

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B EM AMOSTRAS  
ENDOCERVICAIS DE MULHERES COM LESÕES PRÉ-MALIGNAS  
E MALIGNAS

Bolsista: Jéssica Lorena dos Santos Mathias, CNPq

Manaus  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-S/0056/2008  
DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B EM AMOSTRAS ENDOCERVICAIS  
DE MULHERES COM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS

Bolsista: Jéssica Lorena dos Santos Mathias, CNPq  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Maria Borborema dos Santos

Manaus  
2009

## RESUMO

A presença do vírus da Hepatite B (VHB) nas secreções vaginais facilita a passagem de partículas infectantes através das superfícies mucosas, durante a relação sexual. Estas partículas virais podem se associar com o HPV e outras DST, desencadeando neoplasias malignas. Embora esta interação seja incerta, verificou-se a necessidade de pesquisar VHB na cérvix uterina no Amazonas, devido à alta endemicidade na região. O Estudo detectou o VHB em amostras endocervicais utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), relacionando a presença do VHB com fatores epidemiológicos (idade, tipo de lesão, co-infecção HPV-VHB). Foi realizado *semi-nested* PCR em 153 amostras, das quais, 14,38% (n=22) mostraram-se positivas para o DNA do VHB. Embora o estudo não possua literatura para comparar, acredita-se que estes níveis possam estar influenciando a transformação maligna.

Palavras-chaves: VHB, HPV, câncer.

## **ABSTRACTS**

The attendance of the virus from Hepatitis B (HBV) on the secretions of vagina facility the passage of particles infector via the surfaces mucous, during the sexual intercourse, on which can if associate with the HPV & another STD, unchain cancer. This interaction he may be uncertainty, verified the need to research HBV on endocervice into the State of Amazonas, due on the high endemicity from region. The survey detector the HBV in patterns endocervices by using the technique from Polymerase Chain Reaction, relating the attendance of the HBV with factors epidemiological (age, type of lesion co-infection HPV-HBV). For this was realized semi-nested PCR in 153 sample, being that 14,38% (n=22) showed positives about to the DNA of the HBV. Although the research hasn't literature to compare, believes what these levels can be influence the conversion misconstrue.

Key words: HBV, HPV, cancer

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxinucléico trifosfato

HPV – Papiloma Vírus Humano

HSIL - Lesão intra-epitelial de alto grau

LSIL - Lesão intra-epitelial de baixo grau

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

μL – Microlitro

NIC – neoplasia intra-epitelial cervical

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

pmol – picomol

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Taq DNA polimerase – DNA polimerase isolada *Thermus aquaticus*

Tris-HCL – [Tris (hidroximetil) com pH ajustado por HCl concentrado

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

VHB – Vírus da Hepatite B

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Desenho esquemático dos três tipos de partículas do vírus da Hepatite B.....	11
Figura 02 - Localização dos genes no genoma do vírus da Hepatite B.....	12
Figura 03 - Prevalência mundial da infecção pelo vírus da Hepatite B.....	13
Figura 04 - PCR – Amplificação de DNA <i>in vitro</i> .....	18
Figura 05 - Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular.....	26
Figura 06 - Estratégia do sistema semi- <i>nested</i> PCR para amplificação dos genes completos.....	29
Figura 07 - Perfil eletroforético em gel de agarose para DNA genômico.....	31
Figura 08 - Perfil eletroforético em gel de agarose para detecção de VHB.....	32

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 01 - Distribuição das pacientes portadoras de Hepatite B quanto à faixa etária.....	33
Gráfico 02 - Prevalência de co-infecção de VHB com HPV.....	34
Tabela 01 - Prevalência do vírus da Hepatite B quanto ao tipo de lesão encontrada nas pacientes.....	33

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
2.1 Estrutura do vírus da Hepatite B e Genoma viral (VHB) .....	11
2.2 Formas de transmissão e epidemiologia do VHB .....	13
2.3 Diagnóstico da infecção pelo VHB .....	16
2.4 Método Direto .....	17
2.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	17
2.4.2 Semi-nested PCR .....	19
2.4.3 Eletroforese em gel de agarose .....	20
2.5 Co-infecção VHB-HPV .....	20
3. OBJETIVOS .....	23
3.1 Geral .....	23
3.2 Específico .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Modelo de estudo .....	24
4.2 Amostras .....	24
4.3 Procedimentos .....	24
4.3.1 Obtenção das amostras .....	24
4.3.2 Diagnóstico Molecular do vírus da Hepatite B .....	25
4.3.3 Extração do DNA do VHB .....	26
4.3.4 Amplificação controle do DNA .....	27
4.3.5 Amplificação do gene S por PCR .....	28
4.3.5.1 Estratégia para amplificação do gene S .....	28
4.3.6 Eletroforese em gel de agarose 1,5% .....	30
4.4 Avaliação dos dados epidemiológicos obtidos .....	30
4.5 Critério de inclusão e exclusão das amostras .....	30
5. RESULTADOS .....	31
5.1 Viabilidade das amostras .....	31
5.2 Hepatite B e lesões pré-malignas e malignas .....	32
5.3 Faixa etária .....	33
5.4 Tipo de lesão .....	33
5.5 Co-infecção com HPV .....	34
6. DISCUSSÃO .....	35
7. CONCLUSÃO .....	37
8. REFERÊNCIAS .....	38
9. ANEXO .....	44
9.1 Parecer .....	44



## 1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Hepatite B (VHB) é um agente infeccioso da família *Hepadnaviridae*, cujo material genético é o DNA e possui genes que contêm códigos genéticos que produzem determinadas proteínas ou antígenos, que podem ser detectados no sangue, os quais são muito importantes para o diagnóstico da doença (SILVA, 2005).

A maior parte das infecções agudas causadas pelo VHB é assintomática. A transmissão do vírus é resultado principalmente da atividade sexual, do uso de drogas injetáveis, da transmissão vertical ou da exposição ocupacional (ROSSETTI et al., 2006).

Considerada como uma Doença Sexualmente Transmissível (DST), assume grande importância no contexto de saúde pública, pois todas as DST são consideradas como facilitadoras da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (SILVA, 2005).

Embora as formas de contaminação do HIV e do vírus da Hepatite B sejam semelhantes, o VHB é 10 vezes mais contaminante do que o HIV, fato este conferido pelo seu mecanismo de resistência, uma vez que a sua enzima DNA-polimerase não possui a função de corrigir erros e, por essa razão, a taxa de mutações encontradas no genoma do VHB é maior do que outros vírus de DNA, justificando a persistência viral diretamente relacionada com a variabilidade do genoma deste vírus (FEREIRA, 2004; ROSSETTI et al., 2006).

A prevalência de co-infecção com VHB foi estatisticamente significativa de vírus hepatotrópicos em associação com o HIV é frequentemente encontrada, estando ligada com a forma sexual de transmissão que estes vírus compartilham (PELEGRINI, 2007). Em indivíduos co-infectados, a carga viral plasmática do HIV-1 tende a aumentar enquanto que há a diminuição do número de linfócitos T CD4+ podendo, desta forma, acelerar ou não a progressão da infecção pelo HIV-1 para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA/AIDS. No Brasil, a prevalência da co-infecção HIV-1/VHB varia entre 40,9% e 69,5% (SOUZA, 2004).

A literatura relata que, pelo seu grande poder infeccioso, a presença do VHB no sêmen e nas secreções vaginais facilita a passagem de partículas infectantes através das superfícies mucosas, durante a relação sexual, sendo assim considerada uma das mais importantes DST do homem (FERREIRA, 2000). A transmissão sexual é o meio mais comum de contaminação, por isso os

adolescentes e adultos com vida sexual ativa responderem pela maioria dos casos notificados atualmente. Entre 90% e 95% dos adultos infectados com a Hepatite B irão eliminar o vírus de forma espontânea e os restantes (5% a 10% dos infectados com a Hepatite B) se tornarão doentes crônicos (SOS, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo já tiveram contato com o VHB e que cerca de 500 milhões de indivíduos sejam portadores crônicos do antígeno de superfície viral (AgHBs) (BRAGA, 2006). No Brasil, a prevalência do VHB é em torno de 8,0% na região da Amazônia, de 2,5% nas regiões Centro-oeste e Nordeste, de 2,0% na região Sudeste e de 1,0% na região Sul (PELEGRINI et al., 2007). No Brasil, a bacia Amazônica é a região de mais alta prevalência desta infecção. No Estado do Amazonas, as calhas dos rios Juruá, Purus e médio Solimões são consideradas as regiões de maior endemicidade.

Conforme o Centro de Doenças infecciosas (CDC, 1991), na região Amazônica Ocidental, a prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B varia de 10% a 95% (CDC, 2001). O boletim epidemiológico da Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas (SUSAM) juntamente com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em 2001, notificaram um total de 56 casos de infecção pelo VHB. Em 2002, foram 100 casos, sendo 41 casos de hepatite aguda e 8 casos de cirrose hepática pelo VHB e, em 2003, foram 114 casos. Além disso, a hepatite B está entre as dez principais causas de internação hospitalar no Estado.

Baseado no fato de o Amazonas encontrar-se no perfil de alta prevalência do vírus da hepatite B, além de alta prevalência de câncer de colo uterino, verificou-se a necessidade de pesquisar a presença do VHB na cérvix uterina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estrutura do vírus da Hepatite B e Genoma viral (VHB)

O VHB é um membro da família Hepadnaviridae, que apresenta vírus contendo DNA como material genético. No soro de pacientes podem ser visualizados três tipos de partículas morfologicamente diferentes relacionadas ao VHB: uma partícula infecciosa esférica, chamada de partícula de Dane, com 42 nm de diâmetro (vírion); uma segunda partícula esférica, com 22 nm de diâmetro; e outra com forma tubular e de comprimento variável (Figura 1). Essas duas últimas estruturas não são infecciosas, sendo compostas apenas por proteínas de superfície. Partículas infecciosas e não-infecciosas podem ser encontradas em abundância no soro (SILVA, 2005).

