

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA**

ISABELA OLIVEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E INTRACELULARES CERVICAIS DE
FOLATO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO HPV E AS
ALTERAÇÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA CÉRVICE UTERINA**

Ouro Preto
2019

ISABELA OLIVEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E INTRACELULARES CERVICAIS DE
FOLATO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO HPV E AS
ALTERAÇÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA CÉRVICE UTERINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia pela Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Alves Lima
Co-orientadora: MSc. Nayara Nascimento Toledo Silva

Ouro Preto
2019

S237a

Santos, Isabela Oliveira dos.

Avaliação dos níveis séricos e intracelulares cervicais de folato e sua associação com a infecção pelo HPV e as alterações pré-neoplásicas na cérvix uterina [manuscrito] / Isabela Oliveira dos Santos. - 2019.

50f.: il.: color; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angélica Alves Lima.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Papilomavírus. 2. Colo uterino - Câncer. I. Lima, Angélica Alves. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 618.146

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

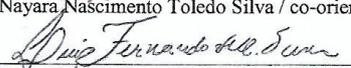
Escola de Farmácia

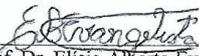


ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 456ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 11 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 14 horas, no Bloco de Sala de Aulas da UFOP, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Isabela Oliveira dos Santos**, matrícula **15.1.2056**, intitulada **“Avaliação dos níveis séricos e intracelulares de folato e sua associação com a infecção pelo HPV e as alterações pré-neoplásicas na cérvix uterina”**. A Banca Examinadora foi constituída pelo Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista (UFOP), pelo Prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros Teixeira (UFOP), pela co-orientadora MSc. Nayara Nascimento Toledo Silva (UFOP) e pela orientadora Profa. Dra. Angélica Alves Lima (UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 9,0. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 11 de julho de 2019.


Profa. Dra. Angélica Alves Lima / orientadora


MSc. Nayara Nascimento Toledo Silva / co-orientadora


Prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros Teixeira


Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista


Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

A Deus, essa força maior do universo, por sempre operar em meu favor.

Aos meus pais, Delmiro e Josie, por todo o amor e apoio incondicionais durante essa jornada. Aos meus irmãos, André, Stephane e João Lucas, pela amizade. Sem vocês não seria possível!

Às minhas queridas avós, Dalva e Diva, por serem meus exemplos de vida.

À profa. Dra. Angélica Alves Lima, minha orientadora, e à MSc. Nayara Nascimento Toledo Silva, minha co-orientadora, pela paciência, oportunidade e pela disponibilidade de me ensinarem tanto ao longo deste tempo.

Ao prof. Dr. José Mário Barichello, por me apresentar o curso de Farmácia.

À MSc. Ana Carolina da Silva Santos pela amizade, ensinamentos e confiança durante a graduação.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAPAC), pela realização das análises citológicas e bioquímicas.

Às equipes dos PSFs de Ouro Preto, Centro Estadual de Atenção Especializada de Itabirito, Hospital Maternidade Odete Valadares e Hospital da Baleia, essenciais para que este projeto fosse desenvolvido.

Às mulheres que aceitaram participar deste projeto, sem as quais esse trabalho não existiria. Obrigada pela confiança!

Aos meus amigos e familiares que tanto me apoiaram! Em especial, meus amigos do IFMG e da Escola de Farmácia de Ouro Preto. Muito obrigada por tudo!

Ao PET Farmácia por todos os ensinamentos.

Ao CNPq, FAPEMIG, PROEX UFOP, pelo financiamento e apoio.

RESUMO

O Câncer do Colo Útero (CCU) é uma das neoplasias mais frequentes entre as mulheres e a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico é necessária, mas não suficiente para o seu desenvolvimento. Apesar de estudos terem avaliado a associação do folato com o CCU, os resultados ainda não estão bem estabelecidos. Na maioria destes trabalhos foi avaliado o folato sérico e pouco se conhece sobre a relação entre os níveis de folato intracelular cervical e a presença da infecção pelo HPV e alterações pré-neoplásicas na cérvix uterina. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação dos níveis séricos e intracelulares cervicais de folato com a infecção pelo HPV e com as lesões cervicais. Foram selecionadas 177 mulheres, divididas em dois grupos: Controle (n=120), composto por mulheres com citologia normal, e Casos (n=57), dividido em mulheres apresentando Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASC-US) (n=21), Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) (n=16) e Lesão Cervical de Alto Grau (n=20), sendo esse constituído por mulheres apresentando Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) ou Células Escamosas Atípicas onde não se pode excluir lesão de alto grau (ASC-H). A detecção e a genotipagem do HPV foram realizadas por PCR-RFLP e as concentrações séricas e intracelulares cervicais de folato foram determinadas por imunoluminescência. O valor mediano de folato sérico entre as participantes foi de 11,9 ng/mL, variando de 4,0 a 42,6 ng/mL. Por outro lado, a mediana de folato intracelular cervical foi 2,5 ng/mg (0,4–26,6 ng/mg). As concentrações séricas e intracelulares cervicais de folato não diferiram entre as participantes apresentando ou não infecção pelo HPV (p=0,344 e p=0,502, respectivamente). Mulheres com alterações citopatológicas de alto grau (HSIL+ASC-H) apresentaram menores concentrações do micronutriente, sérico (10,8 ng/mL) ou intracelular cervical (2,0 ng/mg), se comparado aos demais grupos (controle, ASC-US e LSIL), embora esta diferença não tenha sido significativa (Folato sérico: p=0,610; Folato intracelular cervical: p=0,817). Assim, não foi observada associação dos níveis séricos e intracelulares cervicais de folato com a infecção pelo HPV ou lesões cervicais.

Palavras-chave: HPV; lesões pré-neoplásicas da cérvix uterina; câncer cervical; folato intracelular cervical; folato sérico.

ABSTRACT

Uterine Cervical Cancer (UCC) is one of the most common neoplasia among women and persistent high-risk Human Papillomavirus (HPV) infection is necessary, but not sufficient for its development. Although studies have evaluated the association of folate with UCC, the results are not still well established. In majority of these studies serum folate was analyzed and little is known about the relationship between cervical cellular folate levels and presence of HPV infection and pre-neoplastic abnormalities in uterine cervix. Therefore, the objective of this study was to evaluate the association of serum and cellular cervical folate levels with HPV infection and cervical lesions. 177 women were selected and divided into two groups: Control (n=120), with women presenting normal cytology, and Cases (n=57), that was composed by women presenting Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US) (n=21), Intraepithelial Lesion (LSIL) (n=16) and High-grade lesions (n=20), with women presenting High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) or Atypical Squamous Cells where high grade lesion cannot be excluded (ASC-H). HPV detection and genotyping were performed by PCR-RFLP, and cervical serum and intracellular folate concentrations were determined by immunochemiluminescence. The median serum folate among participants was 11.9 ng/mL, ranging from 4.0 to 42.6 ng/mL. On the other hand, median intracellular cervical folate was 2.5 ng/mg (0.4–26.6 ng/mg). Serum and intracellular folate concentrations did not differ among participants with or without HPV infection ($p=0,344$ e $p=0,502$, respectively). Participants with high-grade cervical lesions (HSIL+ASC-H) presented lower concentrations of serum folate (10.8 ng/mL) or cervical cell folate (2.0 ng/mg), if compared to other groups (Control, ASC-US or LSIL), although this difference was not significant (serum folate: $p=0.610$, cervical cellular folate: $p=0.817$). Therefore, there was no association of serum and cervical cell folate concentrations with HPV infection or pre-neoplastic lesions in uterine cervix.

Keywords: HPV; uterine cervix pre-neoplastic lesions; cervical cancer; intracellular cervical folate; serum folate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Genoma do HPV.....	14
Figura 2 –	Representação esquemática da progressão das lesões escamosas intraepiteliais.....	17
Figura 3 –	Metabolismo do folato.....	20
Figura 4 –	Etapas da detecção do HPV.....	25
Figura 5 –	Correlação entre folato intracelular cervical (ng/mg) e folato sérico (ng/mL).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos tipos de HPV de acordo com o risco oncogênico.....	16
Tabela 2 – Características sociodemográficas e comportamentais das participantes.....	28
Tabela 3 – Concentração sérica e intracelular cervical de folato.....	29
Tabela 4 – Concentração sérica e intracelular cervical de folato de acordo com a infecção por HPV.....	31
Tabela 5 – Concentração sérica e intracelular cervical de folato de acordo com a presença de alterações citopatológicas pré-neoplásicas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC-H	<i>Atypical Squamous Cells cannot exclude High-grade Squamous Intraepithelial Lesions</i> (Células escamosas atípicas em que não se pode excluir lesão de alto grau)
ASC-US	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
CBS	Cistationina β -sintase
CCU	Câncer do Colo do Útero
CCR	Câncer Colorretal
CEAE	Centro Estadual de Atenção Especializada
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DHF	Dihidrofolato
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeo trifosfato)
dTMP	<i>Deoxythymidine Monophosphate</i> (Desoxitimidina monofosfato)
dUMP	<i>Deoxyuridine Monophosphate</i> (Desoxiuridina monofosfato)
E	<i>Early</i> (Genes Virais Expressos na Fase Precoce)
GNMT	Glicina N-metiltransferase
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
HSIL	<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial de Alto Grau)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	<i>Late</i> (Genes Virais Expressos na Fase Tardia)
LAPAC	Laboratório de Análises Clínicas
LSIL	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Região Regulatória)
MS	Metionina Sintase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolatoredutase
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Faixa de leitura aberta)
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pRB	Proteína do retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RBC	<i>Red Blood Cells</i> (Células Eritrocitárias)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Digestão enzimática)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
rpm	Rotações por minuto
SAdoHci	S-adenosilhomocisteína
SAdoMet	S-adenosilmetionina
SHMT	Serina Hidroximetiltransferase
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
THF	Tetrahidrofolato
TS	Timidilato Sintase
UBS	Unidades Básicas de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	GERAL.....	12
2.2	ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	HPV.....	13
3.1.1	Estrutura.....	14
3.1.2	Classificação.....	15
3.1.3	Transmissão.....	16
3.1.4	Associação da Infecção por HPV com o Câncer Cervical.....	17
3.2	COFATORES.....	19
3.2.1	Folato.....	19
4	MÉTODOS	22
4.1	SELEÇÃO DAS PACIENTES.....	22
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	22
4.2.1	Amostras Cervicais.....	22
4.2.2	Amostras Sanguíneas.....	23
4.3	PESQUISA DO HPV.....	23
4.3.1	Extração de DNA.....	23
4.3.2	Avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído.....	24
4.3.3	Deteção do HPV.....	24
4.3.4	Genotipagem de HPV.....	26
4.4	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FOLATO.....	26
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXOS	42

1) INTRODUÇÃO

O folato, vitamina hidrossolúvel do complexo B, atua na manutenção da estabilidade genômica, ao fazer parte do metabolismo de nucleotídeos através da síntese de purinas e timidilato, e da metilação do DNA (CHOI; MASON, 2000). A deficiência desta vitamina compromete a integridade do DNA através da alteração da biossíntese e reparo do material genético. A carência de folato também altera a expressão gênica, levando a ativação de proto-oncogenes e repressão de genes supressores tumorais. Esses mecanismos seriam responsáveis por favorecer a carcinogênese, relacionando o folato à malignidade tecidual (DUTHIE, 2011). Estudos demonstraram que os níveis de folato têm sido relacionados a diversos tipos de tumores, incluindo câncer de mama, ovário, pâncreas, cérebro e pulmão. No entanto, não há consenso sobre a associação do folato com o câncer cervical (FOWLER et al., 1998; DUTHIE, 2011; LOPES et al. 2017).

A infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico é um fator crucial, mas não único, para o desenvolvimento do câncer do colo do útero (CCU ou câncer cervical). Cofatores endógenos e exógenos estão associados a esta neoplasia, tais como o tabagismo, idade, consumo de bebidas alcoólicas, uso de anticoncepcionais hormonais, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, multiparidade, imunocompetência e fatores nutricionais (FLATLEY et al., 2014). Em relação ao folato, a depleção desse micronutriente pode facilitar a integração do DNA do HPV de alto risco oncogênico no genoma do hospedeiro, propiciando a persistência viral. De forma que a deficiência de folato poderia influenciar e modular os eventos que levariam à carcinogênese induzida pelo HPV (XIAOU et al., 2018).

Diversos estudos avaliaram a associação entre os níveis de folato e a carcinogênese cervical. No entanto, os resultados observados ainda são controversos e inconclusivos. Além disso, a maioria destes considerou apenas a concentração sérica de folato, ao passo que apenas dois trabalhos relacionaram os níveis intracelulares cervicais de folato (FOWLER et al., 1998; HERNANDEZ et al., 2003; SANJOAQUIN et al., 2005; FLATLEY et al., 2009; FLATLEY et al., 2014). Desta forma, compreender melhor o papel dos níveis deste micronutriente nas células do colo uterino pode esclarecer se esta associação existe, representando uma possibilidade de prevenção desta neoplasia.

2) OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis séricos e intracelulares cervicais de folato e a sua associação com a infecção pelo HPV e com as alterações citopatológicas na cérvix uterina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as concentrações séricas e intracelulares cervicais de folato na amostra;

Avaliar a correlação entre folato intracelular cervical e sérico;

Comparar as concentrações de folato entre os grupos apresentando ou não infecção por HPV e alterações citopatológicas.

3) REVISÃO DA LITERATURA

No cenário mundial, as neoplasias que atingem o trato anogenital, incluindo o câncer cervical, são responsáveis por grande parte dos tumores em mulheres (ZUR HAUSEN, 2002).

O CCU é a terceira neoplasia mais frequente na população feminina brasileira, quando excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Cerca de 17 mil novos casos são diagnosticados todos os anos no país, sendo o CCU a quarta causa de morte entre as mulheres no Brasil (INCA, 2018). Embora os dados sejam alarmantes, o conhecimento da população sobre HPV, câncer cervical e vacina contra o HPV ainda é insatisfatório, como mostram estudos realizados com adolescentes, responsáveis, professores e trabalhadores da saúde no Brasil (OSIS; DUARTE; SOUSA, 2014; SANTOS, 2017; ABREU et al., 2018).

O câncer cervical pode ser facilmente tratado quando detectado precocemente. A triagem desta neoplasia se baseia na história natural da doença, e os programas de rastreio tem diminuído a mortalidade por este tipo de câncer entre as mulheres brasileiras, em decorrência da prevenção baseada no rastreamento citológico, através da realização do Exame Preventivo (ou Exame de Papanicolaou) (ALVES; GUERRA; BASTOS, 2009). No Brasil, a recomendação do Ministério da Saúde é que mulheres sexualmente ativas realizem o Exame de Papanicolaou entre 25 e 64 anos de idade (INCA, 2016).

Sabe-se que o desenvolvimento do CCU é lento e que diversos cofatores estão envolvidos, sendo a infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico o principal deles (ZUR HAUSEN, 2002; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

3.1 HPV

A infecção pelo HPV é considerada a doença sexualmente transmissível mais comum no mundo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), aproximadamente 80% das mulheres sexualmente ativas poderão contrair o vírus ao menos uma vez ao longo da vida. Frequentemente, essa infecção se manifesta na forma de lesões benignas, os papilomas (verrugas), de onde o nome do vírus é

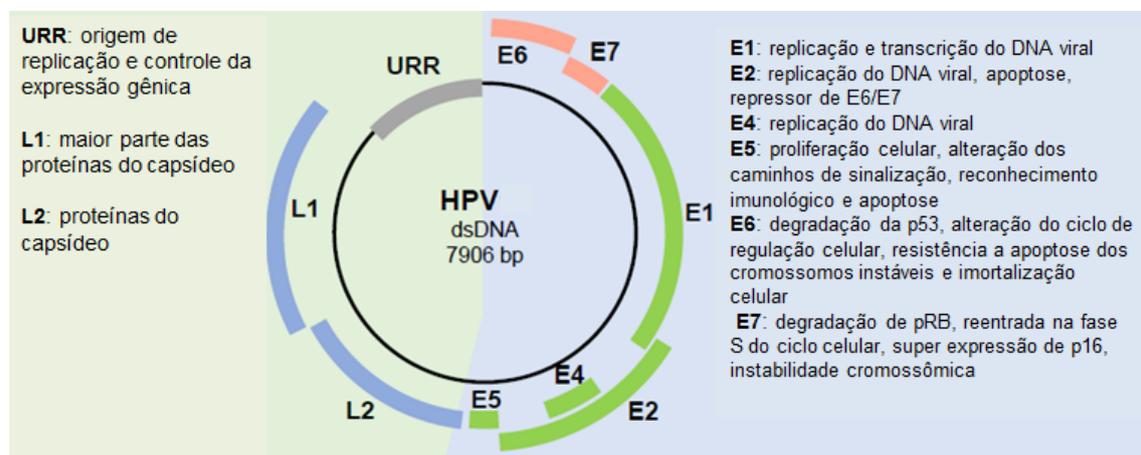
originado. As manifestações clínicas são mais comuns nas mulheres, embora também atinjam os homens (INCA, 2012).

3.1.1. Estrutura

O HPV é um vírus encapsulado e possui aproximadamente 55 nm de diâmetro (DOORBAR; STERLING, 2001). Seu capsídeo é formado por cerca de 72 capsômeros e possui em torno de 2 nm de espessura. Destes, 60 são hexavalentes e 12 pentavalentes (BAKER et al., 1991).

O genoma de DNA é disposto em fita dupla circular com aproximadamente 8000 pares de bases e contendo oito faixas de leitura aberta (ORF) (Figura 1). Na infecção precoce, ocorre a expressão dos genes denominados E (“early”). Por outro lado, na fase tardia são expressos os genes denominados L (“late”) (BERNARD et al., 2010). A Figura 1 mostra a estrutura do HPV e a função das proteínas virais.

Figura 1 - Genoma do HPV e função das proteínas



URR: *Upstream Regulatory Region* (Região regulatória). Fonte: Sanjosé, Brotons e Pavon, 2018 (modificada).

A região expressa precocemente é responsável por codificar as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7. De forma geral, o papel destas proteínas é regular a transcrição e a replicação do vírus, além de controlar o ciclo celular, permitindo que o HPV seja capaz de transformar e imortalizar as células hospedeiras. O papel de E1, E2 e E4 envolve a replicação do DNA viral, além da transcrição (por E1) e apoptose e repressão de E6/E7 por E2 (Figura 1). E5, por sua vez, atua na

proliferação celular, altera as vias de sinalização, é responsável pelo reconhecimento imunológico e pela apoptose celular. E6 age degradando a proteína p53, o que altera o ciclo de regulação celular, levando à imortalização das células. Por outro lado, E7 degrada a proteína do retinoblastoma (pRB), está ligada à super-expressão da proteína p16, instabilidade cromossômica e reentrada na fase S do ciclo celular (DOORBAR, 2017; SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

Os genes L1 e L2 dão origem às proteínas estruturais do capsídeo viral, cuja função é facilitar o empacotamento e a maturação do DNA do vírus (Figura 1). O gene L1 é responsável por codificar maior parte das proteínas que formam os invólucros virais. Por possuir sequências extremamente conservadas entre os HPVs, L1 permitiu a identificação e classificação filogenética dos Papilomavírus (SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

Na região regulatória ou de controle (URR), situada entre as regiões E e L, existem sequências capazes de controlar a transcrição dos genes virais (Figura 1). Nesta mesma região se encontra a origem de replicação (SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

3.1.2 Classificação

Os HPVs pertencem à família *Papillomaviridae* e estão distribuídos em cinco gêneros, *Alpha-Papillomavirus*, *Beta-Papillomavirus*, *Mu-Papillomavirus*, *Nu-Papillomavirus* e *Gamma-Papillomavirus*. Entre os HPVs do mesmo gênero, a semelhança entre a sequência do gene L1 é de pelo menos 60% (DOORBAR, 2017). HPVs apresentando semelhança genômica de 60% a 70% pertencem à mesma família. Por outro lado, pertencem a tipos virais diferentes HPVs com sequência de nucleotídeos L1 com pelo menos 10% de diferença (DE VILLIERS et al., 2004).

Existem mais de 200 tipos de HPV, sendo que cerca de 40 deles são capazes de infectar o trato anogenital de seres humanos. No entanto, a classificação filogenética não está associada às propriedades biológicas virais (SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

O tipo de lesão que se desenvolve está associado ao risco oncogênico do vírus. Os HPVs que foram encontrados majoritariamente nas verrugas genitais e

lesões benignas foram designados como HPV de baixo risco oncogênico (Tabela 1), sendo os tipos 6 e 11 responsáveis por 80% das verrugas genitais. Além disso, os HPVs 1, 2 e 4 causam geralmente verrugas comuns nas mãos e nos pés (DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR et al., 2012).

Por outro lado, os tipos virais encontrados em tumores malignos foram classificados como HPV de alto risco oncogênico, sendo encontrados em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e em carcinomas escamosos de colo do útero (Tabela 1) (CAMARA et al., 2003). Os HPVs 16 e 18 são responsáveis por 20% das infecções, 40% das lesões em células escamosas cervicais de alto grau e 70% dos casos de câncer cervical. Os tipos virais classificados como de provável alto risco são aqueles encontrados com menor frequência nos casos de CCU (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

TABELA 1: Classificação dos tipos de HPV de acordo com o risco oncogênico

Categoria de risco carcinogênico (Classificação IARC)	Tipos de HPV
Alto risco (1A)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Provável alto risco (2A)	68
Possível alto risco (2B)	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, e CP6108

Fonte: MUÑOZ *et al.*, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2006; BOUVARD *et al.*, 2009.

