



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM  
INDÍGENAS DO EXTREMO NORTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA:  
COMPARAÇÃO ENTRE ETNIAS INDÍGENAS ISOLADAS E INTEGRADAS À  
SOCIEDADE OCIDENTAL**

**ALLEX JARDIM DA FONSECA**

**Manaus  
2015**

**ALEX JARDIM DA FONSECA**

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM  
INDÍGENAS DO EXTREMO NORTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA:  
COMPARAÇÃO ENTRE ETNIAS INDÍGENAS ISOLADAS E INTEGRADAS À  
SOCIEDADE OCIDENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para a obtenção de título de *Doutor em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador: **Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira**

Co-orientadora : **Prof<sup>a</sup> Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda**

**Manaus  
2015**

## Ficha Catalográfica

F676c Fonseca, Alex Jardim da  
Caracterização da infecção por papilomavírus humano em indígenas do extremo norte da Amazônia Brasileira: comparação entre etnias indígenas isoladas e integradas à sociedade ocidental / Alex Jardim da Fonseca. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical, 2015.  
53 f. : il.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – UEA e FMT Fundação de Medicina Tropical, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira.  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Angélica Espinosa Miranda

1. Infecção - Papilomavírus – Mulheres indígenas 2. Prevenção – Câncer - Colo útero I. Título.

CDU: 618.14-006(=1-82)

**FOLHA DE JULGAMENTO****CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS  
HUMANO EM INDÍGENAS DO EXTREMO NORTE DA AMAZÔNIA  
BRASILEIRA: COMPARAÇÃO ENTRE ETNIAS INDÍGENAS  
ISOLADAS E INTEGRADAS À SOCIEDADE OCIDENTAL****ALEX JARDIM DA FONSECA**

“Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

**Banca Julgadora:**

---

**Prof Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira**  
**Presidente**

---

**Profa. Dra. Luisa Lina Villa**  
**Membro**

---

**Prof. Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda**  
**Membro**

---

**Prof. Dr. Ivan Tramuja da Costa e Silva**  
**Membro**

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino**  
**Membro**

*À minha esposa,  
Ana Rosa,  
sem seu apoio seria impossível*

*A Joana e a Marina,  
pelo simples presente de ser pai de vocês*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira, por fazer jus à palavra orientador. Por acreditar neste trabalho desde sua concepção. Pelo exemplo de competência aliada à humildade. Por sua amizade, disponibilidade e dedicação. Por se tornar um exemplo profissional e humanitário para mim. Minha sincera e eterna gratidão.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Espinosa Barbosa Miranda, por sua orientação, colaboração e dedicação, e por abrir as portas para que este trabalho ganhasse a proporção que ganhou.

Ao Prof. Dr. Robert Burk, pela valiosa colaboração no campo da biologia molecular. Por me receber de forma tão atenciosa em sua Universidade. Pelo cuidado com os detalhes desta pesquisa e por me ensinar a buscar a perfeição.

Ao líder dos povos Yanomami, Sr. David Kopenawa Yanomami, e ao líder dos povos Macuxi e Wapichana, Sr. Clóvis Ambrósio, por confiarem na minha palavra e abrirem as portas de suas comunidades indígenas para a execução deste estudo.

Às mulheres Yanomami, Macuxi e Wapichana, que atenderam prontamente ao convite de um desconhecido para participação no estudo, mesmo em se tratando da natureza íntima e pessoal desta pesquisa.

Às Coordenadoras de Saúde da Mulher dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas do Leste (Enfermeira Maria José) e Yanomami (Enfermeiras Elaine Cristina Florêncio e Raquel Vogel), que autorizaram e apoiaram a execução do trabalho.

Aos pilotos dos aviões e motoristas da SESAI que me conduziram na difícil tarefa de coletar os dados desta pesquisa nos confins da Amazônia.

Aos enfermeiros e técnicos da SESAI que trabalham nos Polos-Base visitados em áreas indígenas, pelo apoio irrestrito e pela recepção.

À Universidade do Estado do Amazonas e à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, nas pessoas do Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda e Prof. Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, pela oportunidade de avançar no mundo acadêmico, e pelo exemplo pessoal a ser seguido.

A meus pais, por sempre me incentivarem a estudar.

A Deus, pelas portas que me tem aberto.

*“Cultura consiste em tudo aquilo criado pelo homem.  
Cultura consiste em criar, e não em repetir.”*

**Paulo Freire**  
**Um brasileiro a frente de seu tempo.**  
**(1921 – 1997)**

*“As doenças podem ser semelhantes,  
mas as pessoas são muito diferentes”*

**Celmo Celeno Porto**  
**Médico, escritor e professor.**

## RESUMO

As mulheres indígenas da região amazônica apresentam algumas das maiores taxas de incidência de câncer de colo do útero no mundo. O objetivo do estudo foi avaliar a citologia cervicovaginal e a infecção por papilomavírus humano (HPV) em mulheres indígenas que diferem em estilo de vida e nível de interação com a sociedade ocidental. Mulheres Yanomami vivem isoladas na Amazônia com um estilo de vida de caçadores/coletores da floresta tropical. Mulheres Macuxi e Wapichana vivem em proximidade com a sociedade ocidental. Para selecionar um grupo representativo de mulheres de cada distrito indígena, foi utilizada amostragem aleatória, considerando cada polo base registrado como um conglomerado amostral. Amostras cervicais foram coletadas para citologia e detecção e tipagem de HPV por PCR e *next generation sequencing*. O estudo foi aprovado pela CONEP e pelos líderes tribais. Um total de 664 mulheres nativas foram incluídas de 13 aldeias indígenas, com uma taxa de participação de 76%. Mulheres Yanomami apresentaram maior prevalência de citologia anormal (5,1% vs. 1,8%,  $p = 0,04$ ) e de infecção por HPV de alto risco (34,1% vs. 19,2%,  $p < 0,001$ ). Mulheres Yanomami com mais de 35 anos de idade foram significativamente mais propensas a ter HPV de alto risco, enquanto as mulheres menos de 35 anos não diferiram significativamente entre os grupos. Os tipos de HPV mais prevalentes em todo o grupo foram HPV31 (8,7%), HPV16 (5,9%) e HPV 18 (4,4%). Conclui-se que as mulheres Yanomami, nativas e isoladas, foram mais propensas a ser HPV + e as prevalências aumentaram com a idade. Estudos sobre HPV em povos isolados sugerem que a persistência da infecção a longo prazo seja uma característica dos seres humanos pré-históricos, e que os padrões refletindo diminuição da prevalência com a idade observados na sociedade ocidental represente uma mudança recente na história humana. Este estudo tem implicações para a prevenção do câncer de colo do útero e o entendimento do relacionamento vírus-hospedeiro.

**Palavras-chaves:** Serviços de Saúde do Indígena; Índios Sul-Americanos; Neoplasias do colo de útero; Infecção por papilomavírus; Grupos étnico; Saúde de minorias.

## ABSTRACT

Indigenous women from the Amazon regions have some of the highest rates of cervical cancer in the world. This study evaluated cervical cytology and human papillomavirus (HPV) in native women that differ by lifestyle and interaction with western society. Yanomami women are isolated deep in the Amazon with a hunter/gatherer lifestyle. Macuxi and Wapishana women live in proximity to western society. To select a representative group of women from each district, random cluster sampling was used, considering each registered village as a cluster. Cervical samples were collected for cytology and HPV detection and typing by PCR amplification and next generation sequencing. The study was approved by the National IRB and by tribal leaders. A total of 664 native women were enrolled from 13 indigenous villages with a 76% participation rate. Yanomami women had higher rates of abnormal cytology (5.1% vs. 1.8%,  $p=0.04$ ) and prevalent HR-HPV (34.1% vs. 19.2%,  $p<0.001$ ). Yanomami women  $>35$ y of age were significantly more likely to have HR-HPV, whereas women  $\leq 35$ y did not significantly differ between groups. Prevalence of HPV was significantly different amongst geographically clustered Yanomami women ( $p<0.004$ ). The most prevalent HPV types in the entire group were HPV31 (8.7%), HPV16 (5.9%) and HPV18 (4.4%). We conclude that isolated endogenous Yanomami women were more likely to be HPV+ and rates increased with age. Study of HPV in isolated hunter-gather peoples suggests that long-term persistence is a characteristic of prehistoric humans and patterns reflecting decreased prevalence with age in western society represents recent change. These studies have implications for cervical cancer prevention and viral-host relationships.

**Keywords:** Indigenous Health Services; South American Indians; Uterine Cervical Neoplasms; Papillomavirus Infections; Ethnic Groups; Minority Health.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do extremo norte da Amazônia Brasileira. Delimitação geográfica dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas do Leste e Yanomami.....	13
Figura 2: Mulheres indígenas Wapichana, voluntárias da pesquisa, aguardando exame médico no Polo-base da comunidade indígena Malacacheta - DSEI Leste, Roraima – Brasil, 2013.....	14
Figura 3: Mulheres Yanomami e crianças aguardando atendimento no Polo-base da comunidade indígena Marari, DSEI Yanomami - Amazonas - Brasil. ....	15
Figura 4: Foto de mulheres e criança Yanomami, comunidade indígena Watoriki, Polo-base Demini, DSEI Yanomami, Amazonas – Brasil, 2013.....	16
Figura 5: Polo-base da comunidade indígena Canauani - DSEI Leste, Roraima - Brasil. ....	17
Figura 6: Polo-base da comunidade indígena Demini, DSEI Yanomami, Amazonas - Brasil. Mulheres voluntárias aguardando atendimento médico, tradutor da SESAI (blusa vermelha) e enfermeira da SESAI, que realizou entrevistas nesta comunidade. ....	18
Figura 7: Palestra ministrada pelo pesquisador para convite e esclarecimento dos propósitos e métodos da pesquisa aos habitantes de comunidade indígena Boqueirão, etnia Macuxi, DSEI Leste. Roraima - Brasil. ....	19
Figura 8: Mapa do Distrito Sanitário Indígena Yanomami. Polos-base sorteados e visitados assinalados no mapa (em vermelho).....	23
Figura 9: Transporte aéreo da equipe de pesquisa (avião da SESAI) para realização do estudo nas comunidades indígenas sorteadas do DSEI Yanomami. Chegada na pista de pouso da comunidade Demini, Amazonas, Brasil.....	24
Figura 10: Desenho dos primers para a amplificação por PCR de HPV-DNA e <i>next generation sequencing</i> . ....	27
Figura 11: Fluxograma detalhado de procedimentos de bioinformática para análise e classificação taxonômica de HPV, a partir das leituras do sequenciamento NG, Laboratório Burk, Nova York, EUA, 2014.....	30
Figura 12: Reunião com líderes tribais Yanomami durante reunião de Conselho Indígena Yanomami para obtenção de autorização da pesquisa.....	33
Figura 13: Prevalência de HPV por grupo de espécies.....	37
Figura 14: Prevalência de HPV (gráfico A) e de HPV de alto risco (gráfico B) por grupos de idade, mulheres Yanomami, Macuxi e Wapichana, Brasil, 2013.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Polos-base e comunidades indígenas aleatoriamente selecionados no DSEI Leste. ....	22
Tabela 2: Polos-base e comunidades indígenas sorteados no DSEI Yanomami.....	23
Tabela 3: Características demográficas e clínicas de mulheres indígenas nativas da região norte da Amazônia brasileira, Brasil, 2013.....	35
Tabela 4: Resultados de citologia cervicovaginal e pesquisa de HPV-DNA. ....	36
Tabela 5: Análises univariada e multivariada dos fatores de risco para alterações citológicas em mulheres indígenas nativas da região norte da Amazônia. ....	39
Tabela 6: Análises univariada e multivariada dos fatores de risco para infecção por HPV de alto risco em mulheres indígenas nativas da região norte da Amazônia. ....	41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ASC-US	Atipia celular escamosa de significado incerto, do inglês <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
CASAI	Casa de Atenção à Saúde Indígena
CCU	Câncer de colo de útero
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSEI	Distrito Sanitário Especial Indígena
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau, do inglês <i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau, do inglês <i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
MS	Ministério da Saúde
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
OTU	Unidades Taxonômicas de Operação
PB	Pares de base
PoB	Polo base
SESAI	Secretaria de Saúde Indígena
SIASI	Sistema de Informação de Atenção à Saúde Indígena

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>3</b>
HPV e populações nativas das Américas.....	4
HPV e populações indígenas no Brasil .....	5
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
Objetivo primário .....	11
Objetivos secundários .....	11
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
Desenho do Estudo.....	12
Local do estudo e Participantes .....	12
Comunidades indígenas do DSEI Leste.....	13
Comunidades indígenas do DSEI Yanomami .....	15
Procedimentos de Pesquisa.....	17
Critérios de inclusão .....	20
Critérios de exclusão .....	20
Amostra e amostragem .....	20
Coleta de material biológico .....	24
Citologia Oncótica .....	24
Coleta de material para biologia molecular: HPV-DNA .....	25
Processamento de amostras biológicas.....	26
Recuperação de DNA .....	26
Desenho de <i>primers</i> para Next Generation Sequencing .....	27
Amplificação por PCR e sequenciamento next-gen .....	28
Procedimentos de bioinformática e classificação taxonômica.....	29
Ponto de corte da OTUs e definição de positividade para HPV .....	31
Análises de controle de qualidade.....	31
Método de análise de dados .....	31
Definição de variáveis .....	31
Análise estatística .....	32
Aspectos Éticos.....	32
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

Cerca de 500.000 novos casos de câncer de colo de útero (CCU) são estimados anualmente em todo o mundo, e 80% destes ocorrem em países de média ou baixa renda, como o Brasil (1), onde 15.900 novos casos de CCU são estimados todos os anos (19 casos novos/100.000 habitantes por ano) (2). Na Amazônia brasileira, CCU é um problema de saúde pública ainda maior. Um estudo de base populacional realizado em 2010 revelou uma taxa de incidência bruta anual de 46/100.000 no estado de Roraima, possivelmente a mais elevada do Brasil (3). Aproximadamente 10% da população em Roraima é constituída por povos indígenas (4). No entanto, até 23% dos casos de câncer do colo do útero neste estado são relatados em mulheres nativas, sugerindo um maior risco de CCU para estas minorias étnicas (estimativa de taxa de incidência de 110/100.000), uma das mais elevadas taxas reportadas no mundo (3, 5).

Apesar da saúde das populações indígenas ser identificada como uma prioridade para Organizações de Saúde (6), o perfil epidemiológico das mulheres indígenas permanece desconhecido, devido, em parte, à falta de investigação e à precariedade dos sistemas de informação sobre morbidade e mortalidade nesses grupos (7). Na América do Sul, poucos estudos avaliaram a prevalência de HPV e de lesões intraepiteliais cervicais em mulheres indígenas aldeadas, e a maioria destes estudos são concentrados em grupos indígenas das regiões mais urbanizadas do continente. Em grupos indígenas da América do Sul com níveis de interação permanente com a sociedade ocidental, a prevalência de HPV em mulheres assintomáticas tem variado de 14 a 60% (8-10). Um estudo que analisou as variantes do HPV16 em mulheres indígenas *Quechua* (um grupo étnico integrado à sociedade envolvente que habita a região de fronteira entre Argentina e Brasil) evidenciou que 69% dos genótipos HPV16 detectados eram variantes europeus, refletindo a possível influência da colonização luso-espanhola sobre os Incas e seus descendentes dessa região (11).