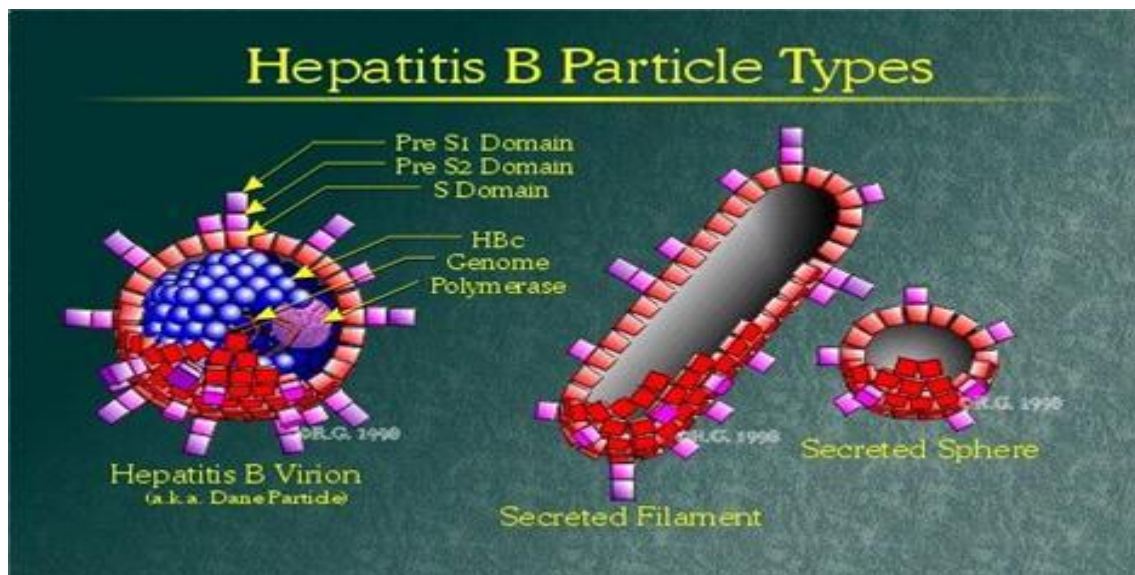


Figura 01. Desenho esquemático dos três tipos de partículas do vírus da Hepatite B.

Fonte: <http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV>

O VHB apresenta uma estrutura complexa com duplo envoltório. O envelope é composto por lipídeos e três formas de proteínas de superfície que são antigênicas. Esse, que por sua vez, circunda o nucleocapsídeo ou core, constituído pelo DNA viral, por proteínas estruturais codificadas pelo vírus e por uma DNA-polimerase que atua também como transcriptase reversa (Figura 2) (MIZOKAMI, 1999).

A replicação do DNA do VHB é bastante incomum, necessitando a formação de um RNA intermediário. O DNA do VHB é uma molécula circular, parcialmente dupla fita, com aproximadamente 3.200 nucleotídeos. Essa molécula contém quatro genes, conhecidos como C (Core), S (antígeno de Superfície), P (Polimerase) e X (porque a função desse gene era desconhecida quando foi descoberto). Os genes se sobrepõem entre si no genoma e codificam sete diferentes proteínas. A DNA-polimerase e a proteína core são traduzidas a partir de um RNA pré-genômico bicistrônico. Um outro transcrito viral, o RNA pré-C, difere do RNA pré-genômico por possuir, na extremidade 5', aproximadamente 30 nucleotídeos onde está contido um códon de iniciação. Esse RNA é usado exclusivamente para a expressão da proteína pré-core, a qual é precursora do antígeno “e” (HBeAg) que é secretado (NIEL , 1994).

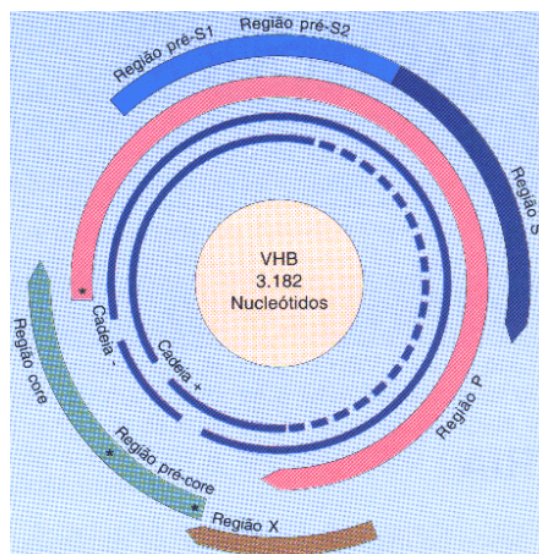


Figura 02. Localização dos genes no genoma do vírus da hepatite B.

Fonte:[http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2001/Imuno01\\_Hepatite%20B.htm](http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2001/Imuno01_Hepatite%20B.htm)

O gene S, composto pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S, codifica três formas do antígeno de superfície (HBsAg) que variam em tamanho. Devido ao uso alternativo de três códons de iniciação na mesma fase de leitura, a proteína HBsAg pode apresentar três formas distintas, grande, média e pequena, que se originam de um único gene. O gene P codifica a DNA-polimerase e cobre mais de 70% do genoma do vírus, sobrepondo-se inteiramente aos genes pré-S e S e, parcialmente, aos genes X e C. A enzima DNA-polimerase não possui a função de corrigir erros, e, por essa razão, a taxa de mutações encontradas no genoma do VHB é maior que a de outros vírus de DNA. A

variabilidade do genoma do vírus é um dos fatores responsáveis pela persistência viral. O gene X codifica a proteína HBX, que apresenta propriedades transativadoras e pode estar envolvida no desenvolvimento de hepatocarcinoma (PATERLINI, 1995).

## 2.2 Formas de transmissão e epidemiologia do VHB

O vírus da hepatite B é um dos patógenos mais comuns no homem em todo o mundo, no qual a Hepatite B configura-se como um problema mundial de saúde pública que, apesar da disponibilidade de uma vacina efetiva, não diminuiu significativamente nos últimos anos. (ROSSETI et al., 2006).

A distribuição do VHB varia muito em todo o mundo. No Continente Africano e sudeste da Ásia, onde a prevalência de portadores do vírus é considerada alta, O VHB é encontrado em cerca de 8% da população. Em regiões de prevalência intermediária, a infecção atinge entre 2 e 7% da população, enquanto, em regiões de baixa prevalência, menos de 2% da população é portadora do vírus. No Brasil, a região amazônica é considerada de alta prevalência, enquanto praticamente todo o restante do país encontra-se na faixa intermediária. (HODINKA, 1999).

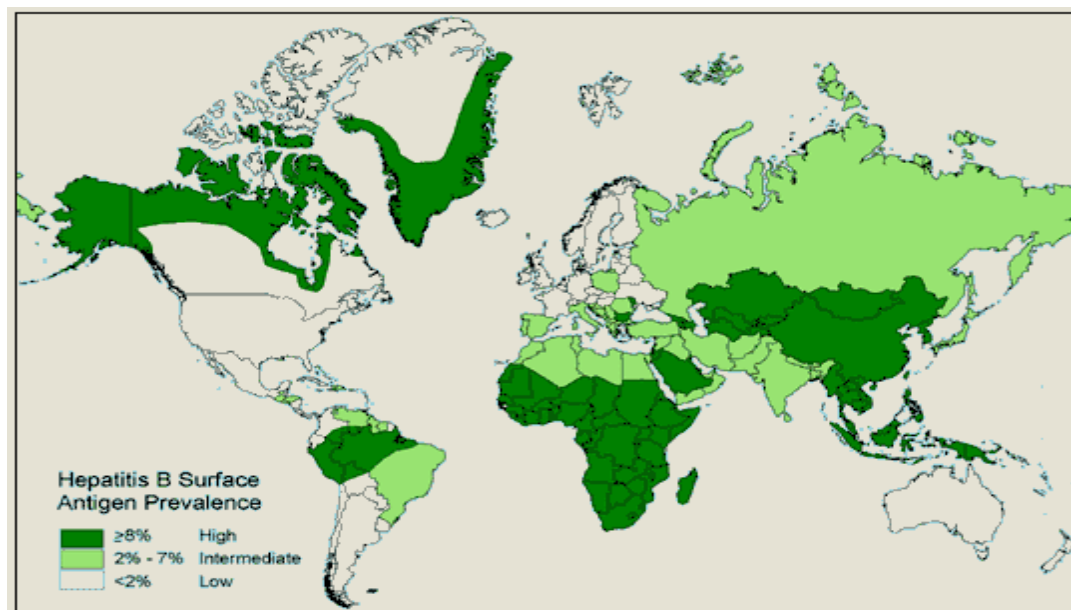


Figura 03. Prevalência mundial da infecção pelo vírus da hepatite B.  
Fonte: <http://www.medic8.com/travel/viral-Hepatitis-b.htm>

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo já tiveram contato com o VHB, e que 325 milhões tornaram-se portadores crônicos (CDC, 1991).

Mundialmente, as taxas de prevalência da hepatite B variam amplamente, de 0,1% a taxas superiores a 30%, como as verificadas em países asiáticos. Considerando que muitos indivíduos infectados são assintomáticos e que as infecções sintomáticas são insuficientemente notificadas, a frequência da hepatite B é, certamente, ainda subestimada. O Ministério de Saúde estima que, no Brasil, pelo menos 15% da população já esteve em contato com o VHB e que 1% da população apresenta doença crônica relacionada a este vírus (MS, 2002).

Os estudos epidemiológicos sobre hepatite B no Brasil são escassos e, em geral, ocuparam-se de grupos populacionais específicos. A análise de base populacional feita no município de São Paulo detectou o antígeno de superfície do VHB (HBsAg) em portadores crônicos em 1,02% (FOCACCIA et al., 2003).

