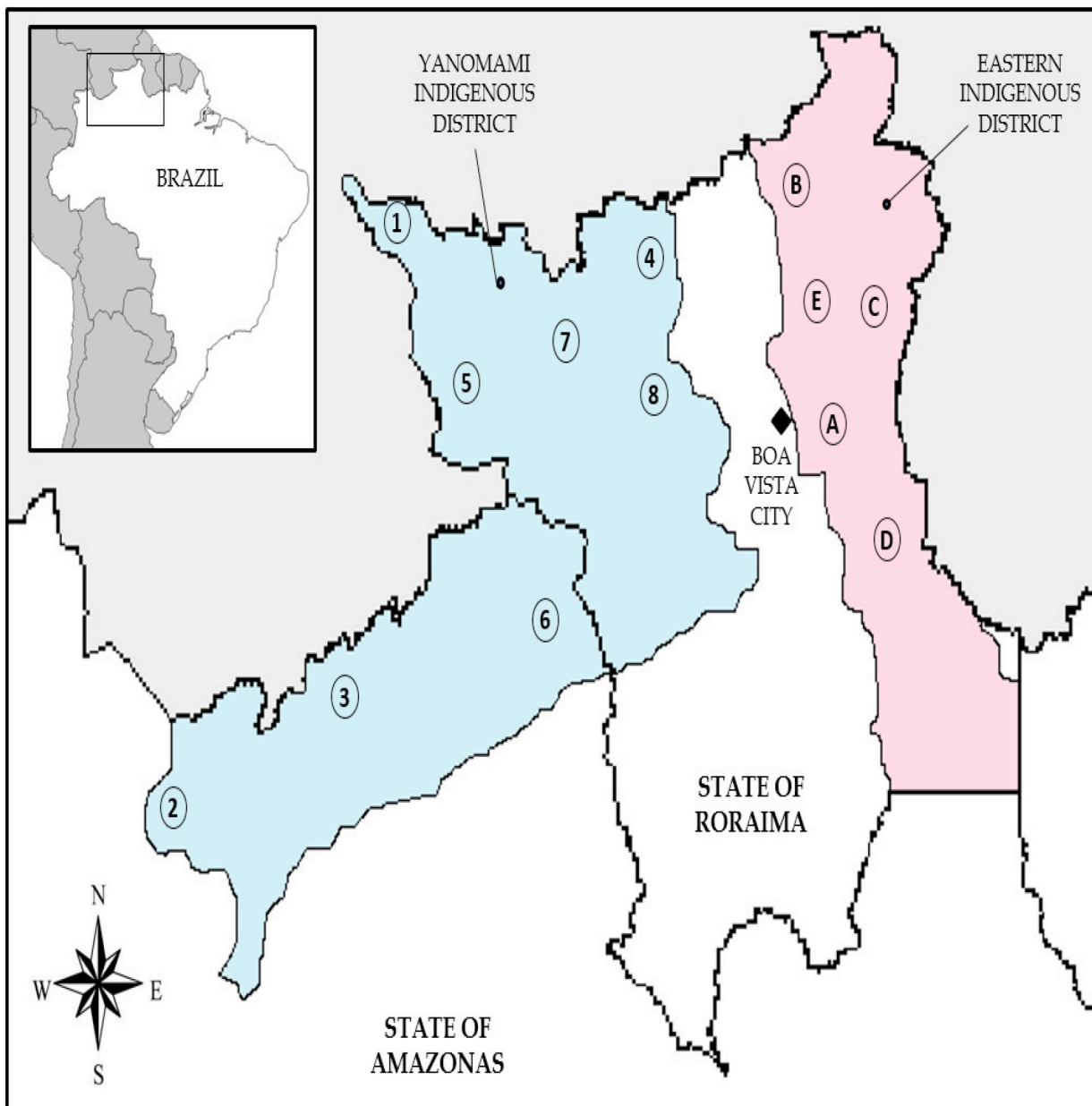


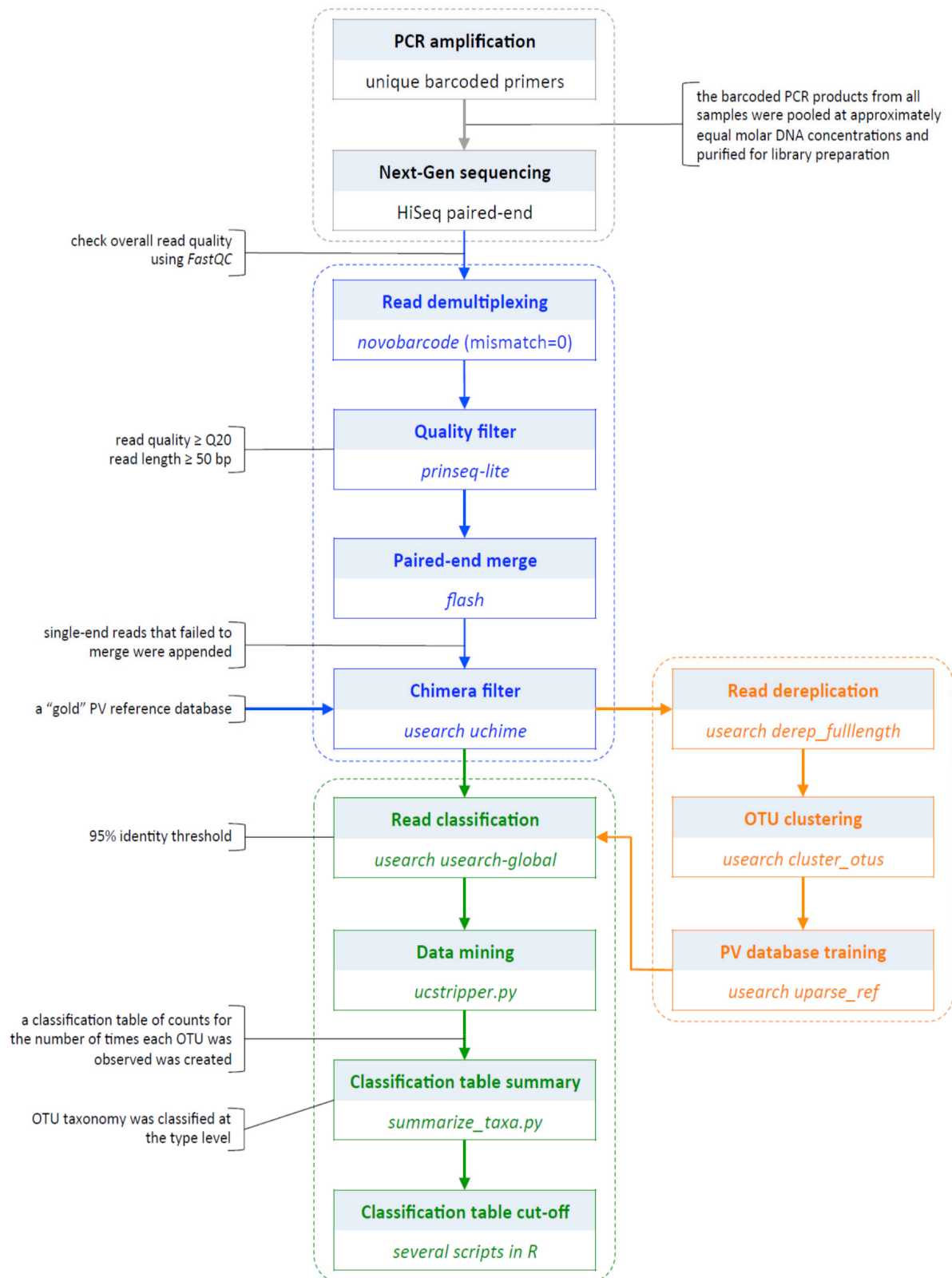
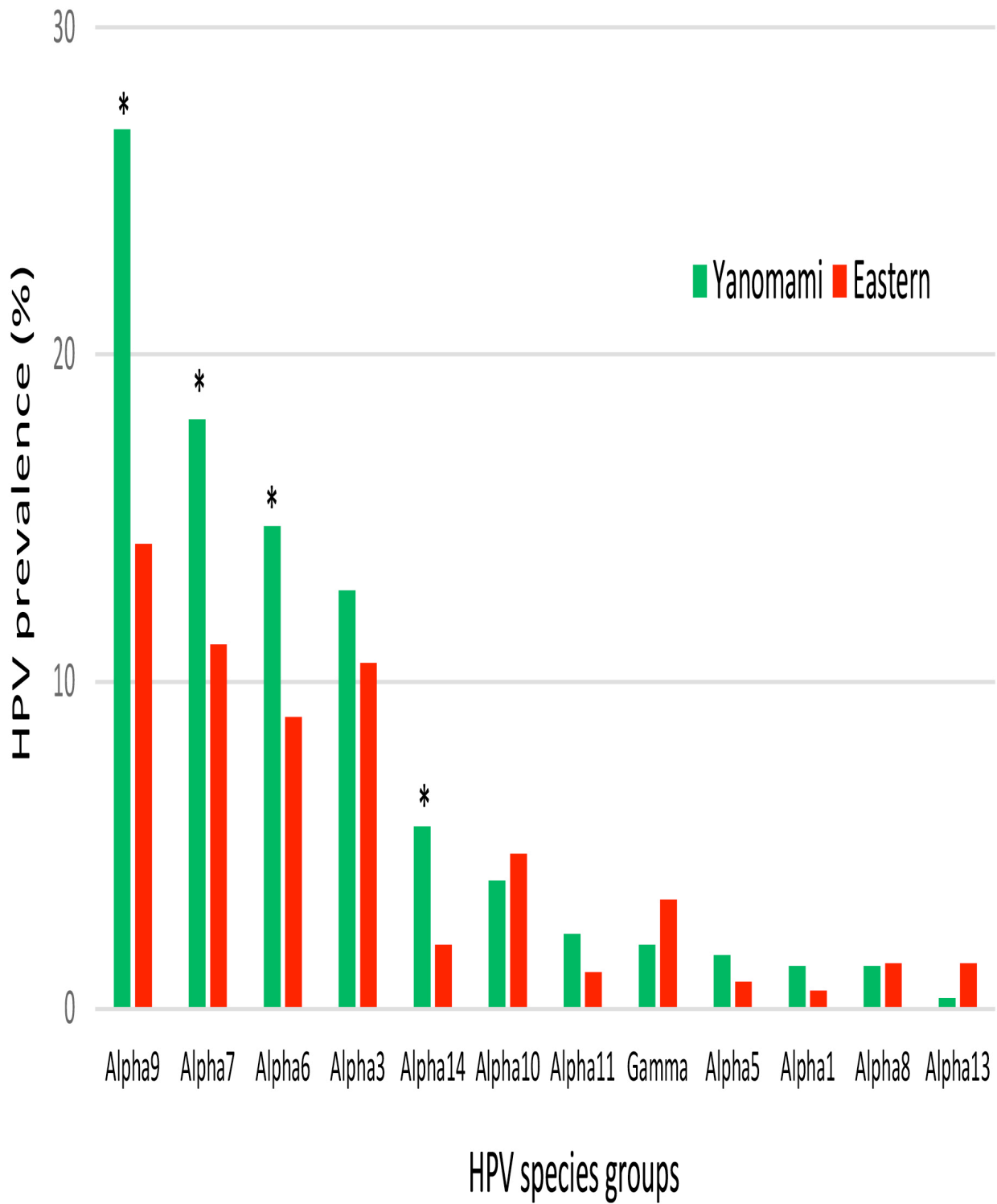