Nos dias de hoje os grupos indígenas mais isolados nas Américas são habitantes da região Amazônica, com altos índices de CCU e pouco conhecimento sobre o perfil de infecção por HPV nestes grupos. Um estudo realizado por Ong *et al.* (12) investigaram a infecção por HPV em mulheres de três tribos indígenas

parcialmente isoladas da Amazônia brasileira há 20 anos atrás (Tiriyó, Waiãpi e Munduruku). Foi relatada uma prevalência de HPV de 14,4%. O sequenciamento genético de três amostras revelou mais de 10% da variabilidade nucleotídica em relação ao genótipo mais próximo, e foi sugerido pelos autores que esses isolados possivelmente fossem novos tipos de HPV, endêmicos dos povos nativos da Amazônia.

Diferentes populações, especialmente os povos indígenas isolados, podem apresentar características distintas de infecções por HPV, relacionados à sua ascendência, estilo de vida e comportamento sexual. Além disso, para o conhecimento sobre a epidemiologia do CCU é necessário compreender o papel etiológico dos diferentes tipos de HPV e suas variantes nessas populações, a fim de desenvolver estratégias preventivas eficazes. Grupos indígenas isolados (Yanomami) e grupos com interação permanente com a sociedade envolvente (Macuxi e Wapichana) habitam o extremo norte da Amazônia brasileira, apresentando uma diferença ecológica que pode ser usada para investigar a influência do isolamento e de um estilo de vida primitiva sobre a diversidade do HPV e sua associação com CCU. Até a data da execução deste estudo, as características da infecção por HPV e sua diversidade genotípica nesses grupos indígenas são desconhecidas.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A infecção pelo HPV é reconhecidamente o mais importante fator para o desenvolvimento do CCU. O estudo pioneiro na identificação desta relação causal foi publicado pelo médico italiano Rigoni-Stern em 1842 (13). Ao revisar declarações de morte de mulheres em Verona no período de 1760 a 1839, o Dr. Rigoni-Stern relatou uma elevada frequência de CCU em mulheres casadas, viúvas e prostitutas, mas uma baixa ocorrência em mulheres virgens e freiras, e concluiu que o desenvolvimento deste tipo de câncer deveria estar relacionado ao histórico sexual. O crescimento da microbiologia na segunda metade do século XIX resultou na tentativa de relacionar agentes infecciosos com o CCU. Os primeiros estudos a tentar incriminar um agente viral foram direcionados para vírus da herpes (14). E foram os estudos publicados por Harald zur Hausen (15), no final dos anos 70, que mostraram de forma concreta a relação entre o CCU e um agente causal viral, altamente transmissível sexualmente, que hoje sabe-se ser o HPV, um vírus com tropismo epitelial (pele e mucosas) da família *Papovaviridae*.

Entretanto a infecção pelo HPV não é suficientemente determinística para a evolução do câncer (16). Há necessidade da associação de outros fatores que influenciam direta ou indiretamente na instalação do processo carcinogênico no epitélio escamoso cervical (17). Os fatores imunológicos, a associação com a SIDA, fatores genéticos como o polimorfismo da proteína p53, o tabagismo e o uso de anticoncepcionais orais interagem, em maior ou menor intensidade, com oncoproteínas e outros elementos do HPV, potencializando a ação do vírus na célula hospedeira e facilitando o desenvolvimento do processo de imortalização e carcinogênese (18).

A infecção pelo HPV é raramente sintomática. As lesões cervicais induzidas pelo HPV podem permanecer durante meses a anos e então podem regredir espontaneamente ou, no caso da infecção pelos HPV de alto risco ou de risco intermediário, evoluir para LSIL ou HSIL, e por sua vez, progredir lentamente para o CCU, num intervalo médio de 10 anos ou mais (19). A infecção pelo HPV se caracteriza por transmissão fácil e ampla. Dados apontam que aproximadamente 80% dos indivíduos de populações ocidentais sejam infectados ao longo da vida, e que até 20% dos indivíduos normais estejam infectados pelo HPV (20).

O HPV possui um capsídeo não envelopado icosaédrico de 55 µm de diâmetro limitando um genoma circular de DNA de dupla hélice composto por cerca de 7.900 pares de bases, dividida em 4 partes: região precoce (E), região tardia (L), região reguladora a montante (do inglês, *upstream regulatory region*, URR), e uma pequena região de alta variabilidade não codificadora entre E5 e L2. Todos os HPV conhecidos possuem um conteúdo genético organizado de forma muito similar, e são as variações de mais de 10% dos nucleotídeos da região tardia 1 (L1) que definem, em taxionomia, os genótipos de HPV(21).

Mais de 150 genótipos do HPV já foram descritos, e aproximadamente 100 destes já foram sequenciados. Os genótipos 6 e 11 são responsáveis pelas verrugas genitais, manifestação comum e altamente infecciosa (22). Os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 são os mais comumente implicados na gênese do CCU (21). Neste subgrupo considerado de alto risco carcinogênico, destacam-se os genótipos 16 e 18 por serem responsáveis por 70% dos casos de CCU, com uma variação de 65 a 76% entre as regiões brasileiras estudadas (20, 23). No Brasil, a prevalência de infecção por HPV em mulheres com exame citológico normal é de aproximadamente 17% (23), sendo o genótipo mais prevalente o HPV 16 (5,2%).

### **HPV e populações nativas das Américas**

Estudos avaliando a magnitude da infecção por HPV em populações nativas das Américas ainda são escassos. Entretanto, há relatos de elevada prevalência de infecção por HPV neste grupo. Nos Estados Unidos, mulheres indígenas nativas (bacia do Mississipi) foram consideradas como subgrupo de alto risco para câncer de colo de útero devido à elevada prevalência de alterações citológicas induzidas por HPV quando comparadas a mulheres não indígenas da mesma região (24). Algo semelhante foi descrito por Bell *et al.* (25) que relataram elevada prevalência de HPV em 287 indígenas nativas das Planícies do Norte dos Estados Unidos. Foi detectado HPV-DNA no colo de útero de 21% das mulheres nativas americanas rastreadas pela técnica de PCR. Destas, 67% foram positivas para genótipos de alto risco. Em outro estudo, Becker *et al.* (26) avaliaram a incidência de infecção por HPV e de câncer de colo de útero em diversas comunidades indígenas nativas do Alasca e das Planícies Centrais Norte-americanas. Os autores relataram que a incidência

destes agravos foi duas vezes maior em mulheres nativas em relação às não indígenas, com grande variabilidade entre as tribos, e ressaltam a importância dos estudos de recorte étnico-racial, a fim de subsidiar as estratégias preventivas neste grupo populacional especial.

Na América do Sul foi comparada a prevalência de infecção por HPV em mulheres indígenas aldeadas da etnia Guaraní (região de Misiones - Argentina) com mulheres caucasianas urbanas daquela região (27). Foi utilizada a técnica de PCR, e evidenciou-se maior prevalência de infecção por HPV em indígenas (60%) em comparação às mulheres não indígenas (43%) de forma estatisticamente significativa. Ainda na Argentina, outro estudo avaliou as variantes do HPV-16 em mulheres indígenas da etnia *Quechua* da região Jujuy (noroeste do país) (11). Os autores detectaram uma elevada proporção (69%) de infecção por variantes Europeus do HPV16, e concluíram que esses dados refletem a influência da colonização espanhola sobre os descendentes Incas nativos daquela região.

Dados semelhantes foram relatados em mulheres indígenas Wapichana da Guyana Inglesa. Kightlinger *et al.* (28) documentaram elevada prevalência de CCU e baixa adesão aos programas preventivos em indígenas Wapichana habitantes na floresta tropical vizinha ao estado de Roraima. Neste estudo retrospectivo, dos 2.250 exames revisados, foram descritos 5% de HSIL e 0,8% de carcinoma invasor. Dentre as mulheres com displasia intraepitelial cervical e carcinoma invasor, aproximadamente 60% apresentavam genótipos de HPV de alto risco (HPV 31, 25%; HPV 16, 22% e HPV 18, 13%).

### **HPV e populações indígenas no Brasil**

No Brasil o perfil epidemiológico dos povos indígenas é muito pouco conhecido, o que decorre da exiguidade de investigações, da ausência de censos e de outros inquéritos regulares, e da precariedade dos sistemas de registro de informações sobre morbidade, mortalidade e cobertura vacinal neste grupo étnico, dentre outros fatores (7).

Um estudo de âmbito nacional que realizou uma análise descritiva de mais de 4 milhões de exames citopatológicos do colo de útero constantes no SISCOLO no

período de 2008 – 2012 ilustra esta dificuldade (29). Apenas 8% dos exames coletados no país registraram a informação de raça/cor da mulher rastreada. Apesar da elevada taxa de não completude das informações, os autores registraram maior proporção de lesões compatíveis com invasão do colo de útero em mulheres indígenas em comparação às não indígenas, apesar de não ter sido observada diferença de proporção de lesões pré-malignas cervicais. Tal situação sugere maior susceptibilidade para as mulheres indígenas no Brasil, possivelmente relacionada a barreiras culturais, comportamentais e de acesso às ações de controle do CCU.

Poucas investigações originais abordando a saúde da mulher indígena estão disponíveis no Brasil. Em Rondônia, resultados de exames citopatológicos do colo do útero de 147 mulheres indígenas da etnia Suruí e 197 da etnia Cinta-larga foram revisados por Rodrigues *et al.* (30) Os dados revelaram elevadas prevalências de lesões atípicas do colo de útero: ASC-US em 10,2%; LSIL em 3,6%; HSIL em 2%; carcinoma invasor em 0,5%. Outro estudo com metodologia semelhante também revisou retrospectivamente resultados de rastreamento do câncer de colo de útero no parque indígena do Xingu entre 1989 e 1996 (31). Das 423 mulheres rastreadas, apenas 12% apresentaram exame citológico normal. Em 1,2% das mulheres foi detectado LSIL, 1,7% HSIL e câncer invasivo em 1,2% das mulheres rastreadas, prevalências consideradas elevadas pelos autores quando comparadas a relatos históricos em mulheres não indígenas. Em 84% das mulheres do Xingu foi constatada atipia inflamatória, decorrente de infecções genitais sexualmente transmissíveis. Esta vulnerabilidade ao HPV em tribos indígenas do Xingu foi confirmada por Speck *et al.* (32) quase uma década após, ao realizar estudo prospectivo sobre rastreamento do câncer de colo de útero, também no parque indígena do Xingu em 2005. Das 518 mulheres rastreadas, 12,6% apresentaram atipias citológicas (9,4% de LSIL; 2,8% de HSIL e 0,4% de câncer invasivo).

No estado do Pará, Mendes estudou 424 indígenas de 16 etnias diferentes, em estudo de corte transversal. Os exames citológicos cervicais revelaram LSIL em 2,1%, HSIL em 3,3% e carcinoma invasor em 1,2% (33). Evidências similares foram publicadas por Pereira *et al.* (34) que identificou 5,1% de LSIL e 0,6% de HSIL (nenhum caso de carcinoma invasor) ao revisar retrospectivamente os laudos de 989 mulheres das aldeias Jaguapirú e Bororó em Dourados, Mato Grosso do Sul, entre 2004 e 2006.

Estudos utilizando métodos de biologia molecular para avaliar a prevalência de infecção por HPV são ainda mais escassos. Brito *et al.* (8) realizaram a pesquisa de HPV em um pequeno grupo (n=49) de mulheres indígenas aldeadas da etnia Parakanã do estado do Pará. Foi relatada detecção por PCR do HPV em 14,3% das pacientes examinadas, sendo em um terço por HPV de alto risco carcinogênico.

## **PROBLEMA DA PESQUISA**

Qual a prevalência de HPV em mulheres indígenas habitantes nas áreas de reserva do DSEI Leste e Yanomami da região Amazônica Brasileira? As características da infecção por HPV diferem entre tribos com diferentes graus de contato com o a sociedade ocidental?

## HIPÓTESES

- As mulheres indígenas do extremo norte da Amazônia brasileira possuem elevada prevalência de infecção por HPV.
- As características genóticas dos HPV encontrados diferem entre grupos com diferentes graus de contato com a sociedade ocidental.
- Existem genótipos de HPV endêmicos, ainda não descritos, em mulheres de grupos indígenas mais isolados na Amazônia Brasileira.

## JUSTIFICATIVA

Um mínimo de conhecimento sobre a epidemiologia do HPV é necessário para se entender o papel de seus diversos subtipos no desenvolvimento do CCU de uma determinada população, e conseqüentemente elaborar estratégias preventivas efetivas contra o câncer, especialmente envolvendo vacinação contra o HPV. Populações diferentes podem apresentar características distintas de infecção viral, como abrigar genótipos variados do HPV no trato genital. Até o momento, os povos indígenas do extremo norte da Amazônia Brasileira não foram estudados quanto à prevalência do HPV e seus genótipos.

Adicionalmente, o estudo da infecção por HPV em grupos étnicos isolados pode enriquecer o conhecimento da relação vírus-hospedeiro, bem como fornecer pistas sobre a história da evolução do HPV em primatas humanos e pré-humanos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo primário**

- Avaliar a prevalência de infecção cervical por HPV em mulheres indígenas aldeadas do extremo norte da região amazônica do Brasil.

### **Objetivos secundários**

- Comparar as prevalências de lesões pré-malignas e malignas do colo de útero nas indígenas estudadas, segundo etnia e idade;
- Analisar os fatores de risco demográficos e socioculturais relacionados à infecção por HPV e alterações citológicas cervicovaginais;
- Descrever a ocorrência de novos tipos de HPV na população estudada;
- Comparar os tipos de HPV mais frequentes e sua diversidade ecológica entre as etnias com diferentes graus de interação com a sociedade envolvente.

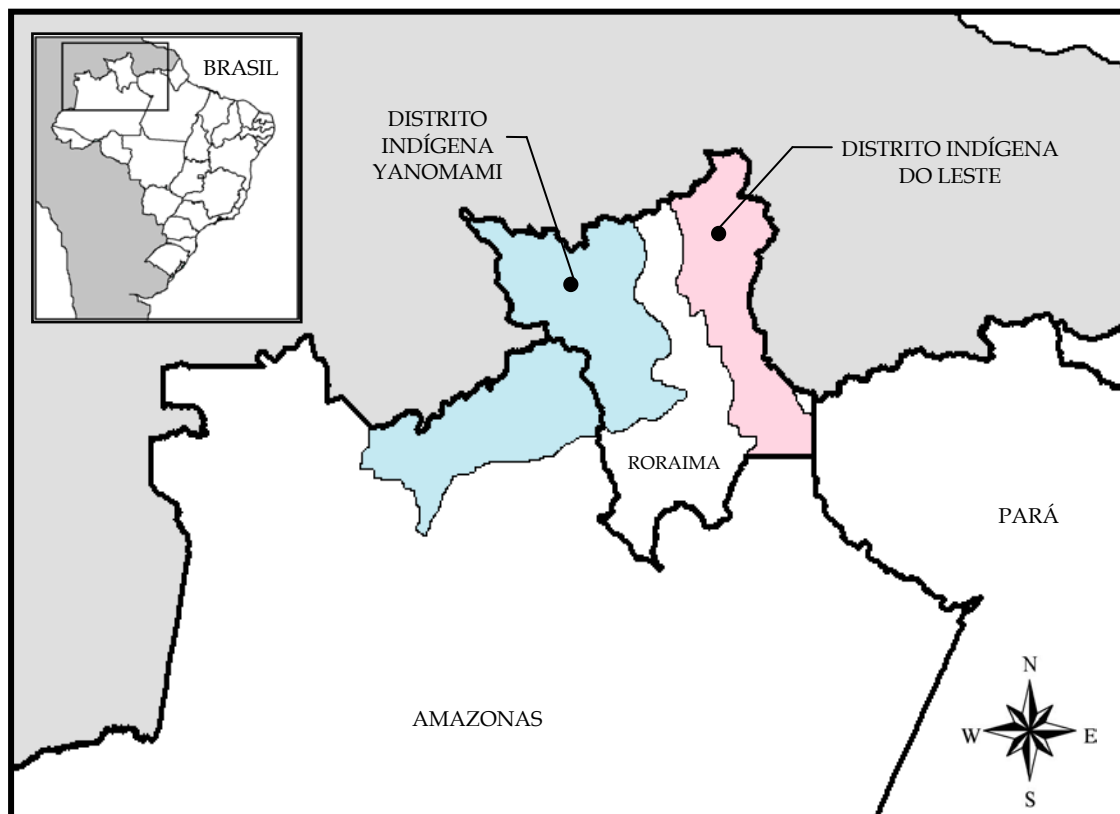
## MÉTODOS

### Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, de análise quantitativa, que consistiu na busca ativa de mulheres indígenas habitantes de áreas de reserva do extremo norte da região Amazônica do Brasil, para coleta de material (secreção) mucoso do canal endocervical e fundo vaginal. O estudo foi desenhado para avaliar a prevalência de lesões pré-malignas e malignas do colo de útero e da infecção por HPV, mediante realização de teste de citologia oncótica e de amplificação do DNA viral por PCR e sequenciamento maciço em paralelo (aqui denominado *next generation sequencing* - NGS), além de aplicação de questionário sobre dados pessoais e demográficos. A coleta de material em campo ocorreu entre fevereiro e julho de 2013.