Há áreas consideradas de alto risco, como no oeste do Paraná e em certas regiões da Amazônia. Apesar da desigualdade das notificações, as taxas referentes à mortalidade por hepatites, na região Amazônica, são mais altas do que no resto do Brasil. A partir de 1989, quando foi iniciada a vacinação em massa de crianças com menos de 10 anos, na Amazônia Ocidental, foi observada uma queda significativa na mortalidade. De uma maneira geral, a soroprevalência revela percentuais variáveis de HBsAg de 1,9% a 13,5%, e de 10,4% a 90,3% para o anti-HBs (BENSABATH et al., 2003).

O vírus é encontrado nas mais altas concentrações no sangue e nos exsudatos serosos. Exposições percutâneas ou de membranas mucosas ao VHB em sangue contaminado ou secreções corpóreas derivadas do soro são responsáveis por praticamente todas as infecções pelo VHB. Embora o HBsAg tenha sido identificado em uma grande variedade de fluidos corpóreas, somente o soro, o sêmen e a saliva mostrou-se contagioso, enquanto o leite materno e a urina permanecem controversos (TENGAN et al., 2006). Apesar da concentração do VHB ser 100 a 1.000 vezes mais baixa na secreção vaginal que no soro, foi demonstrado que a transmissão através destes fluidos é eficiente. (ASSOCIACIÓN PANAMERICANA DE INFECTOLOGIA, 2005)

A transmissão do VHB de pessoas com a hepatite aguda ou crônica aos seus parceiros sexuais é uma fonte importante de infecção, e os adultos HBsAg-positivos que se ocupam da atividade sexual de alto risco, com contato sexual sem proteção, tem grande probabilidade de

transmitir o HBV. Contudo, a maioria das pessoas com VHB crônico não tem a consciência que estão infectados, logo são transmissores silenciosos sendo a fonte mais provável da infecção para pessoas com múltiplos parceiros sexuais (TENGAN et al., 2006).

Nos países mais desenvolvidos, inclusive aqueles do norte da Europa, a maior parte (de 80-85 %) das infecções agudas de hepatite B ocorrem entre adultos jovens, que utilizam drogas injetáveis e da atividade sexual desprotegido de alto risco (TENGAN, 2006).

A importância da transmissão sexual da infecção pelo vírus da hepatite B foi amplamente reconhecida nas últimas décadas (BARRET et al., 1992). Inicialmente, cerca de 5% a 10% das mulheres sexualmente ativas apresentaram a infecção durante sua vida e cerca de 1% a 6% dos adultos são portadores crônicos do vírus (MAYNARD et al., 1988; Van DUYNHOVEN et al., 1997; CDC, 1998).

Mais de 95% de todos os doentes HIV-positivos estão infectados com hepatite B, e aproximadamente 10-15% têm hepatite B crônica, com variação considerável em várias regiões geográficas e grupos de risco. A infecção pelo HIV pode, ainda, prejudicar a resposta vacinal contra hepatite B. Logo, todos os portadores do HIV, ao serem vacinados, devem ser testados para o anti-HBs (anticorpo contra o antígeno de superfície de hepatite B), um a dois meses após a terceira dose da vacina. Estima-se que cerca de 100.000 doentes infectados com HIV nos EUA sofram de hepatite B crônica, logo leva-se em consideração que a transmissão sexual é o modo de infecção mais frequente (WASMUTH, 2006).

Em clínicas de DST, a taxa de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) positivo varia de 0,2% a 5% (BARRET et al., 1992). A exposição heterossexual corresponde a 30% a 60% dos casos infectados (CDC, 1998). A prevalência na população geral e os fatores associados com a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) não são bem conhecidos, pois mesmo na Europa, a avaliação sorológica rotineira para rastreamento desta infecção, não é realizada (VAN DUYNHOVEN, 1997).



### 2.3 Diagnóstico da infecção pelo VHB

As análises moleculares permitem a identificação qualitativa e quantitativa do DNA do VHB e são usadas, principalmente, para a confirmação de viremia nos casos crônicos, na determinação da carga viral, no monitoramento da terapia e para determinar as características genéticas dos isolados do vírus. A detecção do DNA do vírus é considerada a prova mais confiável da existência de replicação e infecciosidade viral. O DNA pode ser detectado antes do surgimento de evidências bioquímicas, persistindo tanto no curso da doença aguda como da crônica (ROSSETTI et al., 2006).

Atualmente, a técnica mais empregada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), um método rápido, direto e extremamente sensível. Uma PCR é considerada sensível quando é capaz de detectar entre 10 e 100 cópias do vírus por mililitro de soro. Os genes S e C são geralmente usados como alvos da amplificação por PCR por serem as regiões mais conservadas do genoma viral. A técnica de PCR, entretanto, varia em sensibilidade e especificidade, estando sujeita a resultados falso-positivos e falso-negativos. Dessa forma, sua padronização é de fundamental importância antes do emprego em análises de rotina (HODINKA, 2006).

Os testes moleculares têm contribuído também para a identificação de DNA do VHB em indivíduos HBsAg-negativos. Esses casos ocorrem devido à presença de mutações nas regiões pré-S/S do vírus, resultando na produção de vírus mutantes. Nesse tipo de infecção, caracterizada como oculta, além de o HBsAg não ser detectado, o vírus não é reconhecido por anticorpos neutralizantes, podendo inclusive escapar de uma resposta imune induzida por vacina (SALDANHA, 2001).

Para análises moleculares, podem ser utilizadas amostras de soro, de plasma ou tecido. Entretanto, as duas primeiras são preferencialmente escolhidas, devendo ser removidas assepticamente. O plasma pode ser obtido a partir de sangue total coletado com os anticoagulantes EDTA ou citrato de sódio. Já a utilização de heparina deve ser evitada, pois é um potente inibidor da PCR. Tanto o soro quanto o plasma, se não forem processados imediatamente, devem ser congelados em temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$ . A manutenção das amostras clínicas à temperatura ambiente por longos períodos, ou repetidos congelamentos e descongelamentos, deve ser evitada. (VAN DEURSEN, 2005).



A genotipagem é utilizada para caracterizar os isolados variantes do VHB. O genótipo do VHB pode ser definido com base na seqüência do gene S. O exame da diversidade genômica é importante para avaliar rotas de transmissão, reatividade sorológica, patogenicidade, virulência e resposta a terapias antivirais. Os métodos, moleculares mais empregados são: (a) PCR com oligonucleotídeos genótipo-específicos, (b) polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), (c) hibridização reversa (LIPA – Imunogenetics) e (d) seqüenciamento do genoma (ROSSETTI et al., 2006).

## **2.4 Método Direto**

Os avanços da biologia molecular, nos últimos 20 anos, têm ampliado muito o conhecimento sobre a infecção sobre VHB e a carcinogênese viral. O domínio das técnicas de biologia molecular usadas na detecção do VHB é necessário para qualquer discussão sobre malignidades associadas ao VHB, já que cada técnica apresenta características únicas com impacto significativo na sensibilidade e especificidade da mesma.

As diferenças de seletividade/especificidade, assim como as contaminações entre as várias metodologias de detecção, têm por vezes, dificultado a determinação de associação entre o VHB e os tipos de câncer humano (LAI et. al., 2003).

O método ideal de detecção do VHB deve estar baseado na presença de DNA-VHB já que o vírus não precisa estar intacto para induzir doença. A utilidade clínica destes métodos ainda precisa ser determinada, mas seu uso em pesquisas básicas é crucial (ROSSETTI et al., 2006).

### **2.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

PCR consiste em reação de síntese de regiões específicas de DNA em ciclos específicos. A cada ciclo, o número de fragmentos amplificados é duplicado, e, conseqüentemente, após 30 ciclos, uma molécula é amplificada em mais de um bilhão de vezes (ROCHE, 1999).

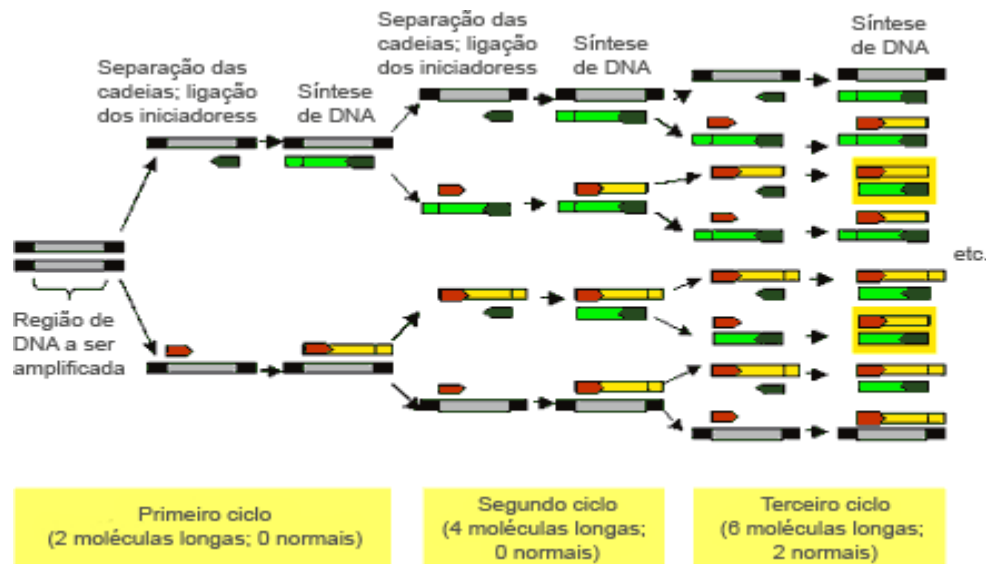


Figura 4: PCR – Amplificação de DNA in vitro.  
 FONTE: <http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>

A síntese de DNA (polimerização de desoxirribonucleotídeo) é catalisada por uma DNA-polimerase termoestável, a partir de um par de oligonucleotídeos sintéticos que funcionam como iniciadores (também conhecidos como *primer*) da síntese. Os iniciadores são pequenos segmentos de DNA fita simples, com cerca de 20 nucleotídeos de tamanhos, que são sintetizados em equipamentos destinados a esse fim, e cuja seqüência deve ser complementar às seqüências que delimitam a região de DNA (locus) que se deseja amplificar (em geral, a região de um gene específico). Portanto, para que os iniciadores possam ser sintetizados, deve-se conhecer previamente a seqüência de nucleotídeos da região ou do gene que se quer amplificar. É necessário um par de iniciadores, pois cada um delimita um dos lados da região a ser amplificada (INNIS et. al., 1990).