3.1.3. Transmissão

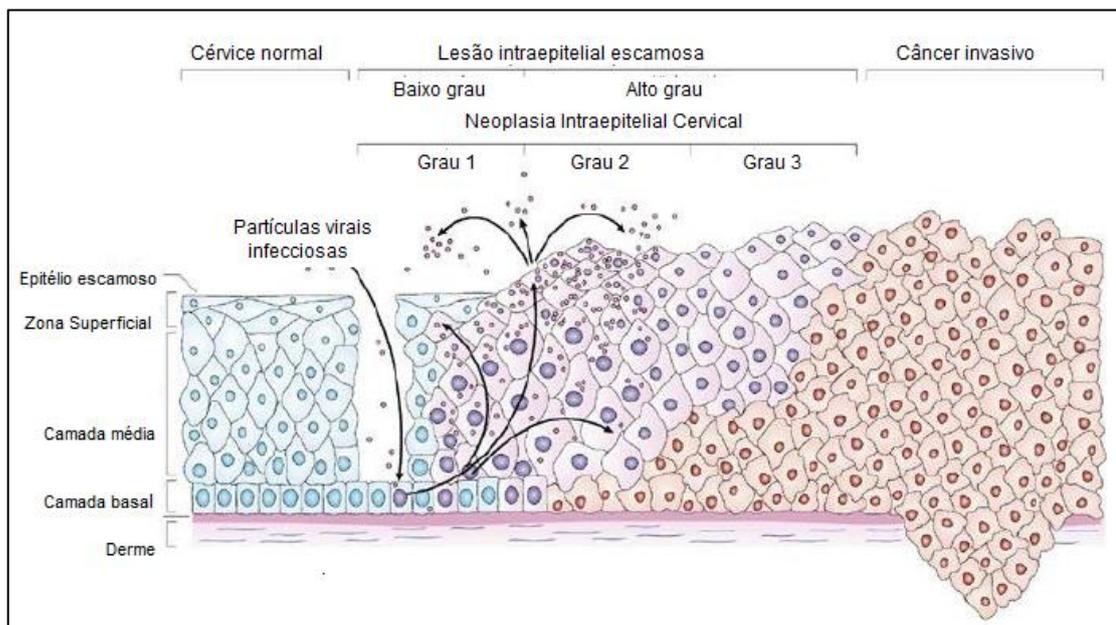
O HPV é transmitido principalmente pela via sexual (contato genital-genital, genital-oral, genital-manual), como identificado há 40 anos. Para que a transmissão ocorra, é necessário um contato direto com a pele ou mucosa infectadas, além de uma microabrasão no epitélio, evento comum durante o ato sexual (ZUR HAUSEN, 2002). É possível contaminar-se com o HPV com uma única exposição (BRASIL, 2017).

Existem ainda outras formas de transmissão mais raras, como a vertical (da mãe para o feto) e a horizontal (através do compartilhamento de objetos, toalhas ou contato com secreções contaminadas) (SYRJÄNEN; PURANEN, 2000).

3.1.4. Associação da infecção por HPV com o câncer cervical

A infecção pelo HPV se inicia quando o vírus infecta as células basais do epitélio escamoso da pele ou mucosas (Figura 2). Estas células são menos diferenciadas, conservando sua atividade mitótica. O HPV tem acesso a essas células, através da interação entre os receptores específicos da superfície celular e as proteínas do capsídeo viral. A infecção ocorre principalmente da Zona de Transformação Cervical, embora todo o trato anogenital possa ser infectado (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

Figura 2 - Representação esquemática da progressão das lesões escamosas intraepiteliais



Fonte: Sanjosé, Brotons e Pavon, 2018 (modificada).

Após infecção, o vírus passa por um período de incubação de duas a três semanas. Em seguida, o sistema imune pode eliminar o HPV naturalmente ou a infecção pode persistir levando ao desenvolvimento de lesões (MAGLENNON; MCINTOSH; DOORBAR, 2011; DOORBAR, 2017).

Inicialmente, o genoma viral pode não se integrar ao do hospedeiro, permanecendo no núcleo da célula na forma episossomal. Durante esse período da infecção, o DNA viral sofre replicação junto ao DNA celular, gerando de vinte a cinquenta cópias por célula. Contudo, em infecções por HPVs de alto risco oncogênico, geralmente observa-se a integração do DNA do vírus ao cromossomo

do hospedeiro, favorecendo a superexpressão dos oncogenes virais E6 e E7 através da ruptura de E2. O processo carcinogênico se inicia com E6 e E7, através da inibição da atividade das proteínas p53 e pRB, respectivamente. Todavia, é necessário também o acúmulo de alterações adicionais no gene do hospedeiro para levar ao carcinoma. A variação genética do vírus, além do genótipo do HPV, poderia explicar em parte as diferenças de persistência e risco de carcinogênese entre as infecções positivas para o mesmo tipo de HPV (DOORBAR; STERLING, 2001; SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

O processo que leva ao CCU é lento, podendo durar anos a partir do momento em que a infecção pelo vírus do HPV é adquirida (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013). Além disso, apenas uma pequena fração das infecções virais persiste e causa lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas (SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

As análises citológicas seguem a Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais (INCA, 2012), baseada no Sistema de Bethesda de 2014 (NAYAR; WILBUR, 2015). Segundo o mesmo, o primeiro sinal de anormalidade cervical seria a presença de Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASC-US) observadas através do Exame de Papanicolaou. Essa alteração, por sua vez, pode progredir para uma Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) que é equivalente às displasias leves propostas por Richard, chamadas de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais de grau 1 (NIC 1). A lesão mais próxima de evoluir para um câncer cervical é a Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) que, por sua vez, corresponde às displasias moderadas a graves (NIC 2 e NIC 3). A gravidade das lesões aumenta à medida que o epitélio estratificado normal é substituído por um epitélio mitoticamente ativo, de forma que há uma maior probabilidade de progredir de forma irreversível para uma neoplasia (Figura 2) (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

3.2. COFATORES

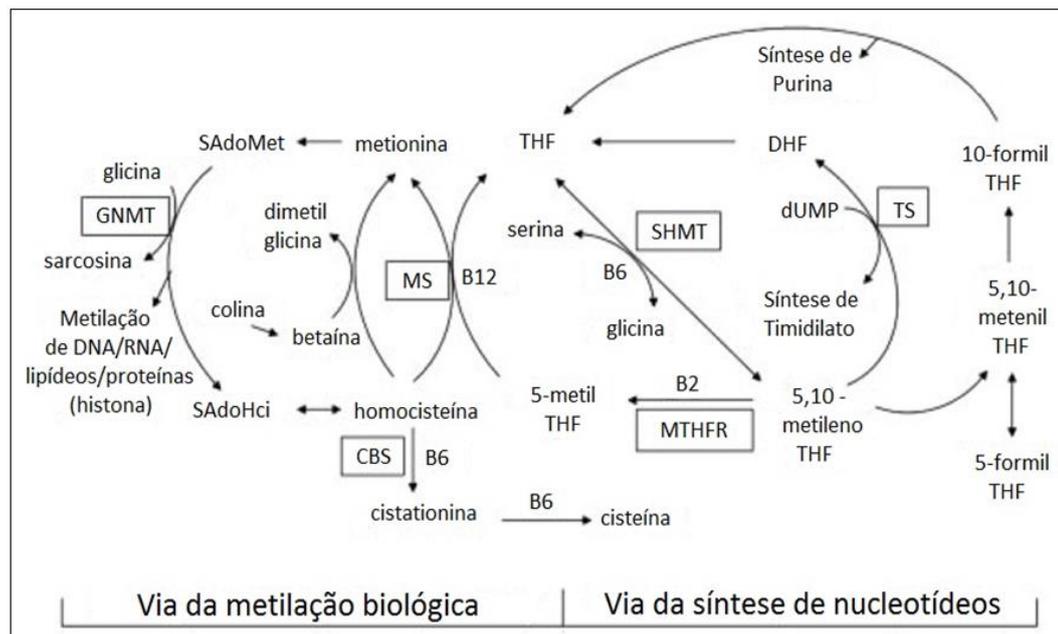
A infecção persistente pelo HPV não é determinante para transformação maligna completa das células do colo uterino. A progressão das lesões até o câncer cervical depende de interações complexas entre o vírus, o hospedeiro e o ambiente (SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2018).

Muitos agentes estão associados à malignidade, de forma a modular a progressão da infecção à neoplasia. Alguns são inerentes ao hospedeiro, tais como a resposta imunológica e a idade. Outros são comportamentais, assim como a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis, tabagismo, início da atividade sexual, número de parceiros sexuais, multiparidade e uso crônico de contraceptivos hormonais. Contudo, fatores genéticos e nutricionais também têm sido investigados, como os níveis de folato (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

3.2.1 Folato

Todas as formas coenzimáticas do folato atuam transferindo unidades de carbono. O folato é convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF) que, por ação enzimática da metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR), se torna 5-metiltetrahidrofolato (Figura 3). Este, por sua vez, é substrato do ciclo da metionina, onde a S-AdenosilMetionina (SAdoMet) é formada. A SAdoMet atua diretamente na metilação do DNA e quando há depleção de folato, observa-se hipometilação global do genoma, com ativação de proto-oncogenes e silenciamento de genes supressores tumorais. Assim, a diminuição dos níveis de SAdoMet é pró-carcinogênica ao alterar a expressão gênica (MILLER et al., 1994; MASON; CHOI, 2000).

Sabe-se que há uma via alternativa para o ciclo da metionina. Esta via não requer folato e é capaz de regenerar a metionina a homocisteína utilizando a betaína. Todavia, a deficiência dietética de folato diminui drasticamente o *pool* da SAdoMet, de forma que a via alternativa é incapaz de suprir a demanda completamente (MILLER et al., 1994).

Figura 3 - Metabolismo do folato

MTHFR: metileno tetra-hidrofolato redutase; CBS: cistationina β -sintase; DHF: dihidrofolato; GNMT: glicina N-metiltransferase; MS: metionina sintase; SAdoHci: S-adenosilhomocisteína; SAdoMet: S-adenosilmetionina; SHMT: serina hidroximetiltransferase; THF: tetra-hidrofolato; TS: timidilato sintase. Fonte: CHOI, MASON, 2000 (modificada).

O folato também atua na síntese de DNA, uma vez que as bases nitrogenadas – timidina, adenosina e guanina – são formadas a partir da conversão de desoxiuridinamonomofosfato (dUMP) em desoxitimidinamonomofosfato (dTMP), mediada pelo 5,10-metilen THF (Figura 3). A produção de nucleotídeos é fundamental para a síntese e reparo do DNA. Na deficiência persistente de folato, há o comprometimento do equilíbrio entre os substratos de purina e pirimidina. A uracila, que não se encontra no DNA em situações normais, pode então ser incorporada à molécula, sendo rapidamente removida pelas enzimas de reparo. Essa remoção gera quebras na fita de DNA, o que favorece transformações malignas (DUTHIE, 2011).