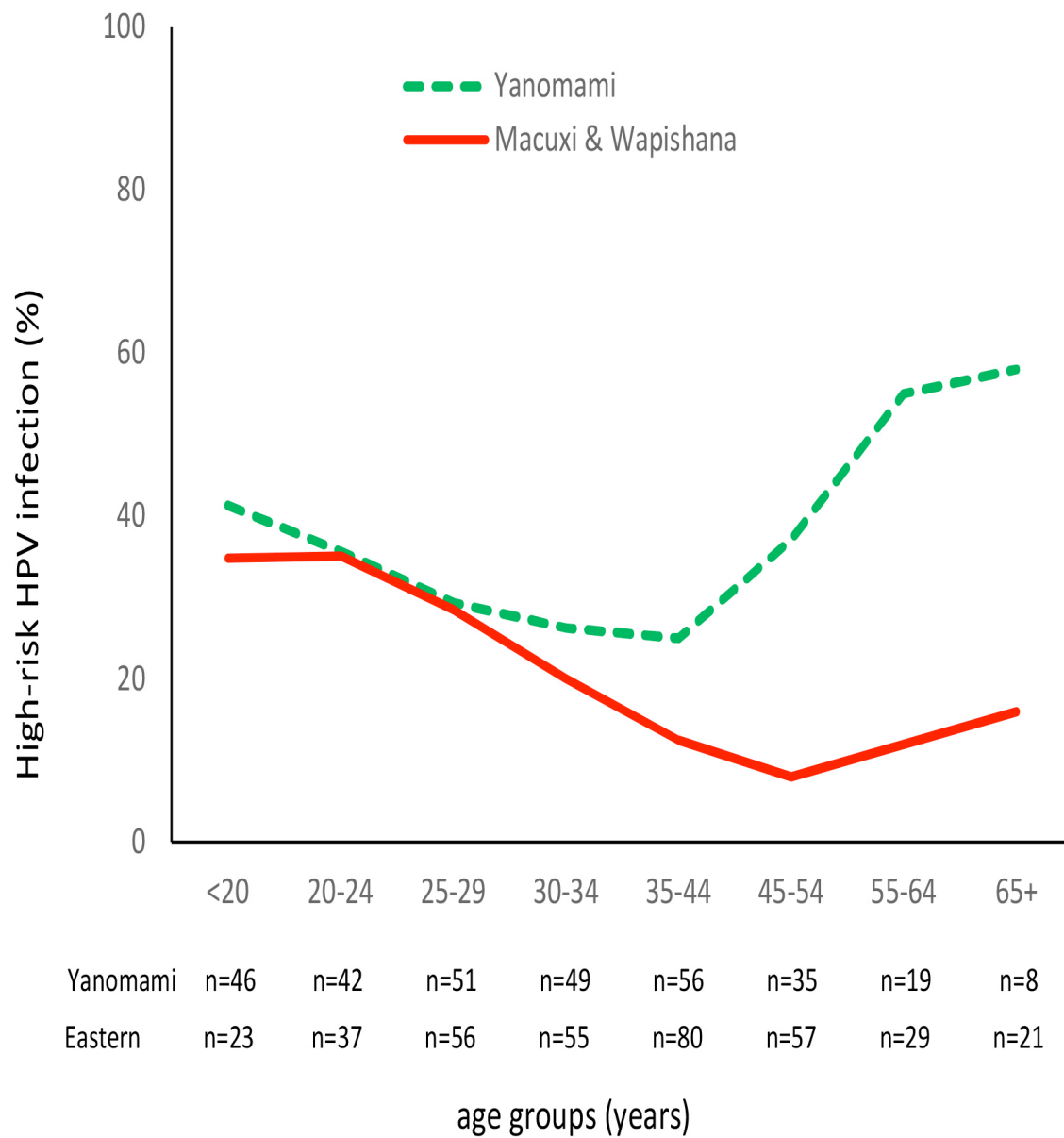
Figure 2: Detailed workflow of bioinformatics pipeline and taxonomic classification of HPV.

Figure 3: HPV prevalence by HPV species groups.



*significant difference of prevalence of HPV between ethnic groups ($p < 0.05$).

Figure 4: Prevalence of high-risk HPV by age group.