A PCR é realizada em três etapas, repetidas, em média, por 25 a 30 ciclos. Cada etapa é desenvolvida a uma temperatura à sua maior eficiência. As etapas são: (1) **desnaturação** do DNA, tipicamente realizada a uma temperatura próxima a 95°C; (2) **anelamento** dos iniciadores ao DNA-molde (por pareamento de bases), que ocorre a uma temperatura em geral entre 40 e 70°C; e (3) **extensão**, que corresponde à síntese de DNA pela DNA-polimerase, usualmente a 72°C (INNIS et. al., 1999).

A amplificação da região-alvo se dá após uma série de 25 a 30 ciclos, onde cada ciclo consiste na realização de três etapas supramencionadas. A ciclagem ocorre de forma automatizada em um equipamento apropriado para esse fim, chamado de termociclador. Os produtos formados a cada ciclo servem como DNA-molde para a produção de novas moléculas de DNA, e por isso, a amplificação ocorre exponencialmente, duplicando a quantidade de produto formado a cada ciclo. O produto final da reação, após todos os ciclos serem completados, é chamado de **amplicon**. O amplicon consiste em um fragmento de DNA dupla fita, cujas extremidades são definidas pela extremidade 5' de cada um dos iniciadores, cujo o tamanho é dado pela distância entre estes, tomando como referência a localização da sua seqüência no DNA-molde original. A forma mais usual de visualização do amplicon é através da realização de uma eletroforese em gel de agarose, posteriormente corado com brometo de etídeo seguida de observação em um transiluminador de luz ultravioleta (ROSSETTI et al., 2006).

A PCR é realizada em microtubo, em um volume que varia entre 10 e 50  $\mu$ L. Ele deve conter os *primers*, uma DNA-polimerase termoestável, os quatro desoxirribonucleotídeos (que serão incorporados a partir dos iniciadores pela DNA-polimerase), DNA-alvo (local que serve como molde inicial para a amplificação) e um tampão apropriado, cujo principal componente é o  $MgCl_2$  (VAN DEURSEN, 1998).

Essa técnica apresenta a vantagem de poder ser utilizada mesmo quando pequenas quantidades de DNA-alvo estão presentes. Através dela, é possível detectar a presença apenas de uma molécula de DNA da amostra. Isso torna essa técnica extremamente sensível no caso de diagnóstico molecular de doenças infecciosas, uma vez que nem sempre é possível obter amostras biológicas com grandes quantidades do agente infeccioso. Além disso, é um método de detecção direta, pois detecta a presença do material genético do próprio agente infeccioso na amostra analisada (ROSSETTI et al., 2006).

#### **2.4.2 Semi-nested PCR**

*Nested* PCR é uma PCR em que o DNA-molde utilizado é o produto de uma amplificação anterior. Nessa segunda amplificação, utilizam-se dois iniciadores, cuja região de anelamento para

cada um deles é interna ao produto de PCR gerado na primeira amplificação. O *amplicon* do *nested* PCR é, portanto, obrigatoriamente menor que o da primeira amplificação. Essa técnica é utilizada quando é necessário aumentar a sensibilidade da reação. Pode-se, por exemplo, utilizar um par de iniciadores para amplificar uma região específica de um gene de um gênero de bactérias e, posteriormente, realizar um *nested* PCR para determinar a(s) espécie(s). Em alguns casos, é possível utilizar, na segunda PCR, apenas um iniciador interno associado com um dos iniciadores utilizados na primeira reação (*semi-nested* PCR) (ROCHE, 1999).

### **2.4.3 Eletroforese em gel de agarose**

Eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato das moléculas também influi, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel (AUSUBEL et. al., 1997).

## **2.5 Co-infecção VHB-HPV**

Nos últimos anos, tem havido um grande interesse da comunidade científica a respeito do impacto da co-infecção de agentes virais, de bactérias, de fungos e de parasitos no curso da infecção em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Sabe-se que a possibilidade desta co-infecção, aumenta a importância diante do controle das DST (FERREIRA, 2000).

Na região Norte e especialmente no Amazonas, temos uma alta incidência de câncer de colo uterino que diferentemente dos outros locais do país ultrapassa os índices do câncer de mama. A literatura relata como fator de risco para o Câncer de colo de útero a infecção pelo HPV (GROSS & BARRASSO, 1999; zur HAUSEN, 1996; RIVOIRE et al., 2001; SCHIFMAN et al., 2005; SOLIMAN et al., 2005; WARTON & TORTOLERO-LUNA, 2000). Em Manaus, dados da

FCECON revelam que em 2002, de 1004 mulheres diagnosticadas com câncer, 533(53%) tinham câncer de colo de útero, ocupando o primeiro lugar em casos de câncer em mulheres. Num estudo realizado por Corrêa (2005), em 40 pacientes com câncer de colo de útero in situ ou invasivo, 100% apresentaram DNA do HPV.

Sabe-se que os agentes de DST estão associados a doenças que provocam lesões em todos os órgãos e sistemas do organismo humano. Não bastasse isso, as pesquisas mais recentes sugerem participação viral na gênese de 15% dos neoplasmas malignos de diferentes localizações anatômicas. Há estimativas de que 20% dos casos de câncer em humanos estejam associados com o vírus da hepatite C, com o vírus tipo 1 da leucemia de células T, com o vírus Epstein-Barr, com o vírus da hepatite B ou com certos tipos de papilomavírus humano (CAMARA et al., 2002).

Dentre as neoplasias malignas com gênese viral, 80% correspondem aos carcinomas da cérvix uterina associados ao Papiloma vírus humano (HPV) e hepatocarcinomas, ao vírus da hepatite B.

Entretanto, o efeito destas associações ainda é incerto (NADAL, 2004). Madjar et al. (1996) usando o método de ELISA analisaram material uretral e endocervical de 103 pacientes de ambos os sexos e detectaram que 8% dos pacientes eram soropositivos para o VHB.

Siu et al. (2007), partindo da hipótese que pacientes com lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina tem uma maior probabilidade de desenvolver a doença crônica quando portadores do VHB, testaram 288 pacientes com carcinoma cervical e 242 pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau (NIC III) além de 311 mulheres sem anormalidades citológicas. No grupo com câncer verificou-se uma prevalência de 21,4%, no grupo com NIC III 24,1% e 10,6% no grupo sem anormalidades. Este resultado mostrou significância estatística e sugere que outros estudos devam ser conduzidos na tentativa de explicar tal associação que, pode estar ligada a uma deficiência no mecanismo imunológico destas pacientes. As mulheres têm risco duas vezes maior que os homens de adquirir alguma DST de um parceiro infectado do que o inverso. Assim, os efeitos destas doenças nas mulheres são muito mais severos, e as seqüelas resultantes destas infecções são significativamente mais sérias (SCIARRA, 1997).

A investigação do VHB na cérvix uterina de pacientes com lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina é um fator importante para que possamos verificar se há agentes infecciosos que podem estar agindo concomitantemente com outros agentes de DST como HPV, potencializando a

transformação maligna. Embora, a relação temporal entre a ocorrência desta infecção e o desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial cervical permanece ainda obscura, assim como a influência de outros fatores de risco, tais como a presença de infecções vaginais, de outras doenças sexualmente transmissíveis e da importância relativa do tipo de HPV (KOUTSKY et al., 1992).

Apesar do importante papel etiológico da infecção pelo HPV no desenvolvimento do câncer cervical, a presença do vírus, por si só, não é suficiente para a ocorrência da doença. Outros cofatores ainda não muito bem conhecidos, tais como a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, como o VHB, *Chlamydia Trachomatis* e infecções do trato genital inferior, poderiam estar associados à evolução e à história natural da doença, conseqüentemente a vulnerabilidade das mulheres para estas infecções (HERNANDEZ-GIRON, 1998).

Apesar de sua importância clínica potencial, a prevalência da infecção pelo VHB tanto como uma DST quanto carcinogênica ainda é desconhecida. Várias investigações mostraram que a região Amazônica é caracterizada como uma das regiões do mundo de maior ocorrência da doença e suas conseqüências, justificando dessa forma o alto índice de soro-positividade para o ADN do VHB nesta região, fomentando cada vez mais estudos nessa área de pesquisa.

Além disso, em nossa região não dispomos de estudos relativos a essa nova entidade clínica. Assim, faz-se de grande necessidade o conhecimento da prevalência da hepatite B em nosso meio, da presença de co-infecção com outros vírus e de fatores correlatos caracterizando até que ponto as hepatites crônicas, os hepatocarcinomas, os cânceres de colo de útero, e outras neoplasias possam corresponder à hepatite B, para melhor compreender o seu papel patogênico e suas repercussões clínicas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Detectar o vírus da hepatite B em amostras endocervicais utilizando a técnica da reação em cadeia de polimerase – PCR.

#### **3.2 Específico**

- Verificar a faixa etária das pacientes portadoras de lesões cervicais pré-malignas ou malignas e que possuem VHB;
- Relacionar a frequência de VHB com a detecção de HPV;
- Relacionar a frequência de HPV, VHB e a lesão da paciente.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Modelo de estudo**

Este é um estudo descritivo transversal analítico no qual foram analisadas variáveis de exposição e o resultado da PCR para detecção do VHB, no qual visou investigar a frequência do vírus da Hepatite B em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na FCECON-AM.