Assim, o folato está envolvido em uma série de reações bioquímicas essenciais para vida, e sua deficiência tem sido implicada no desenvolvimento ou aumento de certos tipos de câncer (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

A alteração da metilação do DNA é um fator epigenético frequente no câncer cervical e a hipometilação global do DNA é um evento que precede a carcinogênese em diversos tecidos (PIYATHILAKE et al., 2010; FOWLER et al., 1998). Embora o papel do folato na estabilidade genômica e na metilação do DNA esteja bem

consolidado, a associação entre os níveis deste nutriente com a infecção pelo HPV e com a história natural do câncer cervical ainda é incerta (FOWLER et al., 1998).

Sabe-se que a deficiência de folato pode reduzir a imunocompetência, uma vez que leva a mudanças megaloblásticas no epitélio cervical (SHIKANY et al., 2004). Consequentemente, a mulher se torna mais susceptível à infecção pelo HPV e também à sua persistência, uma vez que é menor a probabilidade de ocorrer sua eliminação (FLATLEY et al., 2009).

4) MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DAS PACIENTES

Foram selecionadas 177 mulheres com idade entre 18 e 67 anos para este trabalho. Destas, 120 apresentaram citologia normal (Controle). Por outro lado, o grupo de Casos, composto por 57 mulheres, apresentou alterações citopatológicas, dividido em três subgrupos de acordo com o diagnóstico citológico: (1) ASC-US (n=21); (2) LSIL (n=16) e (3) Lesão cervical de alto grau (HSIL e ASC-H) (n=20).

As mulheres foram convidadas a participar do estudo, informadas sobre os objetivos do trabalho, o protocolo e os procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e benefícios da sua participação nesta pesquisa. Aquelas que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) e foram entrevistadas (Anexo B).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), CAAE: 88479718.0.0000.5150 e CAAE: 57187316.7.0000.5150 (Anexo C).

4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Amostras cervicais

A coleta das amostras cervicais foi realizada em maca apropriada, submetendo as pacientes aos procedimentos do Exame Preventivo de câncer do colo do útero (ou Exame Papanicolaou) realizado por enfermeiros e médicos das Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Ouro Preto, do Centro de Atenção Especializada (CEAE) de Itabirito, e do Hospital Maternidade Odete Valadares e Hospital da Baleia, ambos localizados em Belo Horizonte.

Primeiramente, foi introduzido o espéculo de “Collins” no canal vaginal e foi realizada a inspeção do colo do útero da paciente. Em seguida, coleta convencional dupla foi realizada com espátula de Ayre para amostra da ectocérvice e escova cilíndrica (Cytobrush®) para amostra da endocérvice. O material cervical coletado com espátula e escova foi transferido para uma lâmina de vidro, através da

realização de um esfregaço. As lâminas foram identificadas com as iniciais da paciente, data de nascimento e o número de protocolo. O esfregaço foi fixado em álcool 95% e conservado no mesmo até serem submetidos ao procedimento de coloração pelo método de Papanicolaou. A análise citológica das lâminas foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas (LAPAC) da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. O Sistema de Bethesda 2014 foi utilizado como base para produção do relatório citológico (NAYAR; WILBUR, 2015).

Após confecção da lâmina de vidro para análise citológica, a escova utilizada foi colocada em microtubo de 1,5mL, contendo 1,0mL de tampão fosfato-salina (PBS). Os microtubos contendo as amostras foram mantidos sob refrigeração a -20°C para posterior pesquisa de HPV e determinação da concentração de folato intracelular.

4.2.2 Amostras sanguíneas

Foi realizada a coleta sanguínea através de punção venosa, sem o uso de anticoagulante. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C até o processamento, para dosagem de folato.

4.3. PESQUISA DO HPV

4.3.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras cervicais foi utilizado o kit illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit® (GE Healthcare). A amostra foi incubada juntamente com um tampão de lise e Proteinase K por 10 minutos. Após a incubação, transferiu-se a amostra para uma coluna em que as moléculas de DNA se ligam a uma membrana de sílica na presença de uma solução caotrópica. A remoção de contaminantes foi realizada durante a lavagem e secagem, utilizando tampões específicos e centrifugações. O DNA foi então eluído com tampão específico e armazenado a -20°C até o seu processamento. O Anexo D apresenta o protocolo completo da extração de DNA.

4.3.2 Avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído

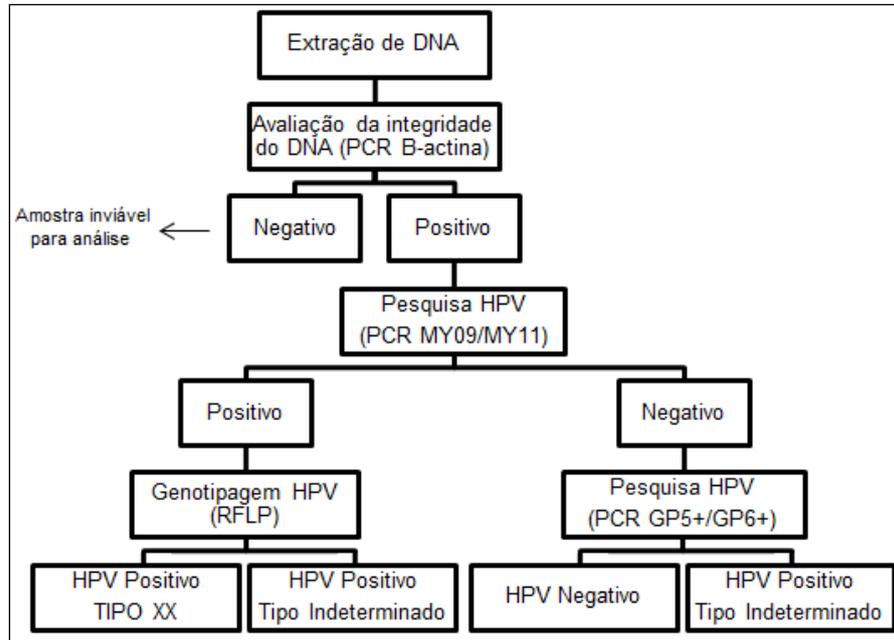
A qualidade e integridade do DNA extraído foram avaliadas através da amplificação do gene *β-actina* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os iniciadores BAF (TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAC) e BAR (TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG). Em cada reação, foram utilizados 12,5μL de PCR Master Mix® (Promega) [0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 1,5mM de MgCl₂ e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase de 25μL], 3,5μL de água ("Nuclease Free-water"), 2,0μL de cada iniciador BAF/BAR (10pmol/μL) e 5μL da solução com o DNA extraído, contendo cerca de 200ng/μL de DNA. O protocolo de reação foi: 95°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 51,5°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram identificados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed® (Biotium). Para aplicação em gel, foram utilizados 5μL do produto amplificado e 1μL de Loading Dye Buffer 6X® (Fermentas) (0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficol tipo 400).

A amplificação de fragmentos de 350pb, correspondentes ao gene *β-actina*, indicou as amostras viáveis para pesquisa de HPV (Figura 4).

4.3.3 Detecção do HPV

A pesquisa de HPV foi realizada pela amplificação do DNA viral através da técnica da PCR utilizando MY09 (CGTCCCAGGGGATACTGATC) e MY11 (GCCCAGGGTCATAATAATGG). Os reagentes utilizados foram 12,5μL de PCR Master Mix® (Promega), 0,5μL de água ("Nuclease Free-water"), 1,0μL de cada iniciador MY09/MY11 (10pmol/μL) e 10μL da solução com o DNA extraído, contendo cerca de 200ng/μL de DNA. O protocolo de reação foi padronizado: 95°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 51,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Figura 4 - Etapas da detecção do HPV

Os produtos de amplificação para os iniciadores MY09/MY11 foram identificados da mesma maneira que para os iniciadores BAF/BAR.

Foram consideradas positivas para a presença do HPV, as amostras em que amplificação de fragmentos de 450pb correspondentes ao gene L1 do vírus foram observados.

As amostras em que a infecção viral não foi detectada com os iniciadores MY09/MY11 foram analisadas utilizando os iniciadores GP5+ (TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC) e GP6+ (GAAAATAAACTGTAAATCATATTC) pelo método da PCR, como mostra a Figura 4. Em cada reação, foram necessários 6,25µL de PCR Master Mix® (Promega), 0,5µL dos iniciadores GP5+ e GP6+, 0,25µL de água (“Nuclease Free-water”) e 5µL da amostra de DNA.

O protocolo de reação foi padronizado: 95°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 40 ciclos a 45°C por 1 minuto, 40 ciclos a 72°C por 45 segundos, extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação para os iniciadores GP5+/GP6+ também foram identificados da mesma maneira que para os iniciadores BAF/BAR.

Foram consideradas positivas para a presença do HPV, as amostras em que amplificação de fragmentos de 110pb correspondentes ao gene L1 do vírus foram observados.

4.3.4 Genotipagem de HPV

Uma vez detectado o vírus do HPV através da técnica da PCR utilizando os iniciadores MY09 e MY11, foi possível realizar a genotipagem do vírus por digestão enzimática (RFLP) do fragmento viral do DNA do vírus, utilizando as enzimas de ação rápida *Bam HI*® (Thermo Scientific), *Dde I*® (Thermo Scientific), *Hae III*® (Thermo Scientific) e *Hinf I*® (Thermo Scientific) (Figura 4).

A digestão foi realizada com 1µL cada uma das enzimas, além de 2µL do tampão FastDigest Green Buffer 10X®, 17µL de água (“Nuclease Free-water”) e 10µL de amostra de DNA amplificado. Cada amostra foi incubada com as quatro enzimas de restrição, separadamente. A incubação foi realizada no Termociclador NYX Technik® com duração de 5 minutos.

Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed® (Biotium). Para aplicação em gel, foram utilizados 10 µL na reação para cada enzima e “Loading Dye Buffer 6X” Fermentas®.

Os resultados foram interpretados segundo Kaneshima e colaboradores (2001).

4.4 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FOLATO

As dosagens de folato sérico foram realizadas no equipamento Access 2® (Beckman Coulter), que utiliza a técnica de imunoquimioluminescência. Neste trabalho, foi considerado o valor de referência de folato como $\geq 5,9$ ng/mL (Beckman Coulter).

Para dosagem do folato intracelular cervical, as amostras da endocérvice previamente coletadas e armazenadas a -20°C em PBS foram incubadas a 90°C para lise celular. Posteriormente, estas amostras foram homogeneizadas vigorosamente no agitador e centrifugadas a 9.000 rpm durante 3 minutos. Após a centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram utilizados para a dosagem de proteínas e folato intracelular (FLATLEY et al., 2014). A dosagem de folato foi

realizada no equipamento Access 2® (Beckman Coulter), da mesma forma que a dosagem sérica do micronutriente.