### Local do estudo e Participantes

Devido a fatores culturais, étnicos e antropomórficos o Governo Federal do Brasil, representado pela Secretaria de Saúde Indígena (SESAI) – Ministério da Saúde, dividiu os povos indígenas do extremo norte amazônico em duas regiões geográficas sob gestão estratégica de dois Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI): o DSEI Leste (composto principalmente pelas etnias Macuxi e Wapichana); e o DSEI Yanomami (etnias Yanomami, Yekuana, Xirixana, Patamona e Sanumã) (figura 1). Os grupos étnicos de ambos DSEIs não são homogêneos e se caracterizam por graus distintos de interação com a sociedade envolvente.



**Figura 1:** Mapa do extremo norte da Amazônia Brasileira. Delimitação geográfica dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas do Leste e Yanomami.  
Fonte: Secretaria de Saúde do Índio – Ministério da Saúde, Brasil.

### **Comunidades indígenas do DSEI Leste**

Com uma população estimada em 40.000 habitantes (35), as comunidades integrantes do DSEI Leste são representadas principalmente pelos Macuxi e Wapichana (36). Habitam as áreas de campo e serras localizadas no norte e leste do estado de Roraima, distribuído por 39.420 km<sup>2</sup>. Pertencem à filiação linguística *Karib*, e à unidade étnica *Pemon* (37). Registram-se aproximadamente 307 aldeias indígenas em três grandes blocos: Terra indígena Raposa Serra do Sol, Terra Indígena São Marcos e um conjunto de oito pequenas aldeias mais isoladas no extremo norte do estado (vale do Rio Uraricoera).

Estas comunidades, em especial as Macuxi, se caracterizam por possuir fronteiras étnicas bastante tênues com a sociedade não indígena, em virtude de arranjos habitacionais e socioeconômicos integrados por indivíduos de diferentes

procedências ao longo de dois séculos de interação (37). O início do contato dos Macuxi data da ocupação colonial portuguesa do Vale do Rio Branco, meados do século XVIII (38). As informações disponíveis sobre o contato com os Macuxi e Wapichana nesse período são raras e fragmentadas. Nestes 2 séculos de interação com a sociedade envolvente, sua história, que iniciou como uma estratégia militar, é marcada por recrutamento da força de trabalho dos índios na região, ocupação das terras indígenas por atividades agropecuárias e garimpeiras, e expulsão dos indígenas de suas aldeias originais.



**Figura 2:** Mulheres indígenas Wapichana, voluntárias da pesquisa, aguardando exame médico no Polo-base da comunidade indígena Malacacheta - DSEI Leste, Roraima – Brasil, 2013.

Hoje a maioria dos integrantes destas etnias é classificada como de interação recente ou interação permanente com a sociedade não indígena, fluentes em língua portuguesa, e aderentes aos costumes sociais, hábitos e crenças ocidentais (figura 2). Comumente residem em casas privativas com acesso à energia elétrica e água encanada (39).

### Comunidades indígenas do DSEI Yanomami

Também situados ao norte da Amazônia, na região de fronteira Brasil-Venezuela, os povos Yanomami são constituídos por aproximadamente 40.000 habitantes (35), sendo aproximadamente 20.000 destes habitantes no Brasil (estados de Roraima e Amazonas), onde habitam uma área de 96.650 km<sup>2</sup>. Os Yanomami pertencem à unidade étnica *Yanomamö*, e possuem filiação linguística própria: *Yanomamam* (40). Constituem uma sociedade tipicamente errante, de caçadores, agricultores e coletores da floresta tropical amazônica, sendo o contato com os não índios um fato muito recente em sua história (41, 42). Os Yanomami permaneceram até o início do século XX isolados geograficamente em seus territórios, de tal forma que os únicos e raros contatos que os mesmos mantiveram por vários séculos foram restritos a outros grupos indígenas vizinhos. Nas décadas entre 1910 e 1940 foram registrados os primeiros contatos com não índios, sobretudo com caçadores e soldados militares da Comissão de Limites, além de viajantes (antropólogos) estrangeiros (42, 43).



**Figura 3:** Mulheres Yanomami e crianças aguardando atendimento no Polo-base da comunidade indígena Marari, DSEI Yanomami - Amazonas - Brasil.

Ainda hoje as comunidades Yanomami se caracterizam por viver em grupos isolados na floresta tropical (da sociedade não indígena, e de grupos indígenas vizinhos) em tribos relativamente pequenas (de 40 a 250 habitantes), permanecendo aldeados e mantendo seus costumes como língua nativa, estrutura social típica, erraticidade, hábitos como o infanticídio, além de início precoce da atividade sexual e multiparidade (figura 3 e 4). Os Yanomami residem em casas comunitárias (múltiplas famílias), construídas com barro, madeira e palhoças, sem acesso a energia elétrica ou água encanada.



**Figura 4:** Foto de mulheres e criança Yanomami, comunidade indígena Watoriki, Polo-base Demini, DSEI Yanomami, Amazonas – Brasil, 2013. Voluntárias da pesquisa.

Fonte: Acervo próprio.

Geneticistas e linguistas, ao estudarem os Yanomami, concluíram que a ausência de afinidade genética, antropomórfica e linguística com os grupos étnicos do DSEI Leste motivou o isolamento desta etnia desde os tempos remotos (40, 44-

46). Ressalta-se, portanto, que a divisão geográfica atualmente percebida entre as áreas dos dois DSEIs não foi demarcada arbitrariamente por governos, mas ocorreu de forma natural, seguindo as interações históricas entre os habitantes nativos da floresta. A separação geográfica entre os DSEIs Leste e Yanomami representa a expressão física das diferenças culturais, antropomórficas e genéticas historicamente preservadas entre estes grupos (47-49).

### **Procedimentos de Pesquisa**

As entrevistas e coleta de material foram realizadas nos Polos-base (PoB) da Secretaria de Saúde do Índio (SESAI – Ministério da Saúde) localizadas estrategicamente nas comunidades indígenas em áreas de reservas demarcadas (figuras 5 e 6). Tratam-se de Unidades de Saúde que praticam assistência básica em saúde aos indígenas aldeados. Todas as coletas (de dados e material biológico) foram realizadas pelo pesquisador principal, em conjunto com funcionários da SESAI, fluentes nos dialetos locais.



**Figura 5: Polo-base da comunidade indígena Canauani - DSEI Leste, Roraima - Brasil.**

Fonte: acervo próprio.

Nos PoB localizados nas reservas indígenas atuam regularmente equipes de saúde compostas por um enfermeiro, dois técnicos de enfermagem, um odontólogo, um assistente de consultório dentário, e agentes indígenas de saúde, sob gestão dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas - SESAI. As equipes dos PoB atuam inseridas em áreas indígenas por períodos que variam de 20 a 30 dias consecutivos, quando ocorre a troca de equipe. A composição completa da equipe é rara, pois a atuação de médicos é escassa e eventual. O acesso dos profissionais a estas comunidades é restrito e controlado pelos DSEIs.



**Figura 6:** Polo-base da comunidade indígena Demini, DSEI Yanomami, Amazonas - Brasil. Mulheres voluntárias aguardando atendimento médico. Tradutor da SESAI (blusa vermelha) e enfermeira da SESAI, que realizaram entrevistas nesta comunidade.

Fonte: Acervo próprio.

Após obter o consentimento dos líderes tribais da comunidade, o pesquisador, em conjunto de profissionais de saúde do PoB, realizou visita às famílias das

comunidades para esclarecimento e convite para participação na pesquisa. Não houve seleção de pacientes. Todas as mulheres que procuraram atendimento no PoB foram atendidas, até cessação da demanda.



**Figura 7:** Palestra ministrada pelo pesquisador para convite e esclarecimento dos propósitos e métodos da pesquisa aos habitantes de comunidade indígena Boqueirão, etnia Macuxi, DSEI Leste. Roraima - Brasil.  
Fonte: Acervo próprio.

No PoB, primeiramente as voluntárias foram esclarecidas sobre os propósitos e métodos da pesquisa (figuras 7), com ajuda de tradutores, e consentiram formalmente com o estudo (TCLE, anexo 1). Foram então submetidas a entrevista baseada em questionário arguindo sobre dados pessoais e familiares. Perguntas abordando histórico sexual, sexarca e menarca foram vetadas pelos líderes tribais. O questionário (em anexo) apresentava questões sobre: 1) identificação; 2) procedência; 3) estado marital; 4) tempo de casamento/união marital; 5) número de filhos e gestações; 6) idade do filho primogênito; 7) história de exames ginecológicos

preventivos prévios. Todos os documentos e amostras referentes a cada voluntária possuíam dupla identificação com nome e numeração de registro na pesquisa por meio de etiqueta.

### **Crítérios de inclusão**

Participaram da pesquisa mulheres de todas as idades que procuraram atendimento no PoB das comunidades após convite pessoal ou público. Foram incluídas mulheres gestantes, puérperas, lactantes, mulheres com história de histerectomia ou conização do colo de útero. Mulheres com sangramento menstrual foram incluídas na pesquisa, porém sem coleta de lâmina de citologia cervicovaginal caso sangramento importante, sendo coletada apenas amostra para pesquisa de HPV-DNA por PCR. Voluntárias em dia com o seu exame preventivo (teste de Papanicolaou realizado há menos de 1 ano) também foram incluídas na pesquisa, independente do resultado prévio.

### **Crítérios de exclusão**

Foram excluídas mulheres sexualmente virgens, mulheres não indígenas (mesmo que residentes na comunidade), e as que não conseguiram compreender os propósitos da pesquisa e que não assinaram (ou realizaram impressão digital) no TCLE.

### **Amostra e amostragem**

Para o cálculo do tamanho amostral, a prevalência da infecção por HPV na população alvo foi estimada em 15%, baseada nos resultados de 2 estudos análogos realizados em mulheres indígenas da Amazônia, utilizando a técnica de PCR (8, 12). Considerando intervalo de confiança de 95% e erro aceitável de 4%. Obteve-se tamanho amostral mínimo de 250 mulheres para o Distrito Yanomami e 322 mulheres para o Distrito Leste. Supondo uma perda de até 10% de amostras

e/ou dados, o tamanho de amostra final foi de 275 mulheres do DSEI Yanomami e 355 do DSEI Leste. Este tamanho amostral tem poder de 90% para detectar *Odds Ratio* ajustada maior que 1,5 com intervalo de confiança de 95% (erro alfa = 0.10, bilateral).

Para tanto, foi utilizada a fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde: n = tamanho amostral mínimo;

N = tamanho da população;

Z = referência normal da distribuição para o intervalo de confiança desejado;

p = prevalência estimada de infecção para HPV na população alvo;

e = maior erro aceitável.

Como os povos indígenas estão distribuídos na forma de pequenas comunidades indígenas em áreas de reserva, de difícil acesso, o processo de amostragem consistiu de amostragem aleatória por conglomerado. Todos os PoB registrados foram numerados. Uma sequência de números aleatórios foi gerada (<http://www.random.org/>), ponderada pelo tamanho da população de cada comunidade, e as comunidades indígenas de cada distrito indígena foram visitadas em ordem sequencial, até alcance da meta amostral em cada distrito. Arbitramos que um número mínimo de 5 PoB de cada distrito deveria ser incluído na pesquisa, mesmo que a meta amostral já tivesse sido alcançada.

O DSEI Leste de Roraima possui 34 PoB que prestam assistência a 307 aldeias indígenas. As 5 comunidades do DSEI Leste sorteadas estão expostas na tabela 1. O acesso às comunidades deste DSEI foi realizado por via terrestre, em carros da SESAI, ou via fluvial (balsas).

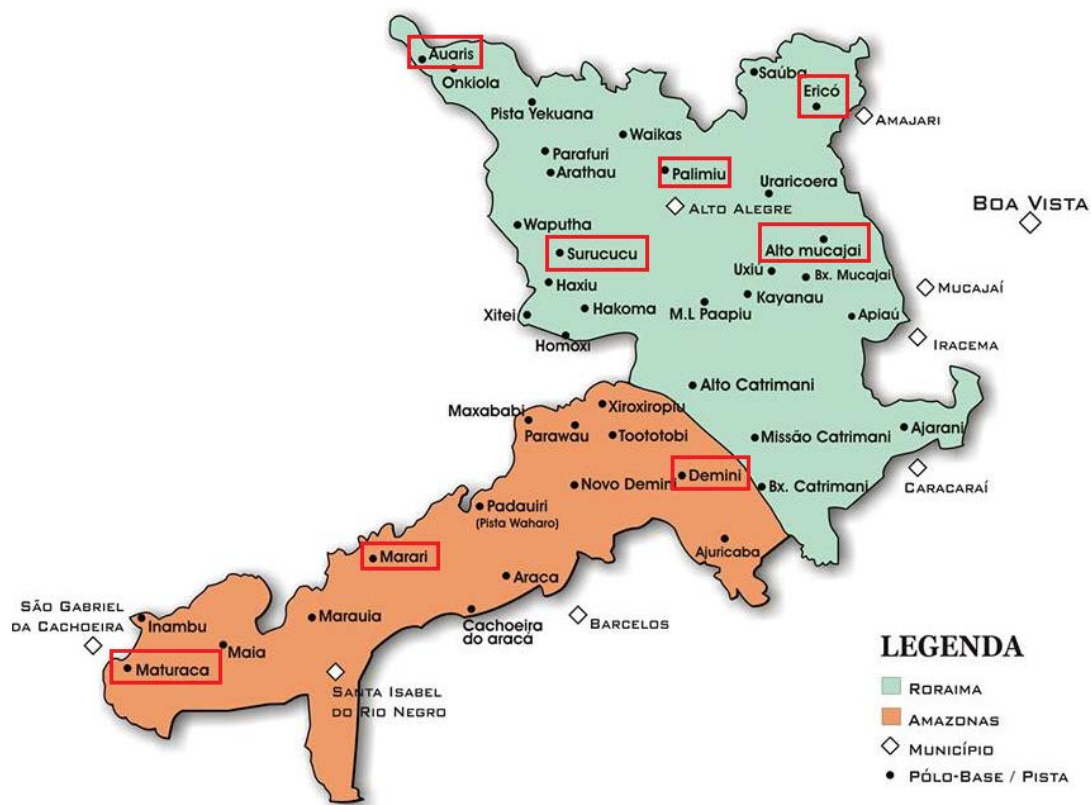
**Tabela 1:** Polos-base e comunidades indígenas aleatoriamente selecionados no DSEI Leste.