### **4.2 Amostras**

Foram utilizadas as amostras do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM, cujo diagnóstico para HPV já foi realizado em dissertação de mestrado anterior e que fazem parte do projeto PPP intitulado “Importância do diagnóstico molecular no contexto das doenças sexualmente transmissíveis”, do qual a orientadora e colaboradora fazem parte. O projeto foi aprovado pelo CEP-UFAM em 05 de julho de 2008, com CAAE nº 0188.0.115.000-07.

Para obtenção destas amostras foi coletado o material cervical de mulheres participantes de estudo passado, totalizando 164 mulheres.

### **4.3 Procedimentos**

#### **4.3.1 Obtenção das amostras**

As amostras foram coletadas utilizando escovas endocervicais descartável tipo *cito-brush*, obtendo raspados da endocérvice no qual foram colocados em 400µL de TE. As amostras foram mantidas a -20° C. Em seguida, descongelou-se as amostras à temperatura ambiente adicionando



aos 400 µL da amostra, 400 µL da solução Tampão Proteolítico (TPK); que tem como objetivo digerir grande parte das proteínas presentes. Posteriormente, incubou-se esta mistura em banho-maria a 56°C por 1 hora e depois ferveu por 10 minutos. As amostras foram mantidas em banho de gelo até serem encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sendo armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA e execução dos procedimentos da PCR.

### **SOLUÇÕES:**

**TE:** Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH8,0

**TPK:** 900 µL de TE (Tris HCl 50 mM + EDTA 1 mM ) pH 8,0

100 µL de Tween 20%

20 µL de proteinase K 10 mg/ml

### **4.3.2 Diagnóstico Molecular do vírus da Hepatite B**

As etapas executadas no laboratório de Diagnóstico Molecular estão organizadas no fluxograma a seguir:

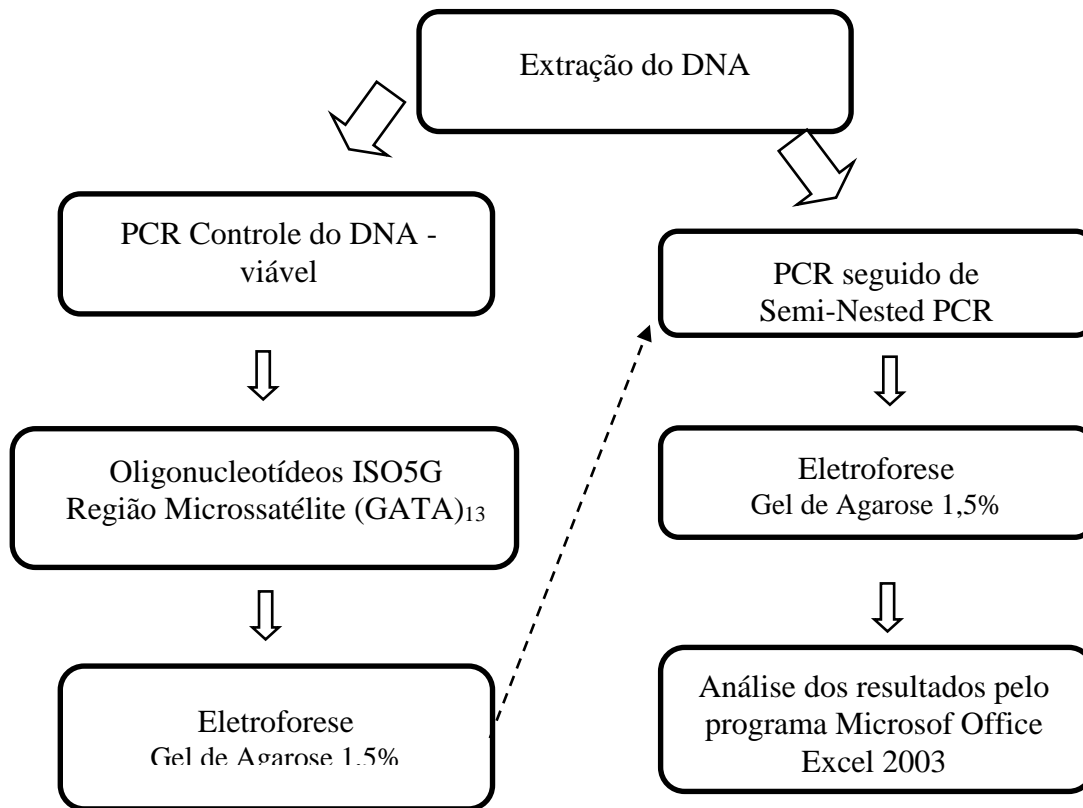


Fig. 05: Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM.

### 4.3.3 Extração do DNA do VHB

Após a digestão com proteinase K, as amostras endocervicais foram submetidas à extração do DNA do VHB pelo método fenol/clorofórmio (KARASSAWA et al., 1995), modificado por Oliveira et al., 2001.

Inicialmente, adicionou-se 400µL de Fenol Hidratado a 400µL da amostra que foi previamente digerida com proteinase K. Homogeneizou-se suavemente por 10 minutos seguidos de centrifugação a 12.000 rpm. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante e adicionou 400 µL de Fenol:Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1). Homogeneizou-se essa mistura por 10 minutos e a seguir centrifugou a 12.000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de ensaio e adicionou 400 µL de Clorofórmio Hidratado 1:1, agitou-se por 10 minutos e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Após a coleta do sobrenadante, para a

precipitação do DNA viral adicionou-se 1/10 (10%) do volume do sobrenadante de NaCl 3M e 1000 µL de Etanol Absoluto Gelado. Deixou precipitar a -20°C por 12 horas.

No dia seguinte, pegou-se o material precipitado e centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 minutos, descartando o sobrenadante cuidadosamente. Lavou-se o sedimento de DNA (*pellet*) com 500µL de Etanol a 70% Gelado, centrifugou a 8.000 rpm por 10 minutos e, em seguida, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Após centrifugação, secou o sedimento por aproximadamente 40 minutos no fluxo laminar e, ressuspendeu o sedimento de DNA com 50µL de água Milli-Q.

#### 4.3.4 Amplificação controle do DNA

Para confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado nas amostras para as reações de PCR, utilizou-se um par de oligonucleotídeos, amplificando uma região microsatélite (GATA)<sub>13</sub> do cromossoma 15 humano – ISO5G (PONTES, 2003).

O sistema de reação foi composto de:

Reagentes	Volume
Volume final	20 µL

As reações de PCR foram realizadas com 40 ciclos de amplificação em aparelho termociclador *Applied Biosystems /Veriti 96 Well Thermal Cycler*, conforme o seguinte programa: quarenta segundos à 94°C para desnaturação, um minuto à 62°C para anelamento e um minuto e trinta segundos à 72°C para a síntese. Após os 40 ciclos, seguiram-se por uma hora a 60°C para extensão.

Após a amplificação com ISO5G, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5 % (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 100pb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas correspondentes a 265pb (PONTES, 2003) foram reveladas por luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

### **4.3.5 Amplificação do gene S por PCR**

#### **4.3.5.1 Estratégia para amplificação do gene S**

Para primeira PCR foram utilizados os iniciadores 2821 e 783 (OLIVEIRA et al., 2001), seguida de *semi-nested* PCR que amplificam o seguimento genômico S inteiro. A partir dessa primeira reação foi feita *semi-nested*, para a região S com os iniciadores P1 e 783. O sistema de PCR foi o mesmo, tanto para primeira, quanto para segunda reação, com exceção dos iniciadores e a quantidade de DNA. Na primeira reação foram utilizados os iniciadores 2821 e 783. Na segunda reação (*semi-nested* PCR) foram utilizados 1µL do produto de PCR da primeira reação com os iniciadores P1 x 783 e o sistema das reações de PCR foram preparadas tal como descrito a seguir:

#### Preparo das amostras:

Reagentes do sistema

- Tampão 10X PCR ..... 2,,5 µL

Abaixo, encontra-se esquematizada a estratégia utilizada na amplificação do gene S por semi-nested PCR.

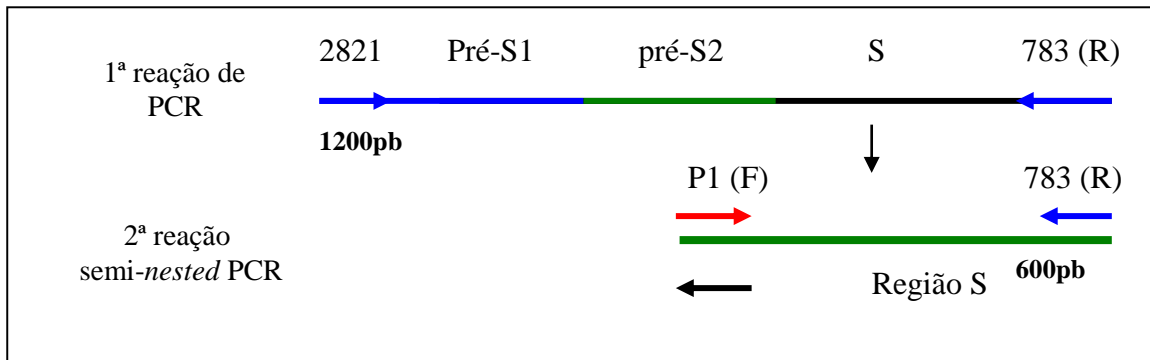


Figura 06- Estratégia do sistema semi-nested PCR para amplificação do gene S completo.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% e esperou-se obter um produto de 1200pb resultante da primeira amplificação (2821 x 783) e um produto de 680pb resultante da reação semi-nested PCR (P1 x 783) (OLIVEIRA , 2001).

#### **4.3.6 Eletroforese em gel de agarose 1,5%**

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 100pb da Invitrogen Life Technologies. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (1,0µg/mL) por vinte minutos, onde observou-se um produto de PCR correspondente a 680 pb sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

#### **4.4 Avaliação dos dados epidemiológicos obtidos**

A prevalência do VHB encontrada nas amostras foi analisada em gráficos, tabelas e proporções, relacionando-se com a frequência de positividade e as características como idade e dados do questionário sócio-econômico realizado com os resultados encontrados. Estes dados foram avaliados no programa Microsoft Office Excel 2003.