Por outro lado, a dosagem de proteínas foi realizada com o conjunto diagnóstico Bioprot LCR/U® (Bioclin), pelo método colorimétrico (Vermelho de Pirogalol), no equipamento CM200® (Wiener). Uma vez que as quantidades de amostra obtidas pelas raspagens utilizando a escova cilíndrica não são padronizadas, foi necessário calcular os níveis intracelulares de folato em relação à quantidade de proteínas, através da seguinte fórmula:

$$\text{Folato (ng/mg)} = \text{folato (ng/mL)} / \text{proteínas totais (mg/dL)} * 100$$

As concentrações de folato intracelular cervical foram expressas em ng/mg de proteína.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows versão 17.

A avaliação da normalidade das concentrações de folato foi avaliada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Estatística descritiva foi realizada para análise das concentrações de folato, infecção pelo HPV e atipias celulares na população de estudo. Teste de X^2 , Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparação das concentrações de folato entre os grupos. A avaliação da correlação entre as concentrações séricas e intracelulares cervicais de folato foi realizada através da Correlação de Spearman (r_s). Esta correlação é indicada pelo coeficiente r_s , que pode variar de -1 a 1. Quanto mais próximo o valor de estiver de 1, maior a correlação positivas entre os dois conjuntos. Por outro lado, quanto mais o valor se aproxima de -1, maior a correlação negativa, ou seja, os dois grupos são inversamente proporcionais. A proximidade de r_s de zero sugere que os dois conjuntos não estão correlacionados (STEVENSON, 2001).

Valores de $p < 0,05$ foram considerados como evidência de associação estatisticamente significativa em todos os testes.

5) RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta as características sociodemográficas e comportamentais das mulheres participantes deste estudo. A maioria tinha 40 anos ou mais de idade (55,9%, n=99) e residia em zona urbana (86,4%, n=153). Em relação aos fatores comportamentais, maior parte era casada ou possuía parceiro fixo (81,3%, n=144), teve três ou mais parceiros sexuais (53,7%, n=95), não fazia uso de contraceptivos hormonais (62,7%, n=111), e teve duas gestações (28,8%, n=51). Além disso, 46,9% (n=83) possuía ensino médio, 86,4% (n=153) não era tabagista e 59,3% (n=105) consumia bebidas alcóolicas regularmente.

Não foram observadas diferenças significativas entre as características sociodemográficas e comportamentais das participantes nos grupos de casos e controle ($p > 0,05$) (Tabela 2).

TABELA 2: Características sociodemográficas e comportamentais da amostra

Características	Total n	Controle n (%)	Casos n (%)	p
Idade (anos)				
≤40	99	63 (52,5)	36 (63,2)	0,241
>40	78	57 (47,5)	21 (36,8)	
Zona				
Urbana	153	101 (84,2)	52 (91,2)	0,295
Rural	24	19 (15,8)	5 (8,8)	
Renda familiar per-capita (salários mínimo*/mês)¹				
<1	130	85 (73,3)	45 (81,8)	0,182
1 a 1,9	35	25 (21,6)	10 (18,2)	
≥2	6	6 (5,2)	0 (0)	
Estado civil				
Casada/Parceiro fixo	144	96 (80,0)	48 (84,2)	0,798
Solteira	22	16 (13,3)	6 (10,5)	
Viúva/Divorciada	11	8 (6,7)	3 (5,3)	
Idade da primeira relação sexual (anos)²				
≥18	93	62	31	0,810
<18	82	57	25	
Nº de parceiros sexuais				
1	55	43 (35,8)	12 (21,1)	0,139
2	27	17 (14,2)	10 (17,5)	
≥3	95	60 (50,0)	35 (61,4)	

TABELA 2: Continuação

Características	Total n	Controle n (%)	Casos n (%)	p
Uso de contraceptivos hormonais				
Não	111	79 (65,8)	32 (56,1)	0,280
Sim	66	41 (34,2)	25 (43,9)	
Gestações³				
0	28	17 (14,5)	11 (19,3)	0,592
1	34	23 (19,7)	11 (19,3)	
2	51	33 (28,2)	18 (31,6)	
3	28	18 (15,4)	10 (17,5)	
≥4	33	26 (22,2)	7 (12,3)	
Escolaridade				
Nível Superior	13	11 (9,2)	2 (3,5)	0,310
Ensino Médio	83	53 (44,2)	30 (52,6)	
Ensino Fundamental/Analfabeta	81	56 (46,7)	25 (43,9)	
Tabagista				
Não	153	107 (89,2)	46 (80,7)	0,193
Sim ⁴	24	13 (10,8)	11 (19,3)	
Etilista				
Não	72	50 (41,7)	22 (38,6)	0,822
Sim ⁴	105	70 (58,3)	35 (61,4)	

Participantes excluídas devido à ausência de dados: ¹Seis; ²Duas; ³Três. ⁴Quantidade e frequência não determinadas. *O valor do salário mínimo vigente é de R\$ 998,00.

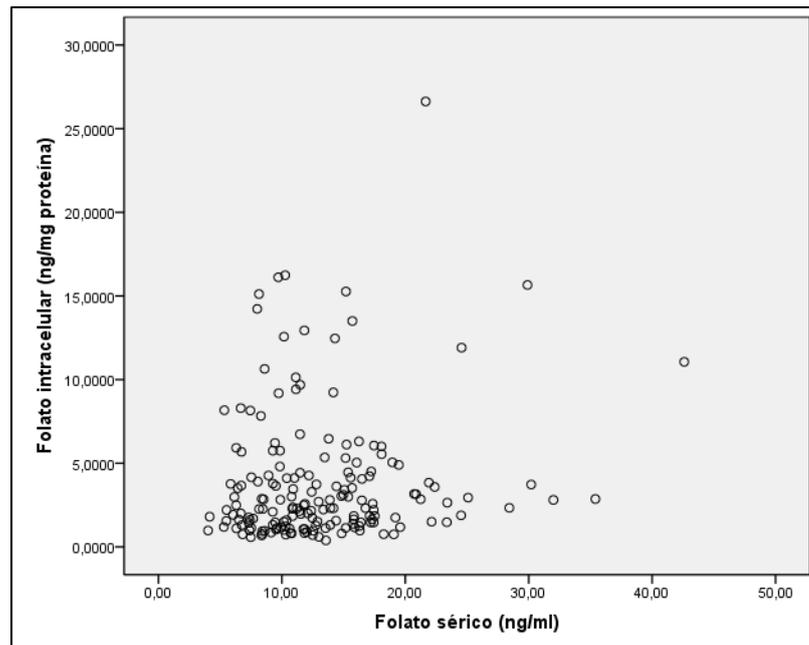
O valor mediano de folato sérico entre as participantes foi de 11,9 ng/mL, variando de 4,0 a 42,6 ng/mL. Por outro lado, a mediana dos níveis de folato intracelular cervical foi 2,5 ng/mg, e os valores mínimo e máximo foram 0,4 e 26,6 ng/mg, respectivamente (Tabela 3). Não foi encontrada correlação entre as concentrações sérica e celular cervical de folato ($r_s = 0,111$; Tabela 3; Figura 5).

TABELA 3: Concentração sérica e intracelular cervical de folato

Folato	Q1; Mediana; Q3	Min-Max	Média±DP	Correlação (r_s)
Sérico (ng/mL)	9,2; 11,9; 16,0	4,0-42,6	13,2±6,0	0,111
Intracelular cervical (ng/mg)	1,5; 2,5; 4,4	0,4-26,6	3,8±4,0	

Q1: Primeiro quartil; Q3: Terceiro quartil; Min: Mínimo; Max: Máximo; DP: Desvio Padrão.

Figura 5 - Correlação entre folato intracelular (ng/mg) e folato sérico (ng/ml)



A infecção por HPV estava presente em 64 mulheres (36,2%), sendo que a maioria apresentou infecção por tipos virais de alto risco oncogênico: HPV 16 (25,0%, n=13), HPV 18 (7,8%, n=5), HPV 33 (7,8%, n=5), HPV 31 (1,9%, n=1), e HPV 52 (1,9%, n=1). Não foi possível definir o tipo de HPV em 53,0% das amostras positivas (n=34).

O valor mediano de folato sérico entre as participantes negativas para a infecção pelo HPV foi de 11,7 ng/mL. Já a mediana para as mulheres positivas para a infecção foi similar (12,4 ng/mL) (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos para os níveis de folato intracelular cervical: a mediana foi de 2,6 ng/mg para as participantes HPV negativas e de 2,3 ng/mL para as HPV positivas. Não foi encontrada diferença significativa das concentrações séricas ($p=0,344$) e intracelulares cervicais de folato ($p=0,502$) entre as participantes apresentando ou não infecção pelo HPV (Tabela 4).

Considerando-se apenas as mulheres com infecção por HPV de alto risco oncogênico (n=25), a mediana das concentrações de folato intracelular cervical também foi igual a 2,3 ng/mg, enquanto a concentração mediana de folato sérico foi maior (13,9 ng/mL). No entanto, se comparado às mulheres sem infecção viral, novamente não se observou diferença significativa entre os grupos (dados não apresentados).

TABELA 4: Concentração sérica e intracelular cervical de folato de acordo com a infecção por HPV

Folato Q1; Mediana; Q3 (Min-Max)	HPV		p*
	Negativo (n=113)	Positivo (n=64)	
Sérico (ng/mL)	8,4; 11,7; 16 (4,0-42,6)	9,6; 12,4; 16,2 (5,5-28,4)	0,344
Intracelular cervical (ng/mg)	1,5; 2,6; 4,3 (0,4-16,2)	1,1; 2,3; 4,7 (0,6-26,6)	0,502

Q1: Primeiro quartil; Q3: Terceiro quartil; Min: Mínimo; Max: Máximo; DP: Desvio Padrão.

*Teste de Mann-Whitney.

A Tabela 5 mostra as concentrações sérica e intracelular cervical de folato entre os grupos de casos e controle. O grupo de alterações citopatológicas de alto grau (HSIL+ASC-H) apresentou as menores concentrações do micronutriente, seja avaliado no soro (10,8 ng/mL) ou nas células cervicais (2,0 ng/mg) se comparado aos demais grupos (controle, ASC-US e LSIL). No entanto, não foi encontrada diferença significativa das concentrações do micronutriente entre os grupos avaliados (Folato sérico: $p=0,610$, Folato celular cervical: $p=0,817$). Não foram encontradas diferenças significativas quando se avaliou a infecção por HPV concomitante às lesões (dados não apresentados).