Supplementary data

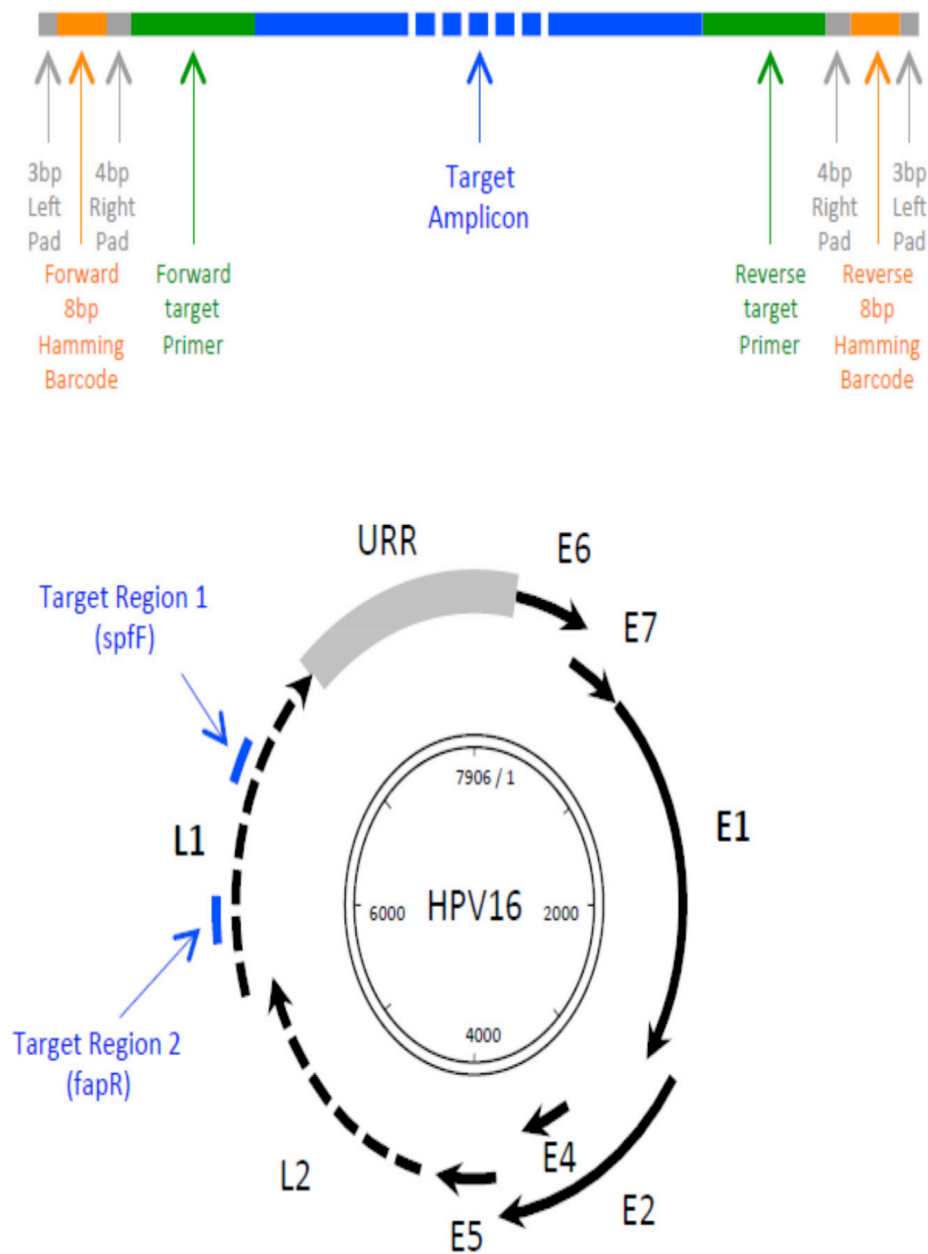


Figure: Primer desing for PCR amplification of HPV-DNA and next generation sequencing.