#### **4.5 Critério de inclusão e exclusão das amostras**

As amostras utilizadas foram incluídas se, após a PCR para DNA genômico, comprovassem viabilidade. Já o critério de exclusão levou em consideração a integridade da amostra, bem como a quantidade da mesma para proceder com a PCR. Uma vez escassas as amostras tanto extraídas quanto as frescas, as mesmas eram descartadas do estudo por ausência de estoque.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade das amostras

Foram processadas 164 amostras para verificar a viabilidade das mesmas através do PCR para DNA genômico. Todas as amostras foram viáveis (Figura 08), nas quais foram encaminhadas ao procedimento da PCR para VHB.

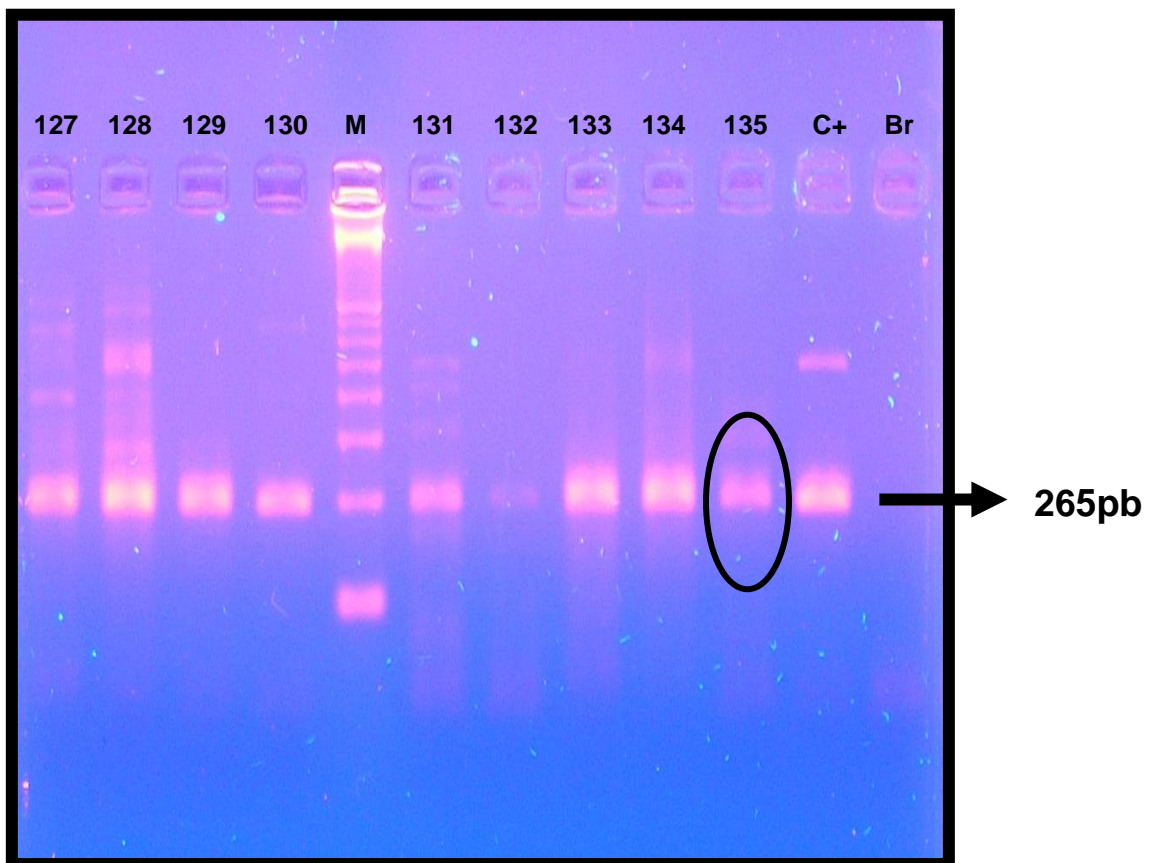


Figura 07 Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% evidenciando-se um fragmento de 265 pb resultante da amplificação do gene da Golgina localizado no cromossomo 15 humano nas reações 17, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135/Marcador (M) = 100 pb; C+13A= Controle positivo; Br = Branco.

## 5.2 Hepatite B e lesões pré-malignas e malignas

Dentre as 153 amostras cervicais de pacientes apresentando lesão pré-maligna ou maligna analisadas, 14,38% (n = 22) foram positivas para a presença de VHB.

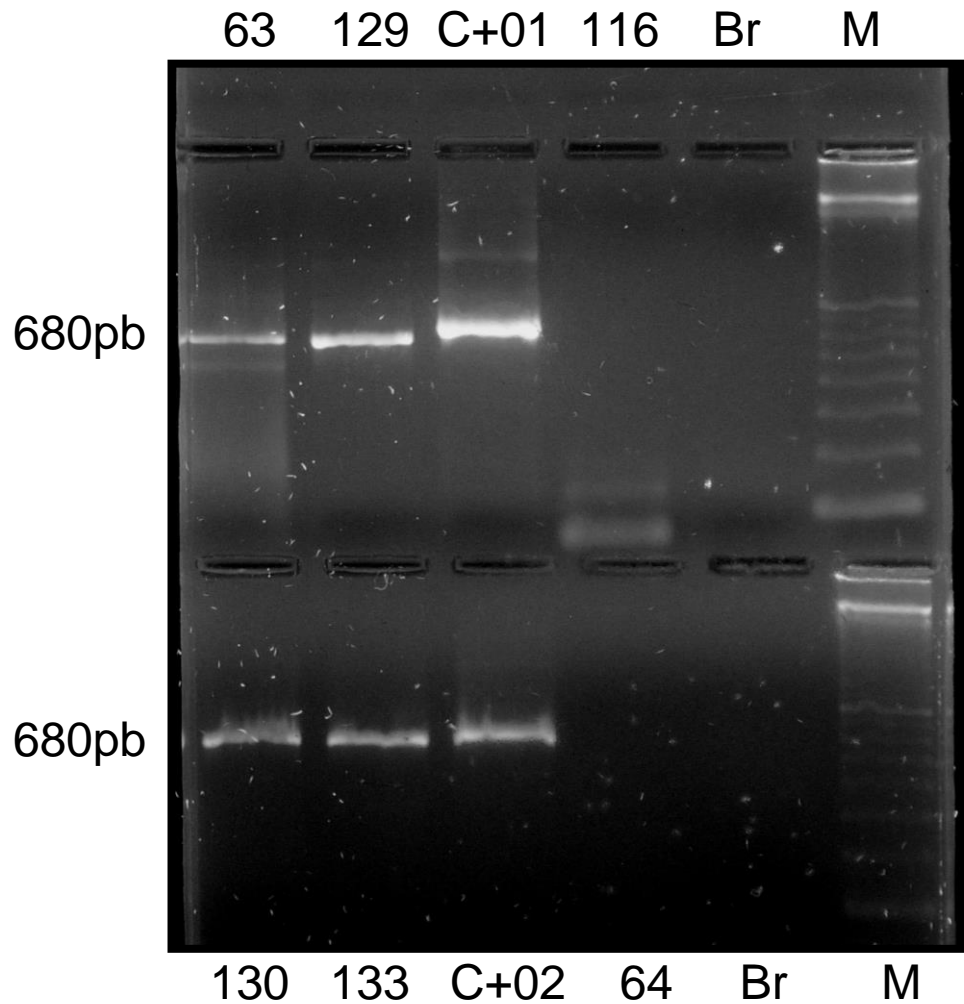


Fig. 08 Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo, evidenciando-se um fragmento de 680pb resultante da amplificação por *Semi-Nested* PCR do gene S do genoma do VHB, localizado nas reações 63, 129, 130 e 133. Amostras negativas = 64 e 116; Marcador (M) = 100 pb; C+01 = 1926(Controle positivo), C+02 = VHB (Controle positivo); Br = Branco.



### 5.3 Faixa etária

A faixa etária das pacientes do estudo variou entre os 17 aos 78 anos, no qual a predominância de idade entre as pacientes que apresentaram positividade para VHB (n = 22) variou entre os 27 a 56 anos.

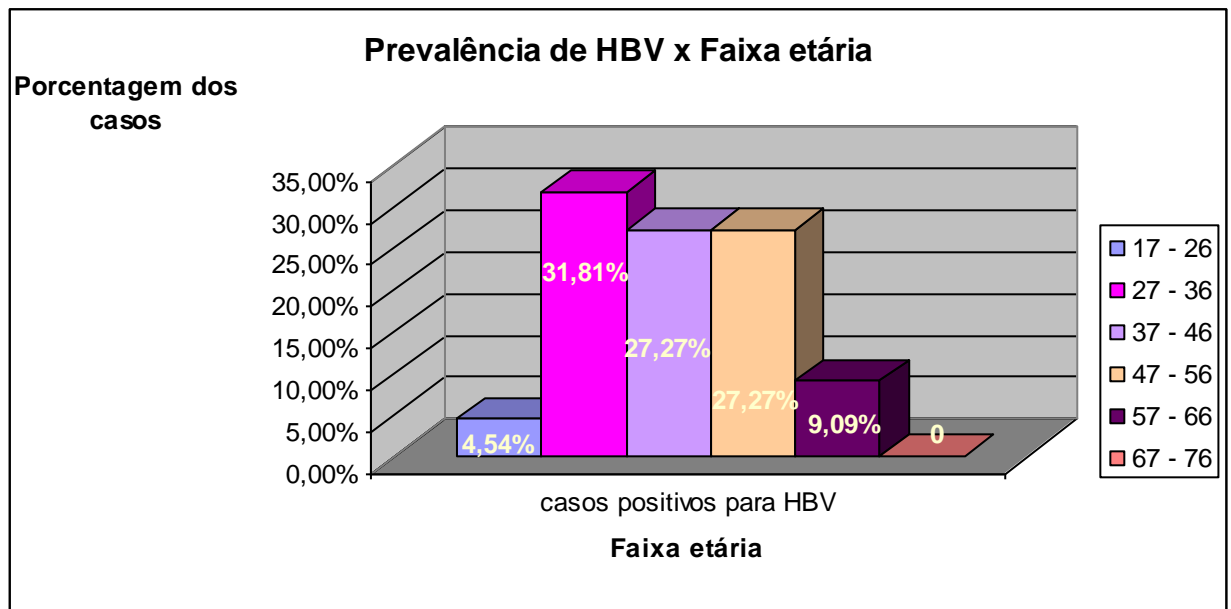


Gráfico 01. Distribuição das pacientes portadoras de Hepatite B com lesões cervicais pré-malignas ou malignas quanto à faixa etária.