TABELA 5: Concentração sérica e intracelular cervical de folato de acordo com a presença de alterações citopatológicas pré-neoplásicas

Folato Q1; Mediana; Q3 (Min-Max)	Controle (n=120)	Casos			p*
		ASC-US (n=21)	LSIL (n=16)	HSIL+ASC-H (n=20)	
Sérico (ng/mL)	8,4; 11,8; 16,0 (5,3-42,6)	10,0;15,0;16,4 (6,3-19,6)	10,1;12,4;15,0 (8,6-28,4)	7,5;10,8;17,4 (4,0-21,9)	0,610
Intracelular cervical (ng/mg)	1,5; 2,7; 4,5 (0,6-16,2)	1,3;2,7;4,2 (0,4-15,3)	1,1;2,3;5,4 (0,6-13,5)	1,0;2,0;4,6 (0,7-26,6)	0,817

Q1: Primeiro quartil; Q3: Terceiro quartil; Min: Mínimo; Max: Máximo; DP: Desvio Padrão; ASC-US: Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado; LSIL: Lesão Intraepitelial de Células Escamosas de Baixo Grau; HSIL: Lesão Intraepitelial de Células Escamosas de Alto Grau; ASC-H: Células Escamosas Atípicas não podendo excluir HSIL.

*Teste de Kruskal-Wallis.

6) DISCUSSÃO

O potencial papel do folato como agente protetor contra o câncer vem sendo alvo de estudos, uma vez que diversas reações bioquímicas essenciais para a vida envolvem esse micronutriente, e a sua deficiência tem sido associada ao desenvolvimento de neoplasias, incluindo câncer de mama, ovário, pâncreas, cérebro e pulmão (DUTHIE, 2011; ZHAO et al., 2016; XIAOU et al., 2018). Em relação à carcinogênese cervical, ainda não está claro o papel deste micronutriente e a maioria dos estudos foi realizada avaliando as concentrações séricas dessa vitamina (TOMITA et al., 2013; BAI et al., 2014; GONG et al., 2018). Neste estudo, foi avaliada a associação tanto dos níveis séricos quanto dos intracelulares cervicais do folato com a infecção por HPV e lesões cervicais.

6.1 FOLATO SÉRICO

Nesse estudo a concentração mediana de folato sérico foi ligeiramente maior nas mulheres HPV positivas, embora a diferença não tenha sido significativa. De maneira similar, um estudo americano não encontrou associação entre a persistência da infecção pelo HPV e a ingestão de folato. Isto é, não houve diminuição significativa no risco de infecção viral tanto para ingestão de folato, quanto para suplementação de folato ou concentrações circulantes do micronutriente (SEDJO et al., 2002). Uma pesquisa brasileira realizada com indivíduos do sexo masculino também não observou associação entre a ingestão de folato e a persistência da infecção pelo HPV de alto risco oncogênico, sugerindo que outros fatores além das concentrações séricas de folato podem exercer influência na persistência desta infecção viral (LOPES et al., 2017).

Por outro lado, o papel protetor do folato quanto à infecção pelo HPV foi observado por vários autores. Em mulheres indianas e turcas, por exemplo, menores níveis de folato sérico foram encontrados entre as participantes positivas para o vírus (ABIKE et al., 2011; PATHAK; BHATLA; SINGH, 2012; PATHAK et al., 2014). No Reino Unido, baixos níveis séricos do micronutriente foram observados em mulheres com HPV-AR (FLATLEY et al., 2009). A diminuição dos níveis de folato pode comprometer o sistema imunológico, aumentando a vulnerabilidade à infecção

pelo HPV (SHIKANY et al., 2004; FLATLEY et al., 2009). A discrepância destes achados com os do presente estudo pode ser devido ao pequeno n amostral de casos e a grande variabilidade nas concentrações de folato.

Além da infecção por HPV, neste trabalho, também foi avaliada a associação das concentrações séricas de folato com as alterações pré-neoplásicas da cérvix uterina. Menores níveis de folato sérico foram encontrados no grupo de alterações citopatológicas de alto grau (HSIL+ASC-H), embora não tenha sido encontrada associação significativa entre as concentrações do micronutriente e a presença de anormalidade celular cervical.

Em estudo realizado nos Estados Unidos, observou-se que quanto menores os níveis de folato RBC, mais severas as lesões da cérvix uterina. Assim, o folato seria capaz de induzir apoptose e inibir a proliferação de células cervicais, sendo a ingestão adequada deste micronutriente uma forma efetiva de prevenir as lesões cervicais (LI et al., 2018). Em uma pesquisa de larga escala realizada na China, o folato sérico foi encontrado como um fator inversamente associado ao risco de NIC 2. Estes resultados sugerem que maiores níveis deste micronutriente no soro desempenham papel protetor em relação ao risco de NIC de alto grau em mulheres com ou sem HPV de alto risco (YANG et al., 2018). Além disso, observou-se um maior número de regressão de NIC 1 em mulheres que suplementaram folato (5 mg/dia) durante seis meses em relação ao grupo placebo (ASEMI et al., 2016).

No entanto, alguns estudos apresentaram resultados discordantes. Tomita e colaboradores (2013) mostraram que mulheres brasileiras apresentaram níveis elevados de folato sérico associados com lesões pré-neoplásicas ou câncer. De forma similar, Piyathilake e colaboradores (2009) observaram maiores concentrações de folato em mulheres com lesão ou câncer.

Além disso, um estudo conduzido nos Estados Unidos com 206 participantes não encontrou evidências de que níveis elevados de folato eritrocitário (RBC folato) afetem o prognóstico de neoplasias intraepiteliais cervicais (HO et al., 2011). Ainda, uma coorte europeia avaliou dados de 299.651 mulheres quanto a possíveis fatores dietéticos relacionados ao risco de desenvolvimento de câncer cervical, e não houve evidência de associação entre a ingestão de folato e o câncer cervical (GONZALEZ et al., 2011).

6.2. FOLATO INTRACELULAR CERVICAL

Conforme exposto, ainda é controversa a associação dos níveis de folato com o desenvolvimento das lesões cervicais. No entanto, a maioria dos estudos avaliou as concentrações séricas de folato em relação à carcinogênese cervical, e apenas dois trabalhos levaram em conta as concentrações intracelulares cervicais de folato (FOWLER et al., 1998; FLATLEY et al., 2014).

Assim, neste trabalho, também foi avaliada a associação de folato nas células cervicais com as lesões pré-neoplásicas e a infecção por HPV. Novamente, não foi observada diferença entre os níveis intracelulares cervicais de folato e a presença da infecção por HPV, embora as participantes apresentando a infecção viral tivessem concentração de folato intracelular cervical menor. No entanto, em um trabalho realizado nos Estados Unidos, mulheres HPV positivas apresentaram concentrações de folato tecidual cervical ligeiramente maiores que aquelas sem infecção viral (FOWLER et al., 1998).

Em relação aos níveis de folato intracelular e a presença das lesões cervicais, foi observado que mulheres com lesões cervicais de alto grau (HSIL+ASC-H) possuíam menores concentrações de folato se comparado aos demais grupos, embora as diferenças não tenham sido significativas. Corroborando com este resultado, maiores concentrações de folato intracelular cervical foram encontradas entre as mulheres americanas apresentando citologia normal (FLATLEY et al., 2014). Por outro lado, Fowler e colaboradores (1998) observaram maiores concentrações de folato em amostras de biópsia de mulheres apresentando NIC2+.

Estudos sugerem papel protetor do folato em relação à infecção pelo HPV (ZHAO et al., 2016; YANG et al., 2018). No entanto, altas concentrações deste micronutriente nem sempre desempenham papel protetor no que diz respeito à infecção por este vírus. É necessária uma avaliação prévia da presença da infecção viral e do grau displasia cervical, já que altos níveis de folato nas células cervicais podem aumentar o risco de persistência da infecção pelo HPV-AR em mulheres com lesão pré-neoplásica (FLATLEY et al., 2014).

6.3. CORRELAÇÃO ENTRE FOLATO SÉRICO E FOLATO INTRACELULAR CERVICAL

Sabe-se que a expressão de receptores de folato é alterada na presença de displasia, uma vez que as células possuem rápida replicação, aumentando dependência do micronutriente (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002). Além disso, existe uma diferença entre o microambiente cervical e a circulação, o que motivou a realização da análise da associação das duas formas do micronutriente com a carcinogênese cervical, e avaliação da correlação entre folato sérico e folato intracelular cervical.

No entanto, apesar de neste trabalho ter sido observado comportamento similar entre folato sérico e celular cervical (ausência de associação com a infecção por HPV e menores concentrações entre mulheres com lesão de alto grau em relação aos grupos controle, ASC-US e LSIL) não foi observada correlação entre as duas formas de análise do micronutriente. De maneira similar, Fowler e colaboradores (1998) também não observaram correlação entre os níveis de folato sérico e no tecido cervical.

6.4. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O n amostral deste estudo foi pequeno, dificultando a análise estatística e levando a uma pequena representatividade da população, o que constitui uma limitação. Além disso, a presença de outros possíveis cofatores associados aos níveis de folato que não foram avaliados nesse trabalho, incluindo o nível de metilação do DNA, polimorfismos genéticos em enzimas que atuam no metabolismo do folato, bem como o nível de outros micronutrientes que desempenham papel no metabolismo do folato, podem influenciar na relação entre os níveis de folato e a carcinogênese cervical.

7) CONCLUSÃO

Não houve associação entre os níveis de folato no soro ou nas células cervicais e a infecção pelo HPV ou as lesões pré-neoplásicas na cérvix uterina.

REFERÊNCIAS

ABIKE, Faruk et al. **Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias**. *Gynecologic Oncology*. 209–214, 2011.

ABREU, Mery Natali Silva et al. **Conhecimento e percepção sobre o HPV na população com mais de 18 anos da cidade de Ipatinga, MG, Brasil**. *Ciência & Saúde Coletiva*, 23(3): 849-860, 2018.

ALVES, Christiane Maria Meurer; GUERRA, Maximiliano Ribeiro; BASTOS, Ronaldo Rocha. **Tendência de mortalidade por câncer de colo de útero para o Estado de Minas Gerais, Brasil, 1980-2005**. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25(8): 1693—700, 2009.

ASEMI, Zatollah et al. **Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial**. *Nutrition* 32: 681–686, 2016.

BAI, Li-Xia et al. **Folate Deficiency and FHIT Hypermethylation and HPV 16 Infection Promote Cervical Cancerization**. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 15: 9313-9317, 2014.

BALUZ, Kátia; CARMO, Maria das Graças Tavares; ROSAS, Glorimar. **O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão**. *Revista Brasileira de Cancerologia* 48(4): 597-607, 2002.

BAKER, Timothy S. et al. Structures of bovine and Human papillomavirus. **Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction**. *Biophys. J.* 60: 1445-56,1991.

BERNARD, Hans-Ulrich et al. **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments**. *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70-9, 2010.

BOUVARD, V. et al. **A review of human carcinogens- Part B: biological agents.** Lancet Oncol, v. 10, n. 4, p. 321-2, Apr 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde do. **Guia prático sobre HPV: perguntas e respostas.** Brasília. 2017. Acesso em 10/10/2018, disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/07/Perguntas-e-respostas-HPV-.pdf>

CAMARA, Geni N. N. de Lima et al. **Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico.** Universitas Ciências da Saúde - vol.01 n.01 - pp. 149-158, 2003.

CASTELLSAGUÉ, Xavier; MUÑOZ, Nubia. Chapter 3: **Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking.** Journal of the National Cancer Institute (31):20-8. 2003.