<b>Polo-Base</b>	<b>Comunidades Atendidas pelo PoB</b>	<b>Distância de Boa Vista (km)</b>	<b>Via de acesso</b>	<b>Etnia mais prevalente</b>	<b>Mulheres incluídas (n)</b>
Malacacheta	Malacacheta, Campinho, Barro Vermelho	110	terrestre	Wapichana	94
Pium-taiano	Barata, Pium, Anta, Anta II	140	terrestre	Wapichana	69
Canauani	Canauani, São Marcos	120	terrestre	Wapichana	70
Boqueirão	Boqueirão, Mangueira, Sucuba, Arapuá, Raimundão	250	terrestre	Macuxi	85
Vista Alegre	Vista Alegre, Darôra, Mauixê, Ilha, Campo Alegre	150	terrestre + fluvial	Macuxi	42

Fonte: SIASI/SESAI/MS(35).

Para o DSEI Yanomami, o acesso às comunidades foi realizado por via aérea, em aviões monomotores com capacidade para até 6 passageiros e/ou helicópteros. Este DSEI possui 35 PoB, que atendem a 282 tribos indígenas, total de 20.507 habitantes(35).

Em virtude das comunidades do DSEI Yanomami serem menos populosas, foi necessária inclusão de 8 PoB para alcance da meta amostral neste distrito (figura 8 e 9). Os PoB do DSEI Yanomami sorteados e suas respectivas comunidades atendidas foram expostas na tabela 2.



**Figura 8:** Mapa do Distrito Sanitário Indígena Yanomami. Polos-base sorteados e visitados assinalados no mapa (em vermelho).

Fonte: SESAI, MS.

**Tabela 2:** Polos-base e comunidades indígenas sorteados no DSEI Yanomami.

Polo-Base sorteado	Comunidades atendidas	Tempo de vôo a partir de Boa Vista	Via de acesso	Etnias mais prevalentes	Mulheres incluídas (n)
Alto Mucajaí	Pewa-ú, Uxi-ú, Kuisipi, Ihihimakok,	40 min	Aérea	Xirixana, Yanomami	18
Awaris	Awaris, Yekuana	2h 20min	Aérea	Yekuana, Sanumã	35
Demini	Watoriki, Wananari-ú	2h 10min	Aérea	Yanomami	48
Ericó	Ericó, Catirí, Comini	1h 5 min	Aérea	Xiriana	20
Marari	Castanha, Taibrapa	2h 30min	Aérea	Yanomami	25
Maturacá	Maturacá, Ariabú	3h 30min	Aérea	Yanomami	107
Palimi-ú	Palimi-ú, Uximamoli, Halikatu-ú	2h 10 min	Aérea	Yanomami	22
Surucucu	Koriaupê, xirimihiki, Xiate-ú	2h 30min	Aérea (avião + helicóptero)	Yanomami	29

Fonte: SIASI/SESAI/MS(35).

## Coleta de material biológico

Após a entrevista, a mulher voluntária foi submetida a exame ginecológico. A coleta foi realizada pelo médico pesquisador, frequentemente com auxílio de funcionários da SESAI. Após a inserção de espêculo vaginal, foi procedida inspeção visual do colo de útero, se existente.



**Figura 9:** Transporte aéreo da equipe de pesquisa (avião da SESAI) para realização do estudo nas comunidades indígenas sorteadas do DSEI Yanomami. Chegada na pista de pouso da comunidade Demini, Amazonas, Brasil.

Fonte: Acervo próprio.

## Citologia Oncótica

Para obtenção de esfregaços citológicos da ectocérvice uterina e de fundo de saco vaginal foi utilizada a espátula de Ayres. A coleta de material representativo do canal endocervical foi realizada através da escovação endocervical. As amostras foram distendidas em lâminas de vidro, duplamente identificadas. O material estendido na lâmina foi imediatamente borrifado com solução fixadora (Vagispec®,

Adlin Plástico LTDA, Santa Catarina – Brasil), constituída por propilenoglicol e álcool absoluto, armazenado e transportado para o Laboratório de Patologia do Estado de Roraima. Neste laboratório as lâminas foram coradas segundo técnica tradicional, conforme recomendado por diretrizes brasileiras (50), que sumariamente consiste de imersões das lâminas consecutivamente em álcool etílico 99,5º GL, corante hematoxilina, corante Orange, corante EA-50, e xilol.

As lâminas foram analisadas por 2 médicos patologistas, *experts* em citopatologia e professores universitários de patologia, no Laboratório de Patologia do Estado de Roraima (Boa Vista – RR) e no Departamento de Patologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – Amazonas. A leitura das lâminas foi realizada segundo as diretrizes brasileiras para o rastreamento do CCU (50), e a nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais. As citologias foram classificadas segundo o Sistema Bethesda (51): 1) normal ou inflamatório; 2) atipia celular escamosa de significado indeterminado – do inglês ASC-US; 3) atipia celular escamosa sendo impossível descartar neoplasia de alto grau – ASC-H; 4) lesão intraepitelial de baixo grau (do inglês LSIL); 5) lesão intraepitelial de alto grau (do inglês HSIL); 6) lesão sugestiva de carcinoma invasor; 7) atipias de células glandulares de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas ou quando não se pode excluir lesão de alto grau; 8) lesão sugestiva de adenocarcinoma.

### **Coleta de material para biologia molecular: HPV-DNA**

Durante exame especular, foi coletado material biológico para pesquisa de HPV-DNA por PCR com aparelho de coleta específico para este propósito (*HC2 DNA Collection Device*®, Digene Inc., USA). O kit de coleta e transporte contém escova cervical que foi inserida no canal endocervical, com profundidade de 1 a 1,5cm do orifício externo e girada por 3 voltas completas, e então retirada e inserida no tubo de transporte, contendo solução tampão para conservação do DNA. O tubo foi fechado hermeticamente após quebra da haste da escova (em local exato) em seu interior, e duplamente identificado. Segundo orientação do fabricante, as amostras poderiam permanecer em temperatura ambiente por até 2 semanas.

Em mulheres grávidas ou possivelmente grávidas, não foi coletado material endocervical. Nestas, a coleta de material para pesquisa de DNA foi realizada por escovação da ectocérvice e fundo de saco vaginal.

### **Processamento de amostras biológicas**

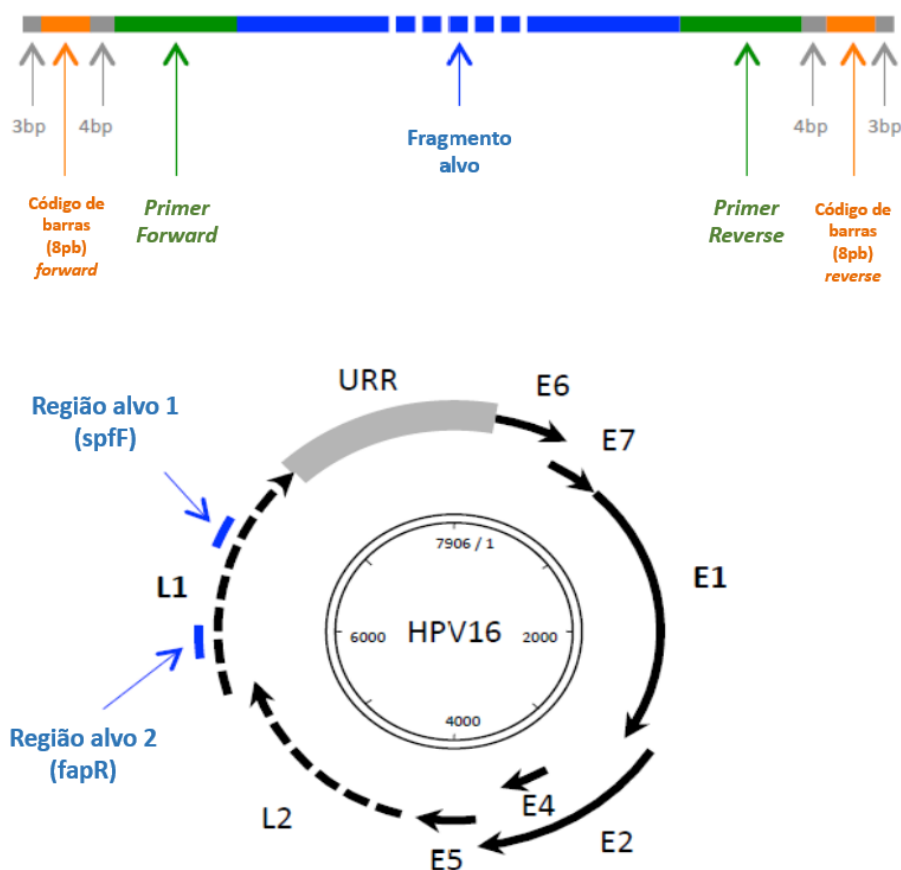
Após coleta das amostras biológicas (HPV-DNA) em área indígena, as mesmas foram transportadas em recipiente primário de transporte e coleta, hermeticamente vedado, para Boa Vista, capital do estado de Roraima e sede dos DSEIs Yanomami e Leste. Foram estocadas em baixas temperaturas (-80°C) em um prazo de até 4 meses da coleta. Posteriormente transportadas, em baixas temperaturas, para o Laboratório Burk, no Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Nova York, EUA, onde foram processadas laboratorialmente.

### **Recuperação de DNA**

Para recuperação do DNA das amostras, foi utilizado o kit de DNA QIAamp® (Qiagen, USA) seguindo o protocolo recomendado: 1 mL do meio líquido contendo o esfoliado do colo de útero foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos. Ao *pellet* extraído foi adicionado 20 µL de proteinase K, e então incubado a 56°C por 1h para lise. Foi adicionado 200 µL de tampão de lise AL, e após agitação da amostra, 200 µL de etanol 96%. O material foi transferido para colunas mini *spin* (2 mL) e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Descartado o sobrenadante, a coluna mini *spin* foi transferida para novo tubo e adicionado 500 µL de tampão de lavagem AW1. Novamente centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm e descartado o sobrenadante. Repetido o processo de lavagem com 500 µL de tampão AW2 e centrifugado por 3 min a 14.000 rpm. A coluna *spin* foi removida cuidadosamente, e transferida para tubo de microcentrifugação com 100 µL de tampão AE para eluição do DNA da coluna, e centrifugado por mais 1 minuto a 8.000 rpm.

## Desenho de *primers* para NGS e para origem das amostras

Uma vez que o espectro de tipos de HPV presentes em populações isoladas não era conhecido, utilizamos um novo ensaio de NGS recentemente desenvolvido no laboratório Burk. Em resumo, duas regiões alvo foram usadas para genotipagem de HPV (Figura 10). Para cada ensaio, vários *primers* diferentes de HPV (específicos para gêneros, espécies ou tipos) foram misturados com concentrações proporcionais. Uma única sequência de 8-pb de DNA foi anexado à extremidade 5' de cada *primer* (“código de barras”), e esta sequência era específica para cada participante da pesquisa. Cada código de barras possuía diferenças nucleotídicas de pelo menos 2 pb de qualquer outro *primer* de outra participante (52).



**Figura 10:** Desenho dos primers para a amplificação por PCR de HPV-DNA e *next generation sequencing*. (URR: *upstream regulation region*, ou região reguladora a montante).

Além disso, uma sequência de 4 pb foi inserida à esquerda (interposta entre a sequência código de barras e o *primer forward* propriamente dito, denominado *primer spfF*) e uma outra sequência de 4 pb foi adicionada à direita (entre o código de barras e o *primer reverse*, denominado *primer fapR*).

### **Amplificação por PCR e sequenciamento *next-gen***

Uma alíquota de cada DNA amostral foi amplificado por PCR usando os *primers* com 8 pb de oligonucleotídeos como código de barras para cada ensaio de NGS. Para todas as amostras, um código de barras único foi introduzido ao fragmento amplificado pela PCR pelos *primers forward* e *reverse*. Em resumo, uma reação de 25 uL foi realizada com uma mistura igual de AmpliTaq Gold DNA polimerase® (Life, USA) e HotStart-TI Fidelity Taq DNA Polimerase® (Affymetrix, USA), além de 1 ul do DNA de cada indivíduo, e os *primers* contendo os códigos de barra específico para cada indivíduo da amostra. Os ciclos de PCR consistiram de um preaquecimento de 95°C durante 5 min seguido por 15 ciclos de: 95°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, e 68°C durante 1 min. E então 25 ciclos de: 95°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, e 68°C durante 1 min. E uma extensão final a 68°C durante 10 min. As temperaturas de anelamento da polimerase do ensaio usando o *primer fapR* foram ajustadas a 57°C durante os primeiros 15 ciclos e 62°C durante os outros 25 ciclos.

Amplificação bem sucedida do fragmento previsto foi estimada pela concentração do fragmento amplificado através da comparação do brilho relativo da banda, contra um controle, por eletroforese em gel. Os produtos de PCR (com seus códigos de barras) de todas as amostras foram misturadas em concentrações molares de DNA aproximadamente iguais (o volume a ser misturado de cada amostra foi variável, entre 1 uL e 20 uL). Se nenhum fragmento amplificado foi observado por coloração com brometo de etídio, mesmo assim 20 uL da reação foi adicionado à mistura de todas as amostras positivas. As misturas de produtos de PCR foram purificados com o QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen, USA); uma alíquota de produtos de amplificação de DNA purificados foi preparado utilizando o Kit de Preparação de Amostras de DNA TruSeq Illumina® e sequenciados no

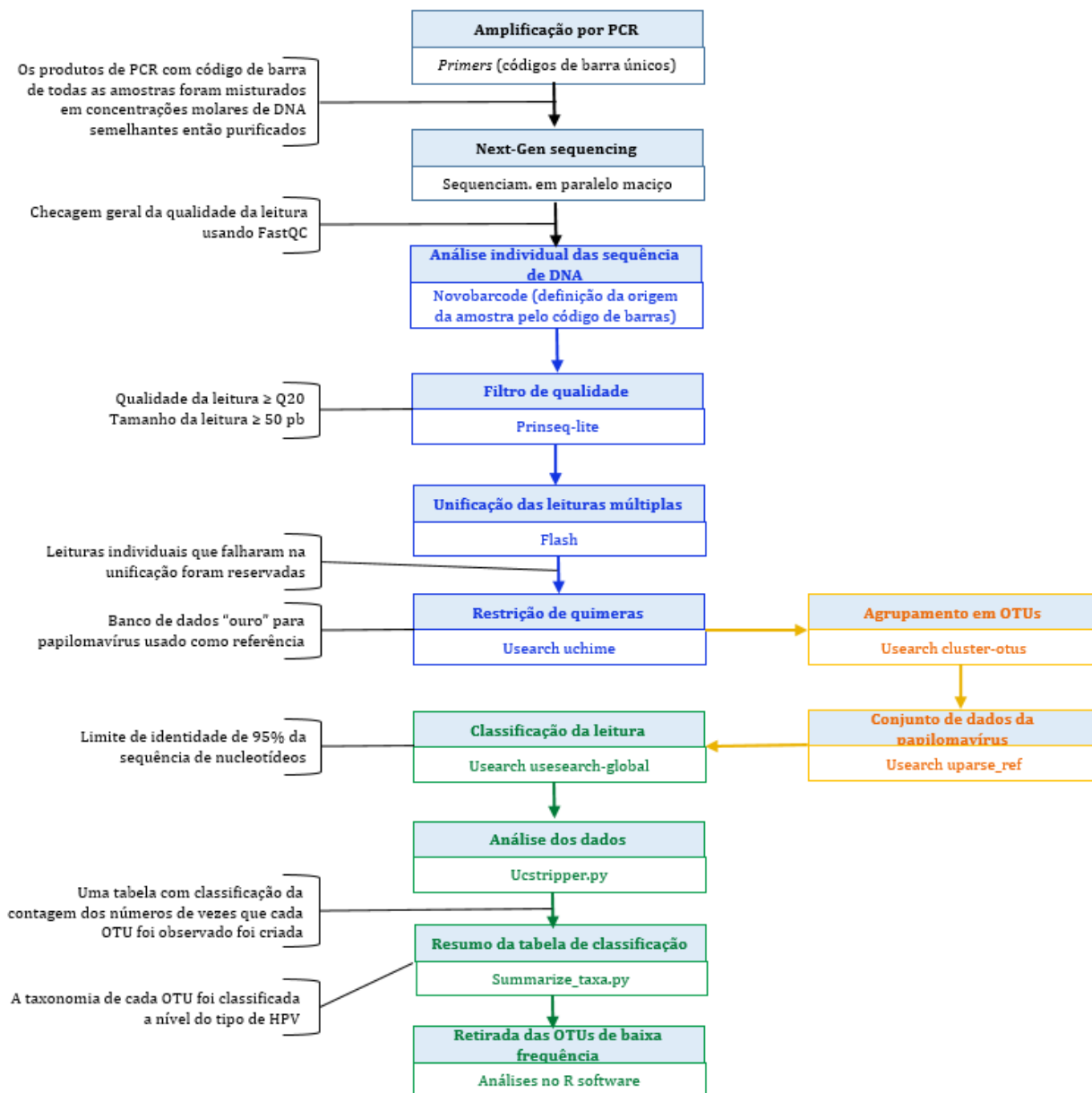
aparelho HiSeq Illumina® (Illumina Inc., California, USA) no Albert Einstein Epigenomics Facility (New York, USA) usando leituras término-pareadas.