### 5.4 Tipo de lesão

Das 22 amostras positivas para VHB, os tipos de lesões foram diversificadas, como apresenta o quadro a seguir:

Variável	Lesões	Total

Tabela 01. Frequência do vírus da Hepatite B nas amostras de mulheres com diferentes tipos de lesões do colo do útero.

Adeno: adenocarcinoma; CA: carcinoma de colo de útero; HSIL: Lesão intra-epitelial de alto grau; LSIL: Lesão intra-epitelial de baixo grau.

### 5.5 Co-infecção com HPV

Dentre as 153 amostras analisadas, 14,38% (n = 22) resultaram em positividade para o VHB, sendo que em estudo anterior (FERREIRA, 2007), já fora comprovada uma frequência de 97% (n = 149) para o HPV-DNA nessas amostras. Não foi verificada presença de VHB em amostras HPV-negativas.

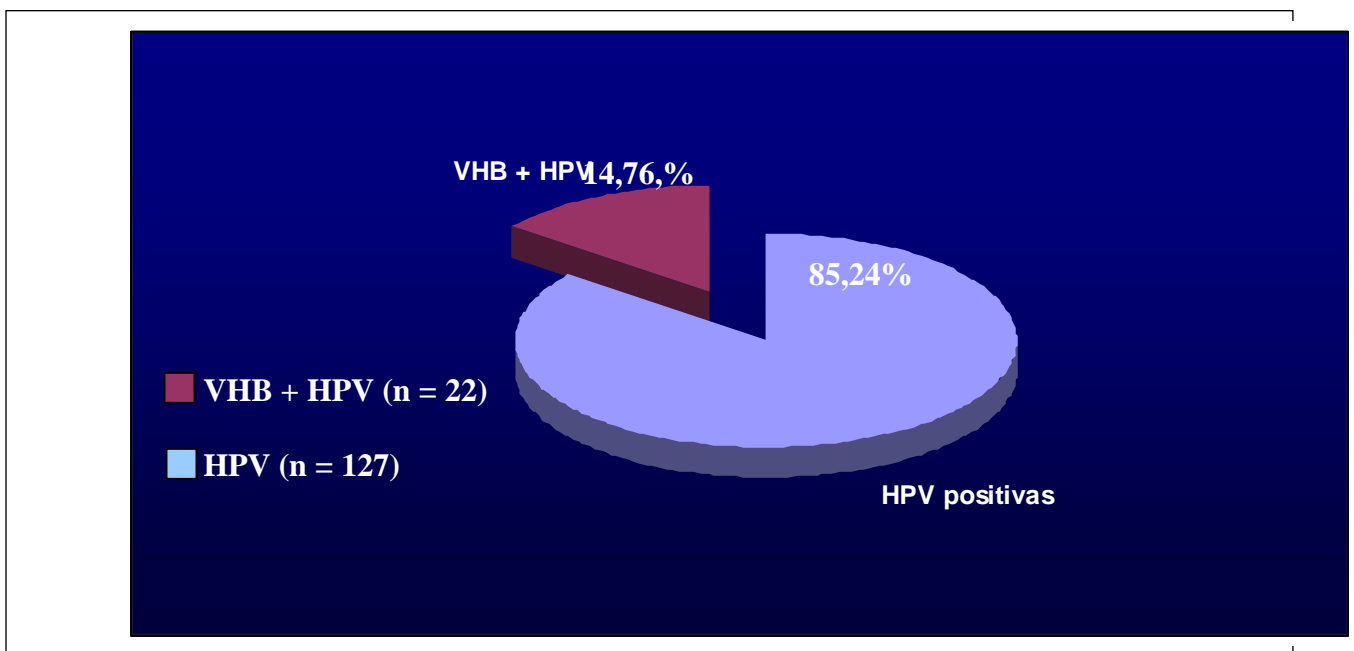


Gráfico 02 - Prevalência de co-infecção de VHB com HPV em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas.

## 6. DISCUSSÃO

A presença do VHB na endocérvice pode indicar um fator predisponente ao câncer de colo de útero, uma vez que atuando concomitantemente no mesmo sítio de infecção que o HPV, o VHB pode desencadear inúmeras injúrias à mucosa (BARROS JÚNIOR et al., 2008).

Sabe-se que, atualmente, existem evidências crescentes que pacientes com esse perfil podem também vir a desenvolver doença hepática crônica ou transmitir a doença para outros indivíduos (WEBER, 2005).

Conduziu-se um estudo em mulheres com lesões de colo de útero definidas histopatologicamente e com positividade para HPV comprovada molecularmente pela PCR, onde verificou-se a presença do DNA do VHB em 153 amostras de pacientes com esse perfil.

Das 153 amostras submetidas à reação da PCR, vinte e duas ( $n = 22$ ) revelaram-se positivas para o ADN-VHB. Todas as 22 amostras positivas para VHB eram também positivas para HPV. A frequência encontrada neste estudo é de suma importância, pois ressalta que agentes infecciosos podem estar agindo concomitantemente com outros agentes de DST, como com o HPV na cérvice uterina, embora a relação entre a ocorrência desta infecção e o desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial cervical permaneça ainda obscura (KOUTSKY et al., 1992).

Dentre as neoplasias malignas com causa viral, 80% correspondem aos carcinomas da cérvice uterina e hepatocarcinomas, que são conhecidos pelas associações entre o Papilomavírus humano (HPV), o vírus da hepatite B e outras DST. Entretanto, o efeito destas associações ainda é incerto (NADAL, 2004).

Como as taxas de hepatite B na Amazônia são de 8%, a frequência esperada deste vírus nas amostras estudadas ficou acima dos valores relatados para as taxas de VHB da região, ou seja, de 14,38%. Dados de estudos com detecção de VHB em material endocervical são escassos.

Madjar et al. (1996), usando o método de ELISA, analisaram material uretral e endocervical de 103 pacientes de ambos os sexos e detectaram que 8% dos pacientes eram soropositivos para o VHB.

Um fator poderia justificar a diferença entre a frequência encontrada no presente estudo (14,38%) e no estudo de Madjar et al. (1996): a metodologia utilizada no presente estudo, PCR, é considerada extremamente sensível (HODINKA, 2006), mesmo quando se considera, segundo a Asociación Panamericana De Infectología (2005), que a concentração do VHB é 100 a 1.000 vezes mais baixa na secreção vaginal que no soro, foi demonstrado, por este trabalho, que a PCR para análise destes fluidos foi eficiente.

Siu et al. (2007) sugeriram que pacientes com lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina têm uma maior probabilidade de desenvolver a doença crônica quando portadores do VHB, o que implica numa maior suscetibilidade das pacientes estudadas a esta doença, pois todas possuíam algum grau de lesão do colo do útero. Por outro lado, considerando que o VHB é um vírus de alto poder oncogênico, suspeita-se de sua participação no desenvolvimento do câncer de colo de útero, de alguma forma, potencializando a ação de HPV de alto risco, já que seu DNA foi encontrado no material cervical.

Segundo Ferreira (2000), o alto poder infeccioso do VHB presente no sêmen e nas secreções vaginais facilita a passagem de partículas infectantes através das superfícies mucosas, durante a relação sexual. Além disso, com a hipótese do envolvimento do VHB potencializando o HPV na geração do carcinoma cervical, futuros estudos neste sentido poderiam melhor compreender o seu papel patogênico e suas repercussões clínicas em relação à co-infecções (BARROS JÚNIOR et. al., 2008).

## 7. CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou uma frequência de VHB de 14,38% em amostras endocervicais de mulheres com lesões pré-malignas e malignas, apontando para uma eficiência do método de PCR para determinar este vírus no material biológico utilizado.
- Em relação à co-infecção de VHB-HPV, de 149 amostras HPV-positivas, 22 amostras foram positivas para HBV. Não foi encontrado VHB em amostras HPV-negativas.
- A idade predominante entre as pacientes que apresentaram positividade para VHB (n = 22) variou entre os 27 a 56 anos.
- A frequência encontrada quanto ao tipo de lesão foi diversificada, com predominância de adenocarcinoma (66,66%), seguido de 15,38% de LSIL, 14,28% de carcinoma e 12,93% de HSIL.

## 8. REFERÊNCIAS

ALLAIN JP. **Occult hepatitis B virus infection.** *Transfusion Clinique et Biologique* 11:18-25, 2004.

ASSOCIACIÓN PANAMERICANA DE INFECTOLOGIA. **Manual de vacinas da América Latina.** Madrid, 2005. p. 127-132.S

AUSUBEL, F.M. et al. (Ed.) **Current protocols in molecular biology.** New York: John Wiley & Sons, 1997.

BARRETT, C.L, et al. **Risk factors for hepatitis B virus infection among women attending a clinic for sexually transmitted diseases.** *Sex. Transm. Dis.*, 19:14-8, 1992.

BARROS JÚNIOR, G. M., et al. **Hepatite crônica B oculta: prevalência e aspectos clínicos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia Ocidental Brasileira.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2008, vol.41, n.6 ISSN 0037-8682.

BRAGA, W. S. M., et al. **Co-infecção humana pelo plasmódio e o vírus da hepatite B: aspectos clínicos, sorológicos e imunológicos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Fev 2006, vol.39, no.1, p.27-31. ISSN 0037-8682

BENSABATH, F., et al. **Epidemiologia na Amazônia Brasileira.** In Focaccia R. *Tratado das Hepatites Virais.* São Paulo: Atheneu; 2003. p. 11-26.