CHOI, Sang-Woon; MASON, Joel B. **Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme.** Journal of Nutrition: 129-132, 2000.

DE VILLIERS, Ethel-Michele et al. **Classification of papillomaviruses.** Virology. 324:17-27. 2004.

DOORBAR, John et al. **The Biology and Life Cycle of Human Papillomaviruses.** Vaccine 30S. 2012.

DOORBAR, John; STERLING, J. **The biology of human papillomaviruses.** Human papillomaviruses – clinical and scientific advances Londres, Arnold, p. 10-23, 2001.

DOORBAR, John. **Host Control of Human Papillomavirus Infection and Disease.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2017.

DUTHIE, Susan J. **Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis.** J Inherit Metab Dis, 34: 101-109, 2011.

FLATLEY, Janet E. et al. **Folate Status and Aberrant DNA Methylation Are Associated With HPV Infection and Cervical Pathogenesis.** *Cancer Epidemiology Biomarkers* 18:2782-2789, 2009.

FLATLEY, Janet E. et al. **Tumour suppressor gene methylation and cervical cell folate concentration are determinants of high-risk human papillomavirus persistence:** a nested case control study. *BMC Cancer*, 14:803, 2014.

FOWLER, Brenda M. et al. **Hypomethylation in Cervical Tissue: Is There a Correlation with Folate Status?** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* Vol. 7, 901-906, October 1998.

GONG, Jiao-Mei et al. **The association between MTHFR polymorphism and cervical cancer.** *Scientific Reports* 8: 7244, 2018.

GONZALEZ, Carlos A. et al. **Dietary factors and in situ and invasive cervical cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study.** *International Journal of Cancer*: 129, 449–459, 2011.

HERNANDEZ, Brenda Y. et al. **Diet and premalignant lesions of the cervix:** evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin and vitamin B12. *Cancer causes control*, 14(9): 859-870, julho de 2003.

HO, Gloria Y.F. et al. **Risk Factors for Persistent Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 1 and 2 Managed by Watchful Waiting.** *Low Genit Tract Dis.* 15(4): 268–275, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Coordenação de Prevenção e Vigilância.** Divisão de Detecção Precoce e Apoio a Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2016. 114p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero /** Instituto Nacional de Câncer. Rio de

Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010>, acesso em 20/09/2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>, acesso em 06/10/2018.

KANESHIMA, E. M. et al. **Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no LEPAC**. Maringá, PR: Universidade Federal de Maringá. 3 (23): 731-737 p. 2001.

LI, Qiaoling et al. **Folate deficiency and aberrant DNA methylation and expression of FHIT gene were associated with cervical pathogenesis**. *Oncology Letters* 15(2): 1963-1972, 2018.

LOPES, Raíssa do Vale C. et al. **Dietary intake of selected nutrients and persistence of HPV infection in men**. *International Journal of Cancer*: 141, 757–765, 2017.

MAGLENNON, Gareth; MCINTOSH, Pauline; DOORBAR, John. **Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression**. *Virology*, 414: 153-163, 2011.

MILLER, Joshua W. et al. **Folate deficiency induced homocysteinemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine coordinate regulation of homocysteine metabolism**. *Biochem. J.* 298: 415–419, 1994.

MUÑOZ, N. et al. **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer**. *N Engl J Med*, v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 2003.

MUÑOZ, N. et al. **Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer**. *Vaccine*, v. 24 Suppl 3, p.S3/1-10, Aug 2006.

NAYAR, Ritu; WILBUR, David. **The Pap test and Bethesda 2014**. Journal of the American Society of Cytopathology. Vol. 123, 5. 271-281. 2015.

ÓSIS, Maria José Duarte; DUARTE, Graciana Alves; SOUSA, Maria Helena. **Conhecimento e atitude de usuários do SUS sobre o HPV e as vacinas disponíveis no Brasil**. Revista Saúde Pública 48(1): 123-133, 2014.

PATHAK, Sujata; BHATLA, Neerja; SINGH, Neeta. **Cervical cancer pathogenesis is associated with one-carbon metabolism**. Mol Cell Biochem 369:1–7, 2012.

PATHAK, Sujata et al. **Serum One-Carbon Metabolites and Risk of Cervical Cancer**. Nutrition and Cancer 66(5), 818–824, 2014.

PIYATHILAKE, CJ et al. **Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era**. Cancer Prev Res (Phila Pa). 2(9):842, 2009.

PIYATHILAKE, CJ et al. **Indian women with higher serum concentrations of folate and vitamin B12 are significantly less likely to be infected with carcinogenic or high-risk (HR) types of human papillomaviruses (HPVs)**. Int J Womens Health 2: 7-12, 2010.

SANJOAQUIN, Miguel A. et al. **Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach**. Int J Cancer, 113:825–828, 2005.

SANJOSÉ, Silvia de; BROTONS, Maria; PAVON, Miguel Angel. **The natural history of human papillomavirus infection**. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2018.

SANTOS, Ana Carolina da Silva. **Avaliação do conhecimento sobre câncer cervical e da aceitabilidade à vacina contra o HPV**. 120f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. 2017.

SCHIFFMAN, Mark; WENTZENSEN, Nicolas. **Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 22, n. 4, p. 553-60, 2013.

SEDJO, Rebecca L. et al. **Human Papillomavirus Persistence and Nutrients Involved in the Methylation Pathway among a Cohort of Young Women**. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 11, 353–359, April 2002.

SHIKANY, James M. et al. **Effect of folic acid fortification of foods on folate intake in female smokers with cervical dysplasia**. *Nutrition* 20(5):409-14, 2004.

SILVA, Nayara Nascimento Toledo. **Efeito dos níveis plasmáticos do folato na infecção por HPV e carcinogênese cervical**. 72f. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. 2012.

STEVENSON, WJ. **Estatística Aplicada à Administração**. Edição 2001. São Paulo: Harbra. Pg. 383. 2001.

SYRJÄNEN, Stina; PURANEN, Mirja. **Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission**. *Crit Rev Oral Biol Med*. 11(2):259-74, 2000.

TOMITA, Luciana Y. et al. **Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism Modify the Association of Dietary and Circulating Folate and Vitamin B-6 with Cervical Neoplasia**. *The Journal of Nutrition*: 2007-2014, 2013.

XIAOU, Suhong et al. **Folate Deficiency Facilitates Genomic Integration of Human Papillomavirus Type 16 DNA In Vivo in a Novel Mouse Model for Rapid Oncogenic Transformation of Human Keratinocytes**. *The Journal of Nutrition*: 389-400, 2018.

YANG, Jing et al. **Interactions between serum folate and human papillomavirus with cervical intraepithelial neoplasia risk in a Chinese population-based study**. *Am J Clin Nutr*;108:1034–1042, 2018.

ZHAO, W et al. **Association between folate status and cervical intraepithelial neoplasia.** [S.]. European Journal of Clinical Nutrition 70, 837-842, 2016.

ZUR HAUSEN, Harald. **Papillomaviruse and câncer:** from basic studies to clinical application. Nature Publishing Group 2, 342-350, 2002

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Avaliação de cofatores genéticos, epigenéticos e nutricionais relacionados à carcinogênese cervical”

Prezada paciente _____

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa sobre os cofatores relacionados ao desenvolvimento do câncer do colo uterino. Esse projeto será realizado no município de Ouro Preto, MG e terá início em agosto de 2016 com término previsto para agosto de 2021.

Com este estudo poderemos compreender melhor os fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical, colaborando para o diagnóstico e prognóstico das lesões cervicais, bem como para o tratamento e prevenção das mesmas.

Se você quiser participar, deverá responder um questionário e realizar um exame preventivo (Papanicolaou), no qual será coletada amostra de material do colo do útero para análise citológica e pesquisa do Papilomavírus Humano (HPV), o principal fator envolvido no desenvolvimento do câncer cervical. Além disso, será coletada amostra de sangue para dosagem de folato, homocisteína e vitaminas B12 e B6, e para análise de polimorfismos genéticos que têm sido associado ao câncer cervical. As coletas serão realizadas por profissionais habilitados e devidamente treinados.

Os procedimentos utilizados apresentam risco habitual, visto serem de rotina clínica e laboratorial. Para diminuir os riscos, todo o material utilizado será descartável, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pelo laboratório.

Os materiais coletados serão divididos em pequenas quantidades e armazenados no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica Clínica da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (Campus Universitário Morro do Cruzeiro, Bauxita, CEP 35400-000, Ouro Preto, MG) e deverá ser utilizado exclusivamente para as finalidades acima.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause prejuízo, inclusive no seu acompanhamento. Todos os exames serão gratuitos e realizados no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da UFOP, nos postos de saúde da UFOP e da Prefeitura Municipal de Ouro Preto, seguindo rigorosamente os critérios estabelecidos.

Todos os dados obtidos serão armazenados e mantidos em sigilo em um computador disponibilizado na sala da Prof.^a Angélica Alves Lima na Escola de Farmácia, Campus Universitário Morro do Cruzeiro, por um período mínimo de 5 anos.

Você poderá esclarecer qualquer dúvida sobre o projeto ou ter acesso ao resultado de todas as análises realizadas com as Professoras Angélica Alves Lima e Cláudia Martins Carneiro ou com a Farmacêutica Nayara Nascimento Toledo Silva, de segunda a sexta-feira, de 8h as 11h e de 13h às 17h horas, no Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, UFOP, campus universitário ou pelo telefone (31) 3559-1071. Para quaisquer esclarecimentos em relação aos aspectos éticos, você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto no Campus Universitário, Morro do Cruzeiro, ICEB II, sala 29, pelos telefones (31)3559-1368 ou (31)3559-1370 ou pelo e-mail propp@ufop.br.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Assinatura da Coordenadora
_____, ____ de _____ de 20 ____

Número:

Eu, _____
, após ser esclarecida sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

Assinatura da Paciente

Assinatura da Coordenadora
_____, ____ de _____ de 20 ____

ANEXO B – Entrevista**Entrevista do Projeto “Avaliação dos cofatores genéticos, epigenéticos e nutricionais relacionados à carcinogênese cervical”.**

{num} Número de identificação: _____
 {nome} Nome: _____
 {psf} PSF: _____
 {entrevi} Entrevistadora: _____
 {data} Data da entrevista: _____ (dd/mm/aa)

Coleta de Sangue:

{sangedta} Coleta de sangue EDTA (0) não (1) sim
 {sangsoro} Coleta de sangue SORO (0) não (1) sim
 {datasang} Data da coleta de sangue: _____ (dd/mm/aa)
 {profsang} Profissional responsável pela coleta de sangue: _____

Coleta de material cervical ou biópsia:

{cerv} Coleta de material cervical (0) não (1) sim
 {datacerv} Data da coleta cervical: _____ (dd/mm/aa)
 {profcerv} Profissional responsável pela coleta cervical: _____

Meu nome é _____. Inicialmente, eu gostaria de te agradecer por participar deste estudo.

Eu irei fazer algumas perguntas que serão registradas neste formulário. Devo dizer que tudo que você responder na entrevista será estritamente confidencial, e as informações colhidas das várias mulheres participantes do estudo serão usadas apenas em relatos científicos, sem nenhuma identificação pessoal.

Os possíveis benefícios deste estudo dependem de que as respostas sejam as mais reais (verdadeiras, sinceras) possíveis. Por favor, pergunte se você não entender o significado de alguma questão. A qualquer momento você poderá recusar-se a continuar ou a responder perguntas específicas. Se houver necessidade de entrar em contato com você, poderia fornecer seu endereço e telefone?

{end} _____ Endereço:

{zona} Zona: (0) Rural (1) Urbana
 {cidade} _____ Cidade:

{tel} _____ Telefone:

{email} _____ E-mail:

{tempcid} 1. Há quanto tempo você mora em [CIDADE]? _____

{nasc} 2. Qual a sua data de nascimento? _____ (dd/mm/aa)

{idade} Portanto a sua idade (em anos completos) é _____

{escola} 3. Você já foi à escola? (0) não (1) sim

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 6; SE SIM, CONTINUE]

{grauesc} 4. Qual o nível educacional mais alto que você alcançou?

(0) 1º grau incompleto

(1) 1º grau completo

(2) 2º grau incompleto

- (3) 2º grau completo
- (4) universitário incompleto
- (5) universitário completo
- (9) outro _____

{anosesc} 5. Anos de escolaridade (não incluir repetência): _____

{estciv} 6. Atualmente você:

- (0) é casada
- (1) tem parceiro regular*
- (2) é solteira (nunca foi casada nem viveu com parceiro)
- (3) é viúva
- (4) é separada/divorciada
- (9) outro _____

***relações sexuais regulares, por pelo menos seis meses, sem contrato legal ou religioso, residindo ou não na mesma casa**

{profiss.} 7. Qual a sua profissão? _____

{tempprof} 8. Há quanto tempo você exerce esta profissão? _____

{renda} 9. Somando todas as rendas, pensões e salários da família, qual é o ganho mensal familiar (aproximado)? **[Incluir os ganhos de toda a família]**

{pesrenda} 10. Quantas pessoas vivem/dependem desse ganho?

Agora eu gostaria de fazer algumas perguntas sobre sua vida sexual.

{idsex} 11. Qual idade você tinha quando teve sua primeira relação sexual? _____ anos

{nunsex} 12. Quantos parceiros sexuais você teve até o momento? _____

{gest} 13. Você teve alguma gestação? (0) não (1) sim Quantas?

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 15; SE SIM, CONTINUE]

{idgest} 14. Qual a idade da primeira gestação? _____ anos

{abort} 15. Você já teve algum aborto? (0) não (1) sim

{doensex} 16. Você já teve alguma doença sexualmente transmissível? (0) não (1) sim

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 19; SE SIM, CONTINUE]

{doenescl} 17. Você foi esclarecida sobre qual (quais) foi (foram) a(s) doença(s)?

(0) não

(1) sim, foi (foram) _____

{doentrat} 18. Você foi tratada para essa(s) doença(s)? (0) não (1) sim

{prev} 19. Você já fez exame de “preventivo de câncer do colo uterino” ou exame de Papanicolaou?

(0) não (1) sim

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 22; SE SIM, CONTINUE]

{prevfreq} 20. Com que frequência você faz exames “preventivos de câncer do colo uterino” ou exames de Papanicolaou?

- (0) não sabe
- (1) anualmente
- (2) a cada 5 anos
- (4) sem frequência definida
- (9) Outra: _____

{prevult} 21. Há quanto tempo foi seu último exame “preventivo de câncer do colo uterino” ou exame de Papanicolaou? _____

{conc} 22. Você utiliza algum método contraceptivo?

- (0) não (1) sim (2) já utilizou

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 25; SE SIM OU JÁ UTILIZOU, CONTINUE]

{concmct} 23. Qual método contraceptivo você utiliza/já utilizou?

- (0) Pílula
- (1) Ligadura de trompa
- (2) Camisinha
- (3) Vasectomia do parceiro
- (4) Injeção
- (5) Coito interrompido
- (6) DIU
- (7) Tabela
- (9) Outro: _____

{conctemp} 24. Por quanto tempo você utiliza/utilizou este método contraceptivo? _____

{sangsex} 25. Você possui sangramento após relações sexuais?

- (0) não (1) sim (2) já teve

{menop} 26. Utiliza tratamento hormonal para tratar menopausa?

- (0) não (1) sim (2) não está na menopausa

Agora eu gostaria de fazer algumas perguntas sobre seu histórico familiar de câncer.

{canfam} 27. Possui histórico de câncer na família?

- (0) não (1) sim

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 30; SE SIM, CONTINUE]

{canparen} 28. Qual o grau de parentesco? _____

{cantipo} 29. Qual tipo de tumor? _____

Agora eu gostaria de fazer algumas perguntas sobre seus hábitos.

{alc} 30. Você consome bebida alcoólica?

- (0) não (1) sim (2) já utilizou

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 32; SE SIM OU JÁ UTILIZOU, CONTINUE]

{alctemp} 31. Por quanto tempo você consome/consumiu bebida alcoólica? _____

{fumo} 32. Você fuma?

- (0) não (1) sim (2) já utilizou

[SE RESPOSTA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 34; SE SIM OU JÁ UTILIZOU, CONTINUE]

{fumotemp} 33. Por quanto tempo você fuma/fumou? _____

{fog} 34. Tem fogão à lenha em casa?

- (0) não (1) sim (2) já teve

[SE RESPOSTA NÃO, FINALIZE A ENTREVISTA; SE SIM, CONTINUE]

{fogtemp} 35. Por quanto tempo você utiliza/utilizou fogão à lenha? _____

Muito obrigada por seu tempo e esforço

ANEXO C – Parecer do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE NÍVEIS INTRACELULARES CERVICAIS DE FOLATO, DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM ENZIMAS QUE ATUAM NO METABOLISMO DESTES MICRONUTRIENTE E DA ASSOCIAÇÃO DESTES COM A INFECÇÃO POR HPV E O CÂNCER DE COLO DO UTERINO

Pesquisador: Angélica Alves Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 88479718.0.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.654.610

Apresentação do Projeto:

"Os programas de prevenção e rastreamento do câncer no colo uterino vem diminuindo as taxas de incidência desta neoplasia. No entanto, o número de vítimas fatais ainda é grande, principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, por exemplo, mais 5.000 mulheres morrem anualmente em decorrência do câncer cervical. A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico é a principal causa desta neoplasia. Mas apesar da aceitabilidade do papel do HPV na carcinogênese cervical, a presença do vírus não é suficiente para a transformação maligna completa. A maioria das alterações no colo uterino induzidas por HPV são passageiras, regredindo espontaneamente. Desta forma, para a progressão da infecção viral ao câncer, cofatores genéticos, epigenéticos e/ou comportamentais/ambientais, como os nutricionais, são necessários. O folato é o principal micronutriente envolvido no metabolismo do carbono, sendo essencial para síntese e reparo do DNA, além da expressão gênica. Polimorfismos nos genes que codificam algumas enzimas que atuam no metabolismo do folato podem alterá-lo, como os polimorfismos C877T no gene da enzima metilenoetetrahidrofolato redutase (MTHFR), A2756 no gene da enzima metionina sintase (MS), A88G no gene da enzima metionina sintase redutase (MTRR), número de repetições em tandem (2R e 3R) na região não traduzida na região 5' (5' UTR) do gene da enzima timidilato sintase (TS) e a deleção de 8pb em 3' UTR do gene desta

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 35.400-000
UF: MG **Município:** OURO PRETO
Telefone: (31)3559-1368 **Fax:** (31)3559-1370 **E-mail:** cep@propp.ufop.br

ANEXO C – Parecer do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE COFATORES GENÉTICOS, EPIGENÉTICOS E NUTRICIONAIS RELACIONADOS À CARCINOGENESE CERVICAL

Pesquisador: Angélica Alves Lima

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 57187318.7.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.830.605

Apresentação do Projeto:

"Estudo transversal onde será avaliado: (a) associação dos níveis de folato e vitamina B12 com a carcinogênese cervical; (b) os polimorfismos C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato (MTHFR), A2756 no gene da enzima etionina sintase (MS), A86G no gene da enzima metionina sintase redutase (MTRR), do número de repetições em tandem (2R e 3R) na região não traduzida na porção 5' (5' UTR) do gene da enzima timidilato sintase (TS) e a deleção de 6pb em 3' UTR do gene desta enzima e sua associação com o câncer cervical; (d) grau de metilação do DNA tanto do hospedeiro quanto do HPV em relação à presença dos diferentes graus de lesões pré-neoplásicas da cérvix uterina e do câncer cervical. Serão analisadas amostras de 300 mulheres de Ouro Preto com mais de 30 anos de idade atendidas pelo SUS/OP, apresentando ou não lesões cervicais e/ou infecção pelo HPV. Serão coletadas amostras sanguíneas para dosagem de folato, homocisteína e vitaminas B12 e B6, que serão realizadas por quimioluminescência, e avaliação dos polimorfismos genéticos, cuja genotipagem será feita por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática (RFLP), com os iniciadores e as enzimas de restrição específicas para cada gene. Amostras cervicais serão coletadas para análise citológica, realizada pela técnica convencional de Papanicolaou, pesquisa do HPV, realizada por PCR convencional utilizando os

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 35.400-000
UF: MG **Município:** OURO PRETO
Telefone: (31)3559-1368 **Fax:** (31)3559-1370 **E-mail:** cep@propp.ufop.br

ANEXO D – Protocolo Completo da Extração de DNA

Protocolo de extração de DNA: illustra blood genomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare)

1ª Etapa:

- Adicionar em um microtubo:
- 20µl de Proteinase K
- 400µl de Tampão de lise (frasco de tampa vermelha)
- 200µl da amostra, após esta ter sido homogeneizada
- Homogeneizar (Vortex)
- Aguardar 10 minutos

2ª Etapa:

- Transferir a amostra para uma coluna
- Centrifugar a 9000 rpm por 1 minuto
- Descartar o que foi depositado no tubo coletor

3ª Etapa:

- Adicionar 500µl de Tampão de Lise (frasco de tampa vermelha)
- Centrifugar a 9000 rpm por 1 minuto
- Descartar o que foi depositado no tubo coletor

4ª Etapa:

- Adicionar 500µl de Tampão de Lavagem (frasco de tampa amarela)
- Centrifugar a 9000 rpm por 3 minutos

5ª Etapa:

- Transferir a coluna para um novo microtubo
- Adicionar 95µl de Tampão de Eluição pré-aquecido a 70°C (frasco de tampa cinza)
- Aguardar 1 minuto
- Centrifugar a 9000 rpm por 1 minuto
- Descartar a coluna e armazenar o material do microtubo a uma temperatura de -80°C