### **Procedimentos de bioinformática e classificação taxonômica**

Para os procedimentos de bioinformática e classificação taxonômica, as leituras de DNA término-pareadas do Illumina® foram analisadas individualmente de acordo com seus códigos de barra específicos para cada amostra, usando Novobarcode v1.00® (<http://www.novocraft.com/>), filtradas para leituras de baixa qualidade (Q20) e de curto tamanho (50 pb), utilizando Prinseq-lite v0.20.4® (53), e transformadas em leituras únicas usando o Flash v1.2.7® (54). As leituras terminais que não puderam ser unificadas foram anexados e reservados. As sequências lidas foram então submetidas à restrição de quimeras usando UChime® (55) em USEARCH v 7.0.1001® (56) contra um banco de dados de referência “ouro” para papilomavírus. Todas as leituras que passaram pelo filtro de controle de qualidade foram então agrupadas em unidades taxonômicas de operação com 95% de identidade (do inglês, OTUs) e atribuída uma taxonomia de HPV utilizando USEARCH®. Uma tabela de contagem do número de vezes que cada tipo de HPV foi observado em cada amostra foi criada e a taxonomia de cada vírus detectado foi classificada a nível do tipo de HPV (e não suas variantes). A figura 3 demonstra o fluxograma de procedimento de bioinformática.

Criamos um conjunto de dados de papilomavírus para atribuições taxonômicas usando o algoritmo UPARSE® (57). Em resumo, todas as leituras foram classificadas segundo a abundância das mesmas, para descartar os *singletons*, a fim de melhorar a especificidade do método diagnóstico. As sequências classificadas foram então agrupadas em OTUs dentro do limite de 95% de identidade. Uma vez que as sequências quiméricas foram abatidas a partir do conjunto de dados, os OTUs agrupados foram classificados usando o algoritmo UPARSE-REF® e o banco de dados de referência (próprio) para HPV. Note-se que as sequências de referência foram aparadas para incluir apenas a região amplificada por cada ensaio NGS, excluindo assim as sequências dos códigos de barra. Se as OTUs apresentarem identidade de 60 a 95% em relação às sequências de HPV do banco de dados de referência, estas representavam potenciais tipos novos de

papilomavírus. As OTUs com menos de 60% de identidade para um tipo de HPV conhecido foram classificadas como sequências não-papilomavírus.



**Figura 11:** Fluxograma detalhado de procedimentos de bioinformática para análise e classificação taxonômica de HPV, a partir das leituras do sequenciamento NG, Laboratório Burk, Nova York, EUA, 2014.

### **Ponto de corte da OTUs e definição de positividade para HPV**

Valores de corte foram estabelecidos para remover leituras (OTUs) de baixa frequência. Dependendo do número total de sequências, OTUs pouco frequentes foram descartados em cada ensaio do NGS. Para cada amostra, o teste de positividade para um tipo de HPV foi considerada negativa se o número de leituras na amostra foi inferior a 0,5% do número máximo de leitura deste mesmo tipo em uma outra amostra do mesmo ensaio. Uma amostra foi considerada negativa se o número total de leituras de HPV foi inferior a este limiar definido para cada ensaio. Para cada uma das amostras positivas com múltiplos tipos de HPV, para um dado tipo de HPV ser considerado presente, o número de leituras deveria ser maior do que 1% do número total de leituras de HPV naquela amostra.

### **Análises de controle de qualidade**

Cem amostras (15%) foram selecionadas aleatoriamente para repetição da amplificação por PCR e NGS. Os ensaios foram realizados de modo cego. A concordância da prevalência de genótipos de HPV entre os dados originais e o conjunto de controle de qualidade foi superior a 97% (índice *kappa* = 0,92).

### **Método de análise de dados**

#### **Definição de variáveis**

A variável desfecho principal foi a prevalência de infecção por HPV (e seus genótipos), calculada pela razão entre número de amostras positivas e número de exames coletados, e expressas com intervalo de confiança de 95%. A prevalência de lesões pré-malignas e malignas cervicais foi considerada variável desfecho secundária, e definida como a razão entre número de resultados alterados e o número de exames coletados no período. Dados pessoais e demográficos das voluntárias foram considerados variáveis independentes/descriptivas.

## **Análise estatística**

Análise estatística descritiva foi realizada, incluindo frequência de distribuição para variáveis categóricas, e médias (com desvio padrão) e medianas (com desvio interquartilico) para variáveis contínuas, com distribuição normal e não normal, respectivamente. A prevalência das variáveis desfecho e seus intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram estimados baseados em distribuição binomial, e corrigidos pela estrutura etária (SIASI) das comunidades indígenas de cada DSEI. Para comparação de médias amostrais, foi utilizado o teste t de Student para variáveis de distribuição normal e com homogeneidade de variâncias amostrais. Senão, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para este propósito. A concordância entre observadores foi realizada pelo índice *kappa* de Cohen. A avaliação de diversidade ecológica para tipos de HPV foi realizada pelo índice de Shannon-Weiner (calculado com logaritmo natural), e a comparação entre os índices de cada grupo foi realizado pelo teste de Mann-Whitney. Foi utilizado o teste do  $\chi$ -quadrado para comparar diferenças de proporções de variáveis categóricas. *Odds ratio* (OR) e IC95% foram calculados em análise univariada e *Odds Ratio* ajustada (aOR) em análise multivariada por regressão logística. O critério de seleção de variáveis explicativas para entrada na análise multivariada foi o valor crítico de  $p < 0,15$  na análise univariada. Os dados foram tabulados e analisados utilizando-se o *software* MedCalc® versão 12.7.0 (Ostend, Bélgica).

## **Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – AM, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer nº 325/2012; protocolo CONEP 16.800). Os líderes tribais consentiram e autorizaram a execução do estudo (figura 12). Ressalta-se que perguntas sobre menarca, sexarca, histórico de doenças sexualmente transmissíveis e comportamento sexual foram vetadas pelos líderes tribais e foram excluídas do questionário. Ratifica-se que todas as voluntárias foram

esclarecidas sobre os propósitos e métodos do estudo em seus próprios dialetos, com auxílio de tradutores da SESAI, e consentiram formalmente com a sua participação.



**Figura 12:** Reunião com líderes tribais Yanomami durante reunião de Conselho Indígena Yanomami para obtenção de autorização da pesquisa. Comunidade indígena Maturacá - DSEI Yanomami, Amazonas, Brasil.

Fonte: Acervo próprio.

## RESULTADOS

Para estudar as diferenças entre os povos indígenas que possuem um estilo de vida primitivo na floresta e um estilo de vida mais ocidental, foi selecionada uma amostra aleatória de 2 regiões do norte do Brasil. Treze aldeias indígenas foram visitadas e 664 mulheres nativas foram incluídas, representando 76% das mulheres habitantes das comunidades, em idade reprodutiva (15 a 40 anos), de acordo com o senso demográfico indígena (4). Destas, 359 (54%) eram mulheres Macuxi ou Wapichana, e 305 (46%) eram mulheres Yanomami. Três indígenas foram excluídas da coleta de material biológico por não permitir a coleta do exame (n=1) e por não apresentarem sinais de atividade sexual prévia ao exame ginecológico (n=2). A amostra final consistiu de 661 mulheres.

A média de idade foi de 35,8 anos ( $\pm 14,5$ ), e variou de 12 a 92 anos. Cerca de um terço dos participantes tinha entre 3 e 5 filhos (n = 241, 36,4%) e 48 (7,2%) mulheres estavam grávidas no momento do exame. Dentre as 46 mulheres sem filhos (6,9%), 27 já haviam engravidado pelo menos uma vez. A idade média das mulheres no primeiro parto foi de 18,6 anos ( $\pm 4,1$ ). A maioria das mulheres eram casadas ou viviam com um homem (n = 539, 80,9%). Entre estas, a idade média ao casamento foi de 20,6 anos ( $\pm 7,9$ ). A tabela 3 apresenta e compara as características demográficas entre os grupos étnicos. As mulheres Yanomami eram mais jovens, se casaram com menos idade, tiveram o primeiro parto em uma idade mais jovem e eram mais propensas a estar atualmente grávidas.

Quando perguntadas se haviam realizado pelo menos um teste de Papanicolau, nos últimos três anos, 366 (58%) de 661 mulheres relataram ter realizado o teste. Considerando somente as mulheres entre 25 e 64 anos (n = 517), 427 (82,6%) das mulheres relataram ter sido rastreadas para câncer do colo do útero uma ou mais vezes, e 264 (51,0%) das mulheres afirmaram que eles haviam realizado três ou mais exames citológicos cervicais. As mulheres Yanomami informaram menor cobertura do programa de rastreamento preventivo (tabela 3). Apenas 22 (3,3%) mulheres estavam cientes dos resultados da sua citologia prévia, e todos eram do Distrito Leste. Oito mulheres do Distrito Leste (2,2%) haviam sido submetidas a histerectomia, das quais duas foram por câncer de colo de útero.

Apenas duas mulheres Yanomami haviam sido submetidas a histerectomia e desconheciam do motivo da cirurgia.

**Tabela 3:** Características demográficas e clínicas de mulheres indígenas nativas da região norte da Amazônia brasileira, Brasil, 2013.

	Distrito Yanomami	Distrito Leste	p valor
<b>Idade (anos)</b>	33.1 ( $\pm$ 13.1)	38,1 ( $\pm$ 14.6)	0,001
<b>Número de filhos</b>	3.5 ( $\pm$ 2.3)	4.6 ( $\pm$ 2.9)	ns
<b>Número de gravidezes prévias</b>	4.5 ( $\pm$ 2.8)	5.5 ( $\pm$ 3.4)	ns
<b>Atualmente grávida</b>	32 (10.4%)	16 (4.4%)	0.004
<b>Idade ao nascimento do primeiro filho (anos)</b>	16.0 ( $\pm$ 3.1)	20.1 ( $\pm$ 4.8)	0.004
<b>Situação marital</b>			
Solteira	34 (11.1%)	57 (15.8%)	ns
Casada/união estável	249 (81.6%)	290 (80.3%)	ns
Viúva/separada/divorciada	20 (6.5%)	14 (3.9%)	ns
<b>Idade ao casamento (anos) (n=573)</b>	17.1 ( $\pm$ 5.1)	21.5 ( $\pm$ 8.3)	0.001
<b>Realização do exame de Papanicolaou pelo menos:</b>			
1 vez nos últimos 3 anos (n=631)	118 (42.0%)	248 (70.6%)	<0.0001
1 vez ao longo da vida (>24 anos) (n=517)	158 (72.8%)	269 (89.6%)	<0.0001
3 vezes ao longo da vida (>24 anos) (n=517)	75 (34.5%)	189 (63.0%)	<0.0001
<b>Histerectomia prévia</b>	2 (0.6%)	8 (2.2%)	ns

ns: não significativo ( $p < 0,05$ ).

Dentre as 607 amostras citológicas consideradas tecnicamente satisfatórias, a prevalência de alterações citológicas foi de 3,3% (IC 95%: 2,1 - 5,1%). Citologias alteradas consistiram de 10 casos de ASC-US (1,6%), 7 casos de LSIL (1,15%), 2 casos de HSIL (0,33%) e 1 caso de carcinoma invasivo (0,17%). A prevalência de citologia alterada foi maior nas mulheres indígenas do Distrito Yanomami do que do Distrito Leste (5,1% vs 1,8%, respectivamente,  $p = 0,04$ ). Não houve diferença significativa quanto a presença de infiltrado inflamatório nas citologias das mulheres

Yanomami e das mulheres do Distrito Leste (68,0% vs 74,7%, respectivamente). A tabela 4 mostra e compara os resultados da citologia e HPV para cada grupo.

**Tabela 4:** Resultados de citologia cervicovaginal e pesquisa de HPV-DNA.

	Distrito Yanomami	Distrito Leste	p valor
<b>Lâminas satisfatórias</b>	275 (94.2%)	332 (94.5%)	ns
<b>Alteração na citologia cérvicovaginal (qualquer)</b>	14 (5.1%)	6 (1.8%)	0.04
ASC-US	7 (2.5%)	3 (0.9%)	ns
LSIL	4 (1.5%)	3 (0.9%)	ns
HSIL	2 (0.7%)	0	ns
Câncer invasivo	1 (0.4%)	0	ns
<b>Infecção por HPV (todas as idades)</b>	140 (45.9%)	124 (34.5%)	0.003
≤35 anos	88 (44.6%)	79 (44.1%)	ns
>35 anos	52 (49.0%)	45 (25.0%)	<0.0001
<b>Infecção por HPV de alto risco (todas as idades)<sup>&amp;</sup></b>	104 (34.1%)	69 (19.2%)	<0.0001
≤35 anos	65 (32.9%)	50 (27.9%)	ns
>35 anos	39 (36.8%)	19 (10.5%)	<0.0001
<b>Infecção por HPV16 (todas as idades)</b>	29 (9.5%)	10 (2.8%)	0.001
≤35 anos	17 (8.6%)	7 (3.9%)	ns
>35 anos	10 (9.4%)	3 (1.6%)	0.005
<b>Infecção por HPV18 (todas as idades)</b>	22 (7.0%)	7 (1.9%)	0.003
≤35 anos	14 (7.1%)	6 (3.5%)	ns
>35 anos	7 (6.6%)	1 (0.5%)	0.008
<b>Coinfecção por múltiplos tipos de HPV (todas as idades)</b>	72 (23.6%)	47 (13.0%)	<0.0001
≤35 anos	49 (24.8%)	33 (18.4%)	0.02
>35 anos	23 (21.3%)	14 (7.7%)	<0.0001
<b>Tipos cumulativos de HPV detectados / amostra positiva</b>	2.1	1.8	0.02
<b>Diversidade de tipos de HPV em mulheres positivas</b>			
Número de tipos de HPV	42	52	-
Índice de diversidade ecológica <sup>#</sup>	0.52	0.39	0.012

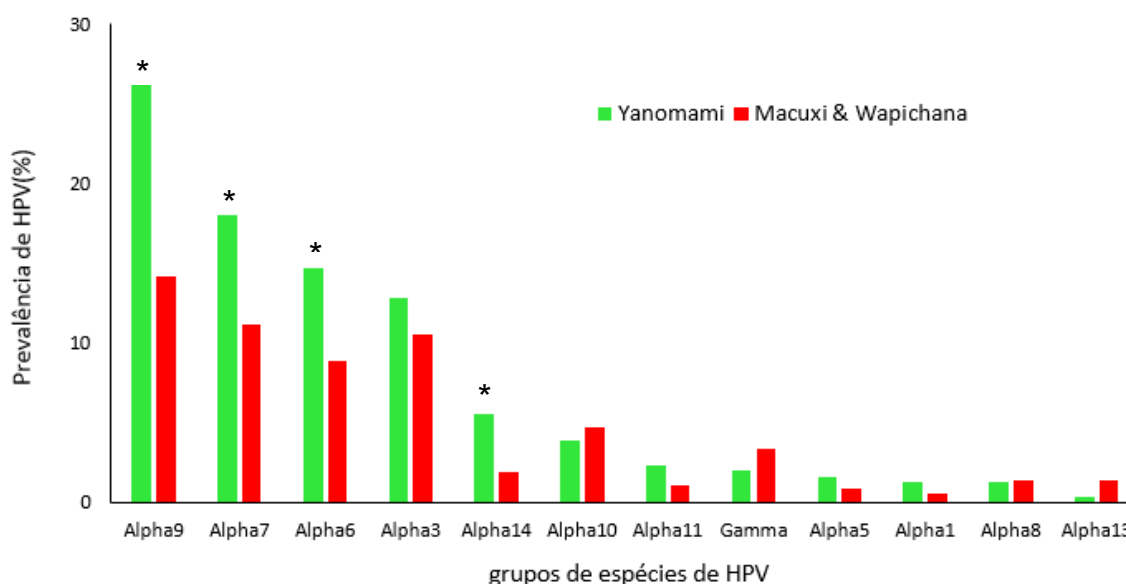
<sup>&</sup>HPV de alto risco corresponde aos tipos:16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66.

<sup>#</sup>Índice de Shannon-Wiener (calculado em logaritmo natural).

ns: não significativo; ASC-US: do inglês, atipia celular escamosa de significado indeterminado; LSIL: do inglês, lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL: do inglês, lesão intraepitelial de alto grau.

A prevalência de HPV foi de 39,7% (IC 95%: 37,6% a 41,8%). A infecção pelo HPV foi mais comum em mulheres Yanomami do que em mulheres Macuxi e Wapichana (45,9% vs 34,5%, respectivamente,  $p = 0,003$ ). Entre os casos positivos, coinfeção por múltiplos tipos de HPV foi detectado em 17,1% das mulheres, e variou de dois tipos ( $n = 58$ ) a 11 tipos de HPV ( $n = 1$ ), com uma média de 1,9 tipos de HPV por participante positiva. A prevalência de infecções múltiplas tipo foi maior nas mulheres do Distrito Yanomami do que nas do Distrito Leste (29,6% vs 13,0%, respectivamente;  $p < 0,0001$ ).

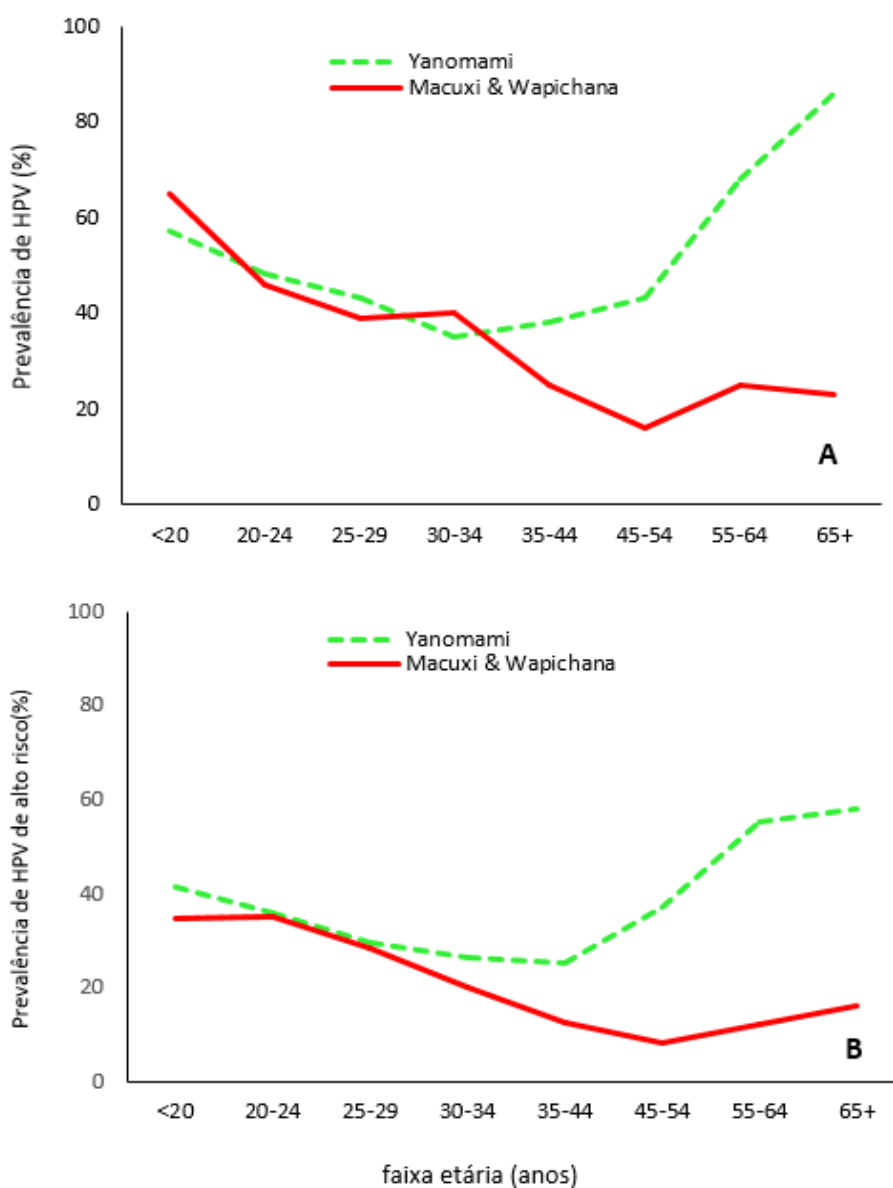
**Figura 13:** Prevalência de HPV por grupo de espécies.



\* diferença significativa na prevalência de HPV entre os grupos indígenas ( $p < 0,05$ ).

Sessenta tipos diferentes de HPV (representando 12 grupos de espécies de HPV) foram detectados (figura 13). Nas mulheres Yanomami, foram detectados 42 tipos de HPV, em comparação com 52 tipos nas mulheres Macuxi e Wapichana (Tabela 4). Adicionalmente, a análise de diversidade de tipos de HPV indicou maior diversidade ecológica para as mulheres Yanomami. Oito tipos de HPV apresentaram variabilidade nucleotídica no fragmento amplificado maior que 5% em relação ao genótipo mais próximo, a maioria ( $n = 7$ ; 87,5%) eram do Distrito Leste. Os tipos mais prevalentes em mulheres Yanomami foram HPV16 ( $n = 29$ ; 9,5%), HPV31 ( $n = 27$ ; 8,8%) e HPV18 ( $n = 22$ ; 7,2%). Considerando as mulheres Macuxi e Wapichana,

o HPV31 (n = 17; 8,6%), HPV68 (n = 14; 3,8%), e o HPV53 (n = 11; 3,0%) foram os mais comuns.



**Figura 14:** Prevalência de HPV (gráfico A) e de HPV de alto risco (gráfico B) por grupos de idade, mulheres Yanomami, Macuxi e Wapichana, Brasil, 2013.

A prevalência de tipos de HPV de alto risco foi de 26,5% (n = 173), e foi maior nas mulheres Yanomami (34,1% vs 19,2%,  $p < 0,0001$ ). As mulheres Yanomami também apresentaram maior prevalência de infecção por HPV16 (9,5% vs 2,8%,  $p = 0,001$ ) e por HPV18 (7,2% vs 1,9%,  $p = 0,003$ ) em relação às mulheres Macuxi e Wapichana. Não houve diferença na prevalência de HPV (ou HPV de alto risco)

entre os grupos étnicos quando analisadas apenas participantes abaixo de 35 anos de idade (figura 14). No entanto, considerando-se as mulheres com mais de 35 anos, o grupo Yanomami apresentou maior prevalência da infecção pelo HPV, HPV de alto risco, HPV16 e HPV18 em relação ao grupo do DSEI Leste (tabela 4). Foram identificados três casos de HSIL e/ou carcinoma invasor em mulheres Yanomami, todas com mais de 45 anos de idade, infectadas com tipos HPV de alto risco (HPV16 e HPV31). A prevalência da infecção pelo HPV nos casos de ASC-US e LSIL (n = 17) foi de 88%, e os tipos mais comuns foram HPV31 (41,1%) e HPV16 (17,3%).

**Tabela 5:** Análises univariada e multivariada dos fatores de risco para alterações citológicas em mulheres indígenas nativas da região norte da Amazônia.

Variáveis independentes	Citologia cervicovaginal alterada (qualquer alteração)*				
	Total	Sim (%)	p valor	OR (IC 95%)	OR ajustado (IC 95%)
<b>Distrito Yanomami</b>	275	14 (5.1%)	0.04	2.64 (1.5 – 7.1)	2.1 (1.1 – 5.5)
<b>Distrito do Leste</b>	332	6 (1.8%)		1	1
<b>Grávida</b>	44	7 (15.9%)	0.0002	8.69 (3.2 – 23.6)	5.8 (2.0 – 16.6)
<b>Não grávida</b>	563	12 (2.1%)		1	1
<b>Até 35 anos</b>	326	15 (4.6%)	0.033	3,32 (1.1 – 10.1)	2.0 (0.8 – 6.7)
<b>Mais de 35 anos</b>	279	4 (1.4%)			1
<b>Pelo menos 1 Papan. ao longo da vida</b>	471	12 (2.5%)	0.13	0.48 (0.2 – 1.2)	0.65 (0.2 – 1.7)
<b>Não</b>	136	7 (5.1%)		1	1
<b>Solteira</b>	86	2 (2.3%)	ns	0.72 (0.2 a 3.1)	-
<b>Casada/união estável</b>	521	17 (3.2%)		1	
<b>Pelo menos 1 Papan. nos últimos 3 anos</b>	342	10 (2.9%)	ns	0.91 (0.3 – 2.5)	-
<b>Não</b>	233	7 (3.0%)		1	
<b>Idade ao nascimento do 1º filho &lt; 20 anos</b>	252	6 (2.3%)	ns	0.85 (0.2 – 3.0)	-
<b>≥ 20 anos</b>	141	4 (2.8%)		1	
<b>Mais de 4 gravidezes</b>	286	11 (3.8%)	ns	1.52 (0.6 – 1.8)	-
<b>4 ou menos gravidezes</b>	317	8 (2.5%)		1	

\*alteração citológica: ASC-US, LSIL, HSIL e carcinoma; ns: não significativo ( $p > 0,15$  para análise univariada, não selecionado para análise multivariada).

Considerando o exame citológico alterado (ASC-US, LSIL e HSIL) como desfecho (tabela 5), a análise univariada revelou que pertencer ao grupo Yanomami aumentou o risco de atipia celular (OR = 2,64; IC95% = 1,5 - 7,1). Idade menor que 35 anos e estar grávida também aumentaram significativamente a chance de anormalidade citológica. Etnia, idade, gravidez e testes de Papanicolaou anteriores foram avaliadas em análise multivariada. Pertencer à etnia Yanomami se manteve como um fator de risco, dobrando a chance de ter alteração da citologia cervical (aOR = 2,10; IC95% = 1,1 - 5,5). Estar grávida também aumentou significativamente o risco de citologia alterada (aOR = 5,82; IC95% = 2,0 - 16,6) em análise multivariada. Idade e exame de Papanicolaou anterior não se confirmaram como fatores de risco independentes para anormalidades citológicas em análise multivariada.

Considerando agora a infecção por HPV de alto risco como desfecho (tabela 6), pertencer ao grupo Yanomami duplicou o risco de infecção em relação ao grupo Macuxi e Wapichana (OR = 2,01; IC95% = 1,4 - 2,8). Ser solteira, ter até 35 anos de idade, ter mais de quatro gestações também foram fatores de risco significativos. A análise multivariada para infecção por HPV de alto risco identificou dois fatores de risco independentes: ser Yanomami aumentou em 70% o risco de infecção (aOR = 1,70; IC95% = 1,1 - 2,5), e ser solteira dobrou esse risco (aOR = 2,32; 95% CI = 1,3-3,5).

A avaliação da prevalência de HPV por PoB também revelou uma aglomeração geográfica de elevadas prevalências de HPV no grupo Yanomami. As aldeias localizadas no nordeste do Distrito Yanomami (Ericó, Alto-Mucajá e Palimi-ú; n = 60) apresentaram maior prevalência de infecção HPV de alto risco do que os outros PoB Yanomami (50,0% vs 30,3%, p = 0,005; OR = 2,29; IC95% = 1,2-4,0). No Distrito Indígena do Leste não houve diferença significativa entre os PoB.

**Tabela 6:** Análises univariada e multivariada dos fatores de risco para infecção por HPV de alto risco em mulheres indígenas nativas da região norte da Amazônia.

Variáveis independentes	Infecção por HPV de alto risco*				
	Total	Sim (%)	p valor	OR (IC 95%)	OR ajustado (IC 95%)
<b>Distrito Yanomami</b>	275	114 (37.4%)	<0.0001	2.01 (1.4 – 2.8)	1.70 (1.1 – 2.5)
<b>Distrito do Leste</b>	332	81 (22.5%)		1	1
<b>Grávida</b>	44	17 (35.4%)	ns	1.32 (0.7 – 2.4)	-
<b>Não grávida</b>	563	176 (27.2%)		1	
<b>Até 35 anos</b>	326	129 (35.2%)	<0.001	1.84 (1.2 – 2.6)	1.35 (0.8 – 2.1)
<b>Mais de 35 anos</b>	279	64 (22.7%)		1	1
<b>Pelo menos 1 Papan. ao longo da vida</b>	471	136 (29.4%)	0.09	0.74 (0.5 – 1.1)	1.07 (0.5 – 1.9)
<b>Não</b>	136	54 (35.8%)		1	1
<b>Solteira</b>	86	41 (49.9%)	0.0001	2.57 (1.6 – 4.1)	2.32 (1.3 – 3.9)
<b>Casada/união estável</b>	521	136 (27.5%)		1	1
<b>Pelo menos 1 Papan. nos últimos 3 anos</b>	342	91 (26.8%)	0.01	0.64 (0.4 -0.9)	0.77 (0.4 – 1.3)
<b>Não</b>	233	91 (36.4%)		1	1
<b>Mais de 4 gravidezes</b>	286	105 (36.8%)	0.002	1.75 (1.2 – 2.4)	1.53 (0.9 – 2.3)
<b>4 ou menos gravidezes</b>	317	81 (25.0%)		1	1

\* HPV de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66.;

ns: não significativo ( $p > 0,15$  para análise univariada, não selecionado para análise multivariada).

## DISCUSSÃO

Apesar dos avanços significativos referentes às publicações sobre o câncer feminino no cenário brasileiro nas últimas décadas, as investigações epidemiológicas sobre etnicidade e saúde da mulher trabalham, em sua maioria, no contexto urbano, com mulheres negras (58, 59), permanecendo uma grande lacuna no conhecimento dos determinantes de saúde e doença das mulheres indígenas no Brasil.

Este estudo é um dos estudos pioneiros por amostragem aleatória de um grupo de mulheres indígenas da Amazônia de difícil acesso e revelou uma alta prevalência de HPV e de anormalidade citológicas cervicais em mulheres indígenas habitantes do norte da região amazônica brasileira. As mulheres Yanomami, mais isoladas geográfico e culturalmente, apresentaram maior prevalência de lesões citológicas que as mulheres Macuxi e Wapichana. As prevalências de LSIL e HSIL nas mulheres Yanomami (1,5% e 0,7%, respectivamente) assemelham-se às relatadas em outros estudos abordando a saúde da mulher indígena no Brasil. Mendes *et al.* (33) estudou 424 mulheres indígenas de 16 etnias diferentes, no estado do Pará e encontrou 2,1% de LSIL, 1,2% de HSIL. Pereira *et al.* (34) identificaram, entre 2004 e 2006, em Dourados, Mato Grosso do Sul, 2,1% de exames com LSIL e 0,6% de HSIL entre 989 mulheres da aldeia Jaguapiru e 1,8% LSIL e 1,1% de HSIL na aldeia Bororó. Para comparação, estudos clássicos de âmbito nacional sobre alterações citológicas cervicais em mulheres não indígenas no Brasil revelaram prevalências mais baixas. Lippman *et al.* (60) descreveram os resultados do rastreamento de 818 mulheres (não indígenas) assintomáticas (procedentes de zonas urbanas e rurais brasileiras), com baixa prevalência de LSIL (0,9%), e nenhum caso de HSIL ou câncer invasivo. Um clássico estudo de corte transversal (61) realizado em 2.329 mulheres brasileiras assintomáticas (não indígenas) revelou apenas 0,9% de LSIL e 0,2% de HSIL. Tais prevalências relatadas em mulheres não indígenas brasileiras assemelham-se às encontradas no presente estudo, em mulheres indígenas Macuxi e Wapichana, consideradas de interação permanente com a sociedade ocidental (0,9% de LIBG e nenhum caso de LIAG).

Nosso estudo também evidenciou elevada prevalência de infecção por HPV, chegando a 45,9% em mulheres Yanomami. Tal prevalência de HPV é maior do que aquelas comumente relatadas no Brasil. Estudos sobre prevalência de HPV no Brasil são geralmente concentrados nas regiões mais desenvolvidas do país (Sul e Sudeste), e estes estudos revelam taxas que variam de 13 a 28% em mulheres assintomáticas (não-indígenas), e geralmente utilizam PCR seguido de sequenciamento genético baseado no método Sanger (62-64). Dois importantes estudos foram realizados em regiões da Amazônia. Rocha *et al.* (65) publicaram um estudo de base populacional avaliando mulheres não-indígenas da região amazônica do Brasil (de áreas rural e urbana). A prevalência de HPV foi de 29,1%, considerada alta pelos autores. Assim como em nosso estudo, 97% das citologias foram normais. Castro *et al.* (66) também avaliaram a prevalência de HPV em mulheres urbanas da Amazônia central (Brasil). Utilizando o sequenciamento genético tipo Sanger, eles detectaram infecção cervical por HPV em 25% das participantes que consistiam de mulheres assintomáticas que procuram o serviço preventivo e mulheres referenciadas a um serviço terciário com suspeita de infecção por HPV. Ainda assim, uma prevalência inferior ao nosso estudo. No entanto, é notável que, nesses estudos que avaliaram mulheres não indígenas da Amazônia, a prevalência relativa (e absoluta) de HPV16 foi substancialmente maior do que nas mulheres indígenas do nosso estudo. Rocha *et al.* (65) descreveram que quase 60% dos HPVs detectados foram HPV16 (uma prevalência absoluta de HPV16 = 16,8%), enquanto Castro *et al.* (66) relataram uma prevalência relativa de HPV16 de 56% entre as mulheres positivas (prevalência absoluta = 14,8%). No grupo Yanomami, o HPV16 foi responsável por apenas 19% das amostras positivas (prevalência absoluta = 9,5%), e no grupo Macuxi e Wapichana, apenas 2,8% em termos absolutos. O oposto foi encontrado em relação ao HPV18. O HPV 18 não tem sido comumente detectado em estudos brasileiros, ou, geralmente se apresentam com uma prevalência inferior a 1% em mulheres assintomáticas. No estudo de Rocha *et al.* nenhuma participante foi positiva para HPV-18, bem como no estudo de Castro *et al.* No entanto, o HPV18 foi o terceiro tipo mais comum no nosso estudo, presente em 7% de mulheres Yanomami (15% de amostras positivas), e 2% no grupo indígena do Leste (5% de amostras positivas).

Observou-se também uma alta diversidade genotípica de HPV em ambos os grupos indígenas, porém maior nas mulheres Yanomami. Enquanto Rocha *et al.* (65) encontraram 14 tipos de HPV (16, 33, 81, 6, 70, 31, 35, 45, 52, 53, 61, 68, 71 e 89) e Castro *et al.* (66) descreveram apenas 7 tipos de HPV (16, 33, 66, 13, 33, 58, 68) em mulheres da Amazônia, o nosso estudo detectou mais de 60 tipos de HPV. Não obstante que tal diferença possa estar também relacionada com os métodos laboratoriais diferentes, esta diversidade implicou em considerável prevalência de HPVs de alto risco não preveníveis pela vacina quadrivalente (utilizada no Brasil) nos distritos indígenas, de modo que 69% das mulheres indígenas infectadas pelo HPV de alto risco não seriam protegidas pela vacina quadrivalente, a menos que proteção cruzada ocorresse com tipos filogeneticamente próximos aos HPVs vacinais. Apesar de proteção cruzada ter sido descrita para os HPV45 e HPV31 (67), estudos referentes à proteção cruzada ainda são limitados. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina de HPV 9-valente (68), com proteção expandida para os HPV 31/33/45/52/58, recentemente aprovado pelo FDA nos Estados Unidos, representa a possibilidade de uma melhor eficácia para estas mulheres indígenas.

Os resultados acima classificam as mulheres indígenas do norte da Amazônia como de alto risco de infecção pelo HPV e câncer de colo de útero. Em especial o grupo Yanomami, que coexiste geograficamente, mas histórico e socialmente separado do grupo Macuxi e Wapichana. O impacto das mudanças ambientais e socioculturais que ocorrem em praticamente todas as comunidades indígenas sobre a saúde das mulheres têm apontado para o aumento da incidência de doenças crônicas e degenerativas devido ao crescente contato com o estilo de vida ocidental (69). Neste contexto, seria esperado que as comunidades do Distrito Leste apresentassem uma maior prevalência de lesões precursoras do câncer de colo do útero, uma vez que possuem dois séculos a mais de interação com a sociedade envolvente em relação às Yanomami. No entanto, os dados apontam consistentemente para o oposto. Ser um membro do grupo indígena mais isolado foi um fator de risco para lesões intra-epiteliais cervicais e para infecção por HPV de alto risco. Este fato, juntamente com a elevada biodiversidade genotípica de HPV, pode significar que os Yanomami abrigam endogenamente infecções por HPV há um longo período histórico, precedendo a chegada dos colonizadores europeus na América.

Características e práticas culturais relevantes para a saúde reprodutiva das mulheres Yanomami foram destacados por Early *et al.* (70) e podem ajudar a explicar o seu elevado risco para HPV e câncer de colo de útero. Este estudo de enfoque antropológico descreveu que as meninas Yanomami residem na casa de seus pais até 2 anos após a menarca (12,4 anos, em média), quando se mudam para a casa dos pais do noivo e começam a atividade sexual. Em consonância com o nosso estudo, Early *et al.* relataram uma média de idade materna no momento do nascimento do primeiro filho de 16 anos. Além da exposição sexual precoce. Relataram também um curto período intergenésico, multiparidade (taxa de fertilidade = 8 filhos por mulher), e múltiplos parceiros sexuais. Os autores também destacaram que, durante o período reprodutivo (15 a 40 anos), as mulheres Yanomami passam cerca de 90% do seu tempo grávidas e/ou amamentando. Outro fator importante que pode contribuir para a maior prevalência de lesões intraepiteliais cervicais entre os Yanomami é o seu isolamento geográfico na floresta. Dificuldades de entendimento e aceitação do rastreamento pelas mulheres, deficiências de infraestrutura e barreiras logísticas relacionadas a dificuldades de acesso podem explicar a baixa inclusão das mulheres Yanomami nos programas de prevenção. A maior prevalência de mulheres Yanomami (em idade alvo) que nunca havia realizado um exame citológico no presente estudo corroboram com esse conceito.

Um tópico que merece atenção é a relação entre HPV e a idade das mulheres nestes grupos. A prevalência de HPV no Distrito Indígena do Leste apresentou uma curva em forma de L, semelhante ao descrito para mulheres não indígenas do Brasil e de outros países ocidentais. No entanto, o Distrito Yanomami apresentou uma curva em forma de U. Ressalta-se a elevada e crescente prevalência de HPV e HPV de alto risco em mulheres Yanomami a partir de 35 anos de idade, atingindo uma prevalência de cerca de 80% após os 65 anos (60% para HPVs de alto risco). Um estudo nacional (29) descreveu o perfil de citologia cervicovaginal (mais de 4 milhões de testes) realizados em mulheres indígenas e não-indígenas em todo o Brasil (entre 2008 e 2012). Quando os grupos étnicos foram comparadas, a prevalência de HSIL foi 2-3 vezes maior em mulheres indígenas do que em mulheres não-indígenas no grupo de idosas (> 64 anos de idade), merecendo uma análise mais específica, segundo os autores. A alta prevalência de HPV de alto risco demonstrada em nosso estudo pode ajudar a explicar este achado. Este padrão de

curva de prevalência ascendente com a idade também foi observado em mulheres nativas da Nigéria rural e outras regiões da África Sub-Sahariana. Clarke *et al.* (71) realizaram um estudo de base populacional sobre a prevalência de HPV de alto risco em mulheres africanas e também observaram um aumento expressivo da prevalência de infecção HPV de alto risco após 35 anos de idade. A explicação para essa inusitada prevalência de HPV em idades mais avançadas permanece indefinida. Questões culturais e comportamentais, levando à contínua exposição sexual em idades mais avançadas, e uma menor capacidade de depuração viral entre as mulheres indígenas mais velhas podem estar implicadas neste processo. A persistência a longo prazo da infecção por HPV em povos isolados da Amazônia e da África, que apresentam um estilo de vida tipo caçador-coletor, sugere que este padrão ascendente pode representar, nos dias atuais, uma característica da mulher primitiva, e que os padrões refletindo diminuição da prevalência de HPV com a idade na sociedade ocidental atual representem uma mudança recente, possivelmente uma adaptação vírus-hospedeiro ao longo dos milênios, que propiciou sucesso evolutivo do HPV como um organismo simbiótico replicativo.

Apesar da identificação de oito novos genomas de HPV, apenas um foi identificado no grupo étnico mais isolado. Estes tipos foram raros, e não fomos capazes de identificar novos tipos de HPV endêmicos nas mulheres Yanomami, que supostamente estão isoladas (ou parcialmente isoladas) das populações não indígenas há pelo menos 12.000 anos. Parece mais provável que a maioria, se não todos, os tipos de HPV evoluiu milhares de anos atrás, em primatas pré-humanos até as formas genômicas análogas às atuais, e se mantiveram genomicamente estáveis até os dias de hoje. Estudos futuros sobre as variantes de HPV nessas mulheres podem elucidar as origens do HPV.

Este trabalho possui limitações. Primeiro, o método de amostragem utilizado, por conglomerado, pode falhar em tornar a amostra fielmente representativa da população. Em virtude das dificuldades logísticas de acesso, este foi o melhor método de amostragem possível. Entretanto, a seleção aleatória de comunidades estudadas aumenta a representatividade da amostra. Segundo, o delineamento transversal não permitiu a utilização da temporalidade como critério de causa para a infecção por HPV, uma vez que fatores de risco e desfecho foram aferidos sincronicamente e o viés da causalidade reversa não pode ser eliminado. Terceiro, o

uso de formulários para coleta de dados referentes a fatores de risco pode ser falho, em virtude de ocultação da verdade e mascaramento de respostas. Somam-se a isso barreiras culturais e de linguagem peculiares às populações indígenas. Porém, o fato dos procedimentos de pesquisa terem sido realizados em conjunto com profissionais da SESAI, habituais para as mulheres estudadas, fortalece a credibilidade das observações. Por último, a maioria das mulheres Yanomami não conhecia do calendário cristão, e suas idades são registradas e informadas baseadas no ciclo lunar, tornando estes dado relativamente impreciso, principalmente para as participantes mais idosas, o que requer cautela na interpretação. No entanto, nós analisamos os dados de idade utilizando as categorias de idade padronizadas pela IARC (International Agency for Research on Cancer), o que aumenta a credibilidade dos resultados.

## **CONCLUSÃO**

As mulheres indígenas do extremo norte da Amazônia brasileira, em especial da etnia Yanomami, possuem risco aumentado de câncer de colo de útero, devido à alta prevalência de HPV de alto risco e uma elevada diversidade genotípica. O aumento da prevalência de HPV com a idade foi observado nas mulheres Yanomami, o que pode representar um padrão de infecção viral em mulheres com estilo de vida caçador-coletor. Houve uma menor prevalência relativa e absoluta de HPV16 em relação ao descrito em mulheres não-indígenas do Brasil, e o oposto foi observado para o HPV18. Apesar da identificação de oito potenciais novo genomas de HPV, não fomos capazes de demonstrar a presença de novos papilomavírus endêmicos originais das mulheres Yanomami.

Quando disponível no Brasil, a vacina 9-valente contra o HPV deveria ser prioritariamente oferecida às comunidades indígenas por apresentar maior diversidade genotípica de HPV, e conseqüente menor representatividade dos genótipos virais presentes nas vacinas atualmente disponíveis contra o HPV.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este estudo abre oportunidades para avaliação das variantes do HPV, em especial dos tipos 16, para melhor definição de suas origens e co-evolução com os nativos das Américas. Apesar da não identificação de genomas novos neste trabalho, estudos mais amplos podem ser capazes de identificar tipos de HPV endêmicos destas populações especiais.

## REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014. Rio de Janeiro [cited 2014]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
3. Fonseca AJ, Ferreira LP, Dalla-Benetta AC, Navarro C, Ferreira ML. Epidemiologia e impacto economico do cancer de colo de utero no Estado de Roraima: a perspectiva do SUS. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2010;32(8):386-92.
4. Brasil. Ministério da Saúde. SIASI: Sistema de Informação da Atenção da Saúde Indígena. Brasília, 2013. Brasília. [cited 2013.]. Available from: [www.saude.gov.br/siasi](http://www.saude.gov.br/siasi).
5. Fonseca AJd, Amorim LDdC, Murari RSW, Arcoverde LC, Ferreira LCdL. Prevalência de alterações citológicas cervicais em indígenas do extremo norte da Amazônia brasileira. *REv Bras Cancerol*. 2014;60(2):101-8.
6. WHO. Health of indigenous people. Geneva 2007 [2013 jul 13]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs326/en/>.
7. Coimbra Jr CEA, Santos RV. Saúde, minorias e desigualdade: algumas teias de inter-relações, com ênfase nos povos indígenas no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2000;5(1):125-32.
8. Brito EB, Martins SJ, Menezes RC. Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. *Epidemiol Infect*. 2002;128(3):485-9.
9. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, Badano I, et al. Human papillomavirus cervical infection in Guarani Indians from the rainforest of Misiones, Argentina. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2004;8(1):13-9.
10. Kightlinger RS, Irvin WP, Archer KJ, Huang NW, Wilson RA, Doran JR, et al. Cervical cancer and human papillomavirus in indigenous Guyanese women. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(6):626 e1-7.
11. Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J, et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *Journal of medical virology*. 2003;69(4):546-52.
12. Ong CK, Bernard HU, Villa LL. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. *J Infect Dis*. 1994;170(5):1086-8.
13. Rigone-Stern D. Fatti statistici relative alle mallatie cancriose che servirono de base alla poche cose dette dal dott. *Giornale Service Propr Pathol Terap Ser*. 1842;2:507-17.
14. Rawls WE, Tompkins WA, Figueroa ME, Melnick JL. Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science*. 1968;161(3847):1255-6.
15. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current topics in microbiology and immunology*. 1977;78:1-30.
16. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;286(24):3106-14.
17. Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG, Du Q, Malkki M, Wilkerson HW, et al. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(7):1790-9.
18. Minkoff H, Feldman JG, Strickler HD, Watts DH, Bacon MC, Levine A, et al. Relationship between smoking and human papillomavirus infections in HIV-infected and -uninfected women. *J Infect Dis*. 2004;189(10):1821-8.

19. Zeferino LC, Bedone AJ, Faúndes A, Oyakawa N. Duração da Neoplasia Intra-Epitelial e do Carcinoma Invasor do Colo Uterino: Estudo Epidemiológico. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 1998;20:565-9.
20. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1415-23.
21. Chen Z, de Freitas LB, Burk RD. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1249:3-26.
22. Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, Beutner K, Coyne MY, Liang H, et al. Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(8):2058-63.
23. WHO. ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. [cited 2007]. Available from: <https://www.who.int/hpvcentre>.
24. Alexander C, Cason Z, Benghuzzi H, Martin L. Cytohistological correlation of abnormal cervical lesions in Native American females in Mississippi. *Biomedical sciences instrumentation*. 2001;37:25-30.
25. Bell MC, Schmidt-Grimminger D, Patrick S, Ryschon T, Linz L, Chauhan SC. There is a high prevalence of human papillomavirus infection in American Indian women of the Northern Plains. *Gynecologic oncology*. 2007;107(2):236-41.
26. Becker TM, Espey DK, Lawson HW, Saraiya M, Jim MA, Waxman AG. Regional differences in cervical cancer incidence among American Indians and Alaska Natives, 1999-2004. *Cancer*. 2008;113(5 Suppl):1234-43.
27. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, Galuppo JA, et al. [Prevalence of cervical infection by human papilloma virus (HPV) in the Caucasian and Guarani populations residing in the province of Misiones, Argentina]. *Revista Argentina de microbiologia*. 2003;35(4):205-13.
28. Kightlinger RS, Irvin WP, Archer KJ, Huang NW, Wilson RA, Doran JR, et al. Cervical cancer and human papillomavirus in indigenous Guyanese women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;202(6):626.e1-7.
29. Solé Pla MC, FM; Claro, IB; Silva, MAF; Dias, MBK; Bortolon, PC. Descriptive Analysis of the Profile of Cytopathologic Cervical Exams Carried out in Indigenous and Non-Indigenous Women in Brazil, 2008-2011. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2012;58(3):461-9.
30. Rodrigues DE, Marques RC. Prevalência do câncer cérvico-uterino em mulheres indígenas atendidas pela casa de saúde do índio de Porto Velho (RO), Brasil Porto Velho 2004 [cited 2011]. Available from: [http://www.unir.br/html/pesquisa/Pibic/area\\_03.htm](http://www.unir.br/html/pesquisa/Pibic/area_03.htm).
31. Taborda WC, Ferreira SC, Rodrigues D, Stavale JN, Baruzzi RG. [Cervical cancer screening among indigenous women in the Xingu Indian Reservation, central Brazil]. *Rev Panam Salud Publica*. 2000;7(2):92-6.
32. de Gois Speck NM, Pereira ER, Schaper M, Rodrigues D, Almeida P, Sakano CR, et al. Cytopathological screening in indigenous women from Parque Indígena do Xingu. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30(5):512-3.
33. Mendes ECS. Colposcopic, cytological and anatomo-pathological aspects of indigenous women from state of Pará. *Revista Paraense de Medicina*. 2004;18(1):11-8.
34. Pereira JC, Ganassin FMH, Oliveira RD, Renovato RD, Watanabe EAMT. Morbidade por câncer de colo uterino em mulheres de reserva indígena no Mato Grosso do Sul. *Cogitare Emferm*. 2011.;16(1):127-33.
35. BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena - SIASI. 2012. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=40846](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=40846).
36. Salzano FM, Jacques SM, Neel JV. Demographic and genetic relationships among Brazilian Wapishana Indians. *Ann Hum Biol*. 1980;7(2):129-38.

37. Dangour AD. Cross-sectional changes in anthropometric variables among Wapishana and Patamona Amerindian adults. *Hum Biol.* 2003;75(2):227-40.
38. Salzano FM, Mohrenweiser H, Gershowitz H, Neel JV, Mestriner MA, Simoes AL, et al. New studies on the Macushi Indians of northern Brazil. *Ann Hum Biol.* 1984;11(4):337-50.
39. Pithan OA, Confalonieri UE, Morgado AF. [The health status of Yanomami Indians: diagnosis from the Casa do Indio, Boa Vista, Roraima, 1987 - 1989]. *Cad Saude Publica.* 1991;7(4):563-80.
40. Spielman RS, Migliazza EC, Neel JV. Regional linguistic and genetic differences among Yanomama indians. *Science.* 1974;184(137):637-44.
41. Early J. *The Population Dynamics of the Mucajai Yanomama*: Elsevier Science; 1990.
42. Peters JF. The Shirishana of the Yanomami: a demographic study. *Soc Biol.* 1980;27(4):272-85.
43. Gibbons A. Yanomami people threatened. *Science.* 1991;252(5013):1616.
44. Rothhammer F, Neel JV, da Rocha F, Sundling GY. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. 8. Dermatoglyphic differences among villages. *Am J Hum Genet.* 1973;25(2):152-66.
45. Sokal RR, Smouse PE, Neel JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. XV. Patterns inferred by autocorrelation analysis. *Genetics.* 1986;114(1):259-87.
46. Ward RH, Gershowitz H, Layrisse M, Neel JV. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians XI. Gene frequencies for 10 blood groups and the ABH-Le secretor traits in the Yanomama and their neighbors; the uniqueness of the tribe. *Am J Hum Genet.* 1975;27(1):1-30.
47. Roewer L, Nagy M, Schmidt P, Epplen JT, Herzog-Schroder G. Microsatellite and HLA class II oligonucleotide typing in a population of Yanomami Indians. *Exs.* 1993;67:221-30.
48. Crews DE, Kamboh MI, Mancilha-Carvalho JJ, Kottke B. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Hum Biol.* 1993;65(2):211-24.
49. Easton RD, Merriwether DA, Crews DE, Ferrell RE. mtDNA variation in the Yanomami: evidence for additional New World founding lineages. *Am J Hum Genet.* 1996;59(1):213-25.
50. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo de útero. Rio de Janeiro.: INCA.; 2011.
51. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais. . 3a. ed. ed. Rio de Janeiro.2012.
52. Smith BC, McAndrew T, Chen Z, Harari A, Barris DM, Viswanathan S, et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One.* 2012;7(7):e40425.
53. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2011;27(6):863-4.
54. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2011;27(21):2957-63.
55. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2011;27(16):2194-200.
56. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2010;26(19):2460-1.
57. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods.* 2013;10(10):996-8.
58. Cruz ICFd. A sexualidade, a saúde reprodutiva e a violência contra a mulher negra: aspectos de interesse para assistência de enfermagem. *Revista da Escola de Enfermagem da USP.* 2004;38:448-57.
59. Riscado JLdS, Oliveira MABd, Brito ÂMBBd. Vivenciando o racismo e a violência: um estudo sobre as vulnerabilidades da mulher negra e a busca de prevenção do HIV/aids em comunidades remanescentes de Quilombos, em Alagoas. *Saúde e Sociedade.* 2010;19:96-108.

60. Lippman SA, Sucupira MC, Jones HE, Luppi CG, Palefsky J, van de Wijert JH, et al. Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women. *International journal of STD & AIDS*. 2010;21(2):105-9.
61. Villa LL, Franco EL. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(5):332-40.
62. Eluf-Neto J, Booth M, Munoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *British journal of cancer*. 1994;69(1):114-9.
63. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(6):617.e1-7.
64. Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. *J Infect Dis*. 1995;172(3):756-63.
65. Rocha DAP, Barbosa Filho RAA, de Queiroz FA, dos Santos CMB. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2013;2013.
66. Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genetics and molecular research : GMR*. 2011;10(1):186-96.
67. Bonanni P, Boccalini S, Bechini A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 1:A46-53.
68. Serrano B, Alemany L, Ruiz PA, Tous S, Lima MA, Bruni L, et al. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). *Cancer epidemiology*. 2014;38(6):748-56.
69. Coimbra Jr.E.A.C SVR, Escobar.L.A. *Epidemiologia e saúde dos povos indígenas no Brasil*. Rio de Janeiro 2005.
70. Early JD, Peters JF. *The Xilixana Yanomami of the Amazon: History, Social Structure, and Population Dynamics*: University Press of Florida; 2000.
71. Clarke MA, Gage JC, Ajenifuja KO, Wentzensen NA, Adepiti AC, Wacholder S, et al. A population-based cross-sectional study of age-specific risk factors for high risk human papillomavirus prevalence in rural Nigeria. *Infectious Agents and Cancer*. 2011;6(12):1-8.

## ANEXO 1:

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A voluntária \_\_\_\_\_ foi convidada para participar do projeto de pesquisa chamado "**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM INDÍGENAS DO ESTADO DE RORAIMA: COMPARAÇÃO ENTRE ETNIAS INDÍGENAS CULTURALMENTE ISOLADAS E INTEGRADAS À SOCIEDADE OCIDENTAL**" pelo médico Alex Jardim da Fonseca, pesquisador da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (Manaus - Amazonas).

O objetivo do estudo é pesquisar se o colo de útero das mulheres indígenas está infectado pelo vírus (papilomavírus humano) HPV, que é o causador do câncer de colo de útero. Esse é o câncer mais comum em mulheres indígenas e pode ser evitado se o vírus for descoberto em tempo. Por isso a pesquisa é importante pois não se conhece ao certo o quanto a infecção por esse vírus é comum em mulheres das comunidades indígenas de Roraima.

Caso aceite participar do estudo, a voluntária responderá a perguntas do médico sobre sua vida pessoal. Em seguida será realizado exame ginecológico pelo funcionário da SESAI, em conjunto com o médico responsável pela pesquisa, em uma unidade de atenção básica (Polo Base) da sua comunidade indígena. O exame consiste na introdução do espéculo vaginal e inspeção do colo de útero. Posteriormente o funcionário da SESAI coleta um pouco do muco (secreção) do colo de útero (do fundo da vagina) com um bastão plástico macio e esfrega o material coletado em pedaço de vidro para a realização das lâminas de Papanicolaou (para prevenção do colo de útero) e uma parte desse material será entregue ao Dr. Alex Jardim, e guardadas dentro de tubos plásticos para realização de testes mais elaborados. As amostras serão levadas para Manaus e para uma Universidade dos Estados Unidos (chamada Albert Einstein College of Medicine) e armazenadas, onde será realizado o teste mais elaborado (chamado PCR, reação em cadeia da polimerase) para detectar o vírus HPV e outros exames para detectar o tipo de HPV. O médico responsável pela pesquisa garante que após o uso das amostras para a detecção do vírus, as amostras dos vírus HPV serão descartadas. A realização do exame de colo de útero pode causar desconforto, dor local e sangramento pela vagina. Caso estas complicações ocorram, o médico Dr. Alex se responsabiliza pelo tratamento.

Os benefícios desta pesquisa são: 1) a voluntária será beneficiada por estar realizando o melhor exame para a pesquisa do vírus HPV e para a prevenção o câncer de colo de útero; 2) de forma coletiva, a pesquisa poderá caracterizar a infecção pelo HPV na comunidade indígena, o que pode ajudar o DSEI (Distrito Sanitário Especial Indígena) na melhor prevenção do câncer de colo de útero.

O Dr. ALEX JARDIM garante que os dados da entrevista e o resultado do teste de HPV serão guardados em sigilo e não haverá exposição de seu nome de forma alguma. É garantido à voluntária o direito de não responder perguntas sobre sua vida íntima. Os resultados do exame serão entregues à voluntária. A voluntária está ciente e autoriza a realização dos procedimentos acima

citados e a utilização dos dados para fins didáticos e divulgação científica, contanto que seja mantido o sigilo em relação à identidade da voluntária.

Foi esclarecida também que a decisão de não participar do estudo não prejudica a sua saúde. Poderá pedir para sair do estudo a qualquer momento. Ou poderá pedir novos esclarecimentos se achar necessário.

Caso a voluntária tenha algum gasto com seu transporte até o local da coleta, o Dr. Alex Jardim irá repor o valor gasto pela voluntária. Caso haja algum dano (problema) relacionado à participação na pesquisa, estes serão indenizados (pagos) pelo pesquisador Dr. Alex Jardim e pela Instituição. Recebe uma cópia deste termo que assina. Caso a voluntária necessite de esclarecimento sobre questões éticas relacionadas a este projeto, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, na Av. Pedro Teixeira n. 25, Bairro D. Pedro I, Manaus, Amazonas. Telefone de contato: (92) 2127-3572.

Caso o teste de HPV seja positivo, o pesquisador garante que será providenciado agendamento de consulta no serviço ginecologia e/ou oncologia do Hospital de Geral de Roraima para que o problema seja resolvido da melhor maneira possível para a voluntária. Caso o teste de Papanicolaou (o exame preventivo do câncer de colo de útero) seja positivo, independente do exame de PCR, o pesquisador também garante as providências de agendamento de consulta no referido hospital para as condutas de tratamento.

---

NOME DA VOLUNTÁRIA

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Testemunha:

Pesquisador: Dr. Alex Jardim da Fonseca tel. : (95) 2121-0612 allex.jardim@bol.com.br  
Av. Brigadeiro Eduardo Gomes, s.n. Bairro Aeroporto. Boa Vista – Roraima.  
Unidade de Alta Complexidade em Oncologia de Roraima.

**ANEXO 2**

Instrumento de pesquisa: formulário para entrevista

Etiqueta de  
ID

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Comunidade: \_\_\_\_\_

Pólo-Base: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ (anos)

Etnia: (1) Yanomami (2) Yekuana (3) Macuxi (4) Wapichana (5) Outra \_\_\_\_\_

Situação Conjugal: (1) solteira (2) união estável (3) viúva (9) Não sabe

Há quanto tempo é casada: \_\_\_\_\_ anos OU \_\_\_\_\_ meses

Número de filhos: \_\_\_\_\_ (vivos)

Número de gravidezes: \_\_\_\_\_ (n)

Idade do filho mais velho: \_\_\_\_\_ Idade do filho mais novo: \_\_\_\_\_

Está grávida: (1) sim (2) não (9) não sabe

Quantas vezes já fez o preventivo na vida: \_\_\_\_\_ vezes (99) não sabe

Fez o preventivo nos últimos 3 anos: (1) sim (2) não (9) não sabe

Já teve diagnóstico de infecção por HPV ou NIC: (1) sim (2) não (9) não sabe

Possui alguma queixa ginecológica: (1) dor (2) corrimento (3) sangramento

(4) lesão genital (5) outro \_\_\_\_\_ (6) não (9) não sabe.

Observação: \_\_\_\_\_