CAMARA, G. N. N. de L., et al. **Os papilomavírus humanos – HPV: Carcinogênese e imunogênese.** *Universitas Ciências da Saúde:* 2002, vol.01 n.01 - pp. 159-168.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminanting transmission in the United States through universal childhood vaccination (ACIP) Management.** *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1991; 40: (nºRR-13) 1-25.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Division of Sexually Transmitted Diseases.** April, 2001. Disponível em:

[http://www.cdc.gov/nchstp/dstd/Fact\\_Sheets/chlamydia\\_facts.htm](http://www.cdc.gov/nchstp/dstd/Fact_Sheets/chlamydia_facts.htm). Acesso em: 22 Jun. 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention – 1998. **Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases: Morb. Mortal.** Wkly. Rep. 47,1998. p.1-116.

CHEMIN I, Zoulim F, et al. **High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology.** Journal of Hepatology 34:447-454, 2001.

CONJEEVARAM, HS, Lok AS. **Occult hepatitis B virus infection: a hidden menace?** Hepatology 34:204-206, 2001

EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 2002, Geneva, Switzerland. **Consensus statement (short revision) Journal of Hepatology**, Copenhagen, 38: 533-540, 2003.

FERREIRA, Cristina Targa, SILVEIRA, Themis Reverbel da. **Viral Hepatitis: epidemiological and preventive aspects.** Revista Brasileira de epidemiologia, 2004, vol.7, no.4, ISSN 1415-790X2. Similarity: 0.371842.

FERREIRA, Marcelo Simão. **Diagnosis and treatment of hepatitis B.** Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical, 2000, vol.33, no.4, ISSN 0037-86822. Similarity: 0.418571.

FOCACCIA, R., et al. **Prevalência das Hepatites Virais em São Paulo.** In. Focaccia R. *Tratado das Hepatites Virais.* São Paulo: Atheneu; 2003. p. 3-10

FRANCISCO, J. D. S., et al. **Prevalência e fatores associados a marcadores do vírus da hepatite B em população rural do Brasil central.** Revista Brasileira de Saúde Pública: Washington, vol.10, nº 06, Dec. 2001. Disponível em: [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1020-49892001001200004](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892001001200004). Acesso em: 12/04/08.

Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas – FCECON – AM. **Registro Hospitalar do Câncer. Dados dos registros de base hospitalar.** Ano 2002.

GROSS, G.E.; BARRASSO, R. **Infecção por Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV;** trad. Maria Alice Guimarães. Porto Alegre. Editora Artes Médicas Sul Ltda., 1999. 431p.

HERNANDEZ-GIRON, C.A. **Prevalence and risk factors associated with siplys in woman.** *Rev Saúde Pública* 1998; 32:579-86.

HODINKA, R.L. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. In: SPECTER, S. (Ed.). **Viral Hepatitis: diagnosis, therapy and prevention.** New jersey; Human Press, 1999. p.193- 249.

- INNIS, M.A. et al. (Ed.) **PCR protocols. A guide to methods and applications.** San Diego academic Press, 1990, 482p.
- INNIS, M.A., et al. (Ed.) **PCR applications: protocols for functional genomics.** San Diego: Academic Press, 1999. 566p.
- KOUTSKY, L. **Epidemiology of genital human papilomavirus infection.** Am J Med 1997 May 5;(5A):3-8.
- LAI, C.L., et al. **Viral hepatitis B.** Lancet, London, 363:208-2094, 2003.
- MADJAR, S., et al. **Diagnostic and therapeutic approach to sexually transmitted diseases.** Harefuah: 1996 Jun 16; 130(12): 811-4, 880, 879.
- MAYNARD, J.E., et al. **Control of hepatitis B by immunization: Global perspectives.** In: ZUCKERMAN, A.J., (ed.) - **Viral hepatitis and liver disease.** New York: Alan R Liss, 1988. p.967-9.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Programa Nacional de Hepatites Virais. **Avaliação da Assistência às Hepatites Virais no Brasil.** Brasília; 2002, 1-61 .
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Programa Nacional Para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais.** Disponível no endereço: <http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite.htm>. Acesso em 11/04/2008
- MIZOKAMI, M., et al. **Hepatitis B virus genotypes assignment using restriction fragment length polymorphism patterns.** FEBS Letters, Amsterdam, 450:66-71, 1999.
- MULLIS, K.B., et al. **A polymerase catalyzed chain reaction.** In: WU, R. (Ed.) **Methods in Enzymology: recombinant DNA – part F.** San Diego: Academic Press, 1987. p.335-350.
- NADAL, S.R., et al . **Os Agentes Sexualmente Transmissíveis e o Câncer Anorretal.** Revista Brasileira Coloproct, 2004; 24(3):274-277.
- NIEL, C., et al. **Genetic diversity of Hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Medical Virology, New York, 44:180-186, 1994.
- OLIVEIRA, C. M.C. **Variabilidade genética do gene de superfície do vírus da hepatite B (VHB) em portadores naturais da Amazônia brasileira.** São Carlos: UFSCar, 2001. Dissertação



(Mestrado em Genética e Evolução), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2001.

PATERLINI, P., et al. **Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 21:313-321, 1995.

PELEGRINI, Andréia, et al. **Incidência da infecção e de fatores de risco para os vírus das hepatites B e C em diferentes populações e a associação com diagnóstico sorológico, bioquímico e molecular.** *Revista Panamericana de Infectologia*, 2007. Disponível em: [http://www.revista-api.com/3%20educacao%202007/pgs/art\\_6.html](http://www.revista-api.com/3%20educacao%202007/pgs/art_6.html). Acesso: 09/04/2008.

ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS. **PCR applications manual.** 2<sup>nd</sup> ed. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 1999. 322p.

RIVOIRE, W. A., et al. **Bases moleculares da oncogênese cervical.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2001. 47(2): 179-84.

ROSSETTI, L. M., et al. **Doenças infecciosas: Diagnóstico Molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 112-122.

SALDANHA, J., et al., **An International collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B vírus DNA nucleic acid amplification techniques.** *Vox Sanguinis*, Basel, 80:63-71, 2001.

SCHIFFIMAN, M., et al. **The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution.** *Virology*.2005. 337: 76-84.

SCIARRA, J.J. - **Sexually transmitted diseases: global importance.** *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 58:107-19, 1997.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE - SUSAM/FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL - FMTAM (AM). **Boletim Epidemiológico Julho/Setembro**, 2002, 2003..Ano VIII, n. 30.

SILVA, C., et al. **Low rate of occult hepatitis B vírus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil.** *Journal of infection*, 51(1):24-29, 2005.

- SIU, S.S., et al. **Patients with malignant or pre- malignant cervical lesion have increased risk of becoming hepatitis B carrier.** J Exp Clin Cancer Res, 2007 26(1):77-81.
- SOLIMAN, P.T., et al. **Mechanism of cervical cancer.** Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. 2004. 1(2):253-258.
- SOS Hepatites Portugal – **Hepatite B.** Adaptado por Val Neto, 2005. Disponível em: [http://www.soshepatites.org.pt/sos/index.php?option=com\\_content&task=view&id=49](http://www.soshepatites.org.pt/sos/index.php?option=com_content&task=view&id=49). Acesso em: 13/04/08.
- SOUZA, M. G. de, et al. **Co-infecção do HIV e Hepatite B: prevalência e fatores de riscos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical: 2004, vol.37, nº.5, ISSN 0037-86822. Similarity: 0.702434.
- STRACHAN, T.; READ, A.P. **Genética molecular humana**, 2ed. Porto Alegre: AFMED, 2002. 576p.
- TEGAN, Fátima Mitiko; ARAÚJO, Evaldo Stanislau Affonso de. **Epidemiologia da Hepatite B e D e seu Impacto no Sistema de Saúde.** I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manejo da Hepatite B (e Delta). The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID): 2006; vol. 10 (Supplement 1-August).
- VAN DEURSEN, F.J. et al. **Use of PCR in resolving diagnostic difficulties potentially caused by genetic variation of hepatitis B virus.** Journal of Clinical Pathology, London, 51;149-153, 1998.
- VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P., et al.. **Prevalence and risk factors for hepatitis B virus infections among visitors to an STD clinic.** Genitourin Med., 73: 488-92, 1997.
- WASMUTH, Jan Christian; ROCKSTROH, Jurgen. **Co-infecção HIV e HBV.** HIV Medicine: edição portuguesa, 2006. Disponível em: [http://hivmedicine.aidsportugal.com/18\\_HIV\\_HBV.php](http://hivmedicine.aidsportugal.com/18_HIV_HBV.php). Acesso em: 11.01.09
- WHARTON, J.T.; TORTOLERO-LUNA, G. **Neoplasms of the Cervix.** In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R; Holland, J.F.; Frei, E. Câncer Medicine. 5<sup>th</sup> edição. Canada BC Decker inc., 2000. Disponível no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

WEBER, B., et al. **Detection of an acute asymptomatic HBSAg negative hepatitis B virus infection in a blood donor by HBV DNA testing.** *Journal of Clinical Virology* 32:67-70, 2005.

Zur HAUSEN, H. **Papillomavirus infections- a major cause of human cancers.** *Biochimica et Biophysica Acta.*1996.1288: F55-F78.

## 9. ANEXO

### 9.1 Parecer



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM



#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0188.0.115.000-07, intitulado: **“Importância do diagnóstico molecular no contexto das Doenças Sexualmente Transmissíveis”**, tendo como Pesquisadora Responsável Cristina Maria Borborema dos Santos.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 05 de julho de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM

  
.....  
Profª Drª Maria Rosa Lozano Borrás  
(Coordenadora)

Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Cep. 69.057-070 – Manaus/AM – Fone: (92) 622-2724 r. 32  
E-mail: cep@ufam.edu.br

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa