UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE MEDICINA

ROBERTA KLERING

PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

PASSO FUNDO - RS
2020

ROBERTA KLERING

PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

Orientadora: Profª. Msª. Daniela Augustin Silveira

Coorientadora: Profª. Drª. Jossimara Polettini

PASSO FUNDO - RS

2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Klering, Roberta
Pesquisa de Papiloma Vírus Humano (HPV) em tecidos placentários / Roberta Klering. -- 2020.
69 f.

Orientadora: Profª. Msª. Daniela Augustin Silveira
Co-orientadora: Profª. Drª. Jossimara Polettini
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2020.

1. Gestação. 2. Papiloma Vírus Humano. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Prematuridade. I. , Daniela Augustin Silveira, orient. II. Polettini, Jossimara, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ROBERTA KLERING

PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi defendido e aprovado pela banca em:

_____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Msª. Daniela Augustin Silveira - UFFS

Orientadora

_____

Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani - UFFS

_____

Profª. Thieli Maldaner Budke - UFFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente às professoras orientadora e coorientadora, Profª. Msª. Daniela Augustin Silveira e Profª. Drª. Jossimara Polettini, por toda dedicação e empenho despendidos para possibilitar a realização desse estudo.

À Universidade Federal da Fronteira Sul e aos professores da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, agradeço pelas oportunidades de aprendizagem técnica e pessoal.

RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi elaborado de acordo com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e com o Regulamento de TCC do curso de graduação em Medicina da UFFS campus Passo Fundo. É composto pelo Projeto de Pesquisa (dividido em: tema, problema, hipóteses, objetivos, justificativa, referencial teórico, metodologia, recursos, cronograma, referências, apêndices), Relatório de Pesquisa, Artigo Científico e Considerações Finais. Foi realizado durante o período de agosto de 2019 à outubro de 2020, pela acadêmica Roberta Klering, sob orientação da Professora Mestra Daniela Augustin Silveira e coorientação da Professora Doutora Jossimara Polettini. O Trabalho teve início no quinto semestre do curso, no componente curricular de Pesquisa em Saúde. A coleta de dados foi realizada no sexto semestre, na disciplina de TCC I e finalizada no sétimo semestre, no componente curricular de TCC II. O presente trabalho objetivou identificar a prevalência de DNA-HPV em tecidos placentários, bem como sua associação com características sociodemográficas, gestacionais, neonatais e placentárias em gestantes atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em um hospital terciário da região norte do estado do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Infecções por Papilomavírus. Placenta. Gestação.

ABSTRACT

This Final Term Paper was elaborated in accordance with the Academic Works Manual and with the Course Completion Work (TCC) regulations, from Universidade Federal da Fronteira (UFFS), Passo Fundo, RS, undergraduate medical course. This volume is composed by the Research Project (divided into: theme, problem, hypotheses, objectives, justification, theoretical framework, methodology, resources, schedule, references, appendices), Research Report, Scientific Paper and final considerations. The work was performed by the student Roberta Klering, under the guidance of Ms. Daniela Augustin Silveira and co-supervision of Dr. Jossimara Polettini, and was developed from August 2019 to June 2020. The work started in the fifth semester of the course, in the curricular component of Health Research. Data collection was carried out in the sixth semester, in the discipline of TCC I and ended in the last semester, in the curricular component of TCC II. The present study aimed to identify a prevalence of DNA-HPV in placental tissues, as well as its association with sociodemographic, gestational, neonatal and placental characteristics in pregnant women attended by the Unified Health System (SUS) in a tertiary hospital in the northern region of the state in Rio Grande do Sul.

Keywords: Papillomavirus Infections. Placenta. Pregnancy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9
2 DESENVOLVIMENTO 11
2.1 PROJETO DE PESQUISA 11
2.1.1 Resumo 11
2.1.2 Tema 11
2.1.3 Problema 11
2.1.4 Hipóteses 12
2.1.5 Objetivos 12
2.1.5.1 Objetivo específico 12
2.1.6 Justificativa 12
2.1.7 Referencial teórico 13
2.1.8 Metodologia 19
2.1.8.1 Tipo de estudo 19
2.1.8.2 Local e período de realização 19
2.1.8.3 População e amostragem 20
2.1.8.4 Variáveis e coleta de dados 20
2.1.8.5 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados 23
2.1.8.6 Aspectos éticos 24
2.1.9 Recursos 25
2.1.10 Cronograma 26
2.1.11 Referências 26
2.1.12 Apêndices 29
APÊNDICE A – FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E RESULTADO DAS ANÁLISES PCR 26
APÊNDICE B – SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 27
APÊNDICE C – TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO 29
2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA 33
3. ARTIGO CIENTÍFICO 35
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 55
5. APÊNDICES 56

APÊNDICE A – NOVA FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, GESTACIONAIS E RESULTADO DAS ANÁLISES PCR.....55
6. ANEXOS 60
ANEXO A – ACEITE DE ORIENTAÇÃO E COORIENTAÇÃO.....59
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....60
ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....61
ANEXO D – NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO.....63

1 INTRODUÇÃO

A placenta e os anexos embrionários protegem o embrião em desenvolvimento e são responsáveis pela nutrição, respiração, excreção e produção de hormônios durante o desenvolvimento (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). A função ótima da placenta pode ser prejudicada por inúmeros mecanismos. Dessa forma, o conhecimento da incidência, etiologia, patogênese, diagnóstico e manejo de infecções na gestação, parto e período neonatal se torna relevante, uma vez que podem acarretar em prejuízos para o feto e recém-nascido, tanto de maneira aguda quanto persistente, mesmo se não expressos no momento do nascimento (MUSSI-PINHATA; YAMAMOTO, 1999).

Uma das infecções que podem acometer a placenta é a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), considerada atualmente a infecção sexualmente transmissível mais comum (JACH et al., 2014). Segundo o Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil), a prevalência estimada a nível nacional, no ano de 2017, foi de 54,6%. Segundo o Ministério da Saúde, existem atualmente mais de 150 tipos diferentes de HPV, dos quais 40 podem infectar o trato genital. Destes, 12 são de alto risco e podem provocar câncer. Os HPV 16, 18, 21, 31, 33 e 34 podem ser observados nos carcinomas vulvares. Além disso, estudos recentes tem encontrado acometimento laríngeo, que ocorre pelos tipos 6, 11, 30, 32 (LETO et al., 2011).

Na gestação, a via de transmissão clássica é a contaminação através da passagem pelo canal de parto, no entanto, outras vias podem ocorrer. Para o neonato, quando há contato com o HPV, a complicação mais temida é a papilomatose respiratória recorrente juvenil (CAMPOS et al., 2016).

Diversos estudos tem pesquisado as vias de transmissão transplacentária do HPV, tendo encontrado resultados positivos em pesquisas de diferentes amostras, como sangue do cordão umbilical de recém-nascidos, placenta do lado materno e placenta do lado fetal. A contaminação do colostro também é estudada. Esses estudos sugerem a transmissão transplacentária do vírus e buscam elucidar os meios através dos quais a contaminação ocorre. Os resultados encontrados variam muito. Em 2008, Sarkola et al., encontraram DNA-HPV em 4,2% de amostras do sangue de placentas. Também em 2008, Rombaldi et al., encontraram resultado positivo para DNA-HPV em

23,3% de amostras de placenta de mulheres grávidas positivas para DNA-HPV no momento do parto. Em outro estudo, Teixeira et al., detectaram DNA-HPV em 4% de amostras do lado materno das placentas. Dessa maneira, considerando as diferenças metodológicas entre cada estudo, será possível comparar os resultados encontrados no presente estudo com outros da literatura (TSENG et al., 1992; SARKOLA et al., 2008; ROMBALDI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2015).

Em relação à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é uma técnica que possui alta especificidade na busca de agentes infecciosos, uma vez que, para identificá-los nas amostras biológicas, utiliza-se uma sequência de material genético (DNA ou RNA) específico e correspondente do microrganismo estudado (TSAKOGIANNIS et al., 2017). Adicionalmente, alguns testes que utilizam a técnica de PCR em tempo real identificam o DNA-HPV e seus genótipos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 Resumo

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus DNA que causa infecções na pele e mucosas, sendo a infecção sexualmente transmissível mais comum. São classificados em baixo e alto risco, de acordo com seu potencial oncogênico. Investigações recentes buscam elucidar a relação deste vírus com desfechos gestacionais, como prematuridade e infecção vertical, uma vez que várias vias podem estar relacionadas à infecção pelo HPV em neonatos. O objetivo do presente projeto é determinar positividade do DNA-HPV, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em tecidos placentários de parturientes de alto risco, que por esse motivo tiveram suas placentas encaminhados para análise no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), Passo Fundo/RS. Além disso, será avaliada a presença dos subtipos virais 6/11 (baixo risco oncogênico) e subtipos 16 ou 18 (alto risco oncogênico). Esses resultados serão relacionados com o perfil da parturiente e as características do parto e do recém-nascido. Serão analisados dados do ano de 2017, a partir dos registros do HSVP Hospital São Vicente de Paulo – Passo Fundo/RS. Espera-se encontrar positividade de DNA-HPV em cerca de 5-20% das amostras. Além disso, espera-se que genótipos de alto risco oncogênico apresentem maior prevalência nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano. Reação em Cadeia da Polimerase. Gestação.

2.1.2 Tema

Detecção de DNA-HPV em tecidos placentários.

2.1.3 Problema

Qual a positividade de HPV e subtipos virais no tecido placentário da população estudada?

Qual a relação da positividade de DNA-HPV com os desfechos gestacionais e neonatais?

Qual o perfil das pacientes com resultado positivo para DNA-HPV?

2.1.4 Hipóteses

Estima-se que a prevalência de HPV no tecido placentário resulte em torno de 5-20%, sendo os de alto risco oncogênico os mais frequentes.

A presença de DNA-HPV está relacionada com adversidades gestacionais como prematuridade, rotura prematura de membranas, baixo peso ao nascer e baixo APGAR nos recém-nascidos.

Espera-se caracterizar o perfil das pacientes com resultado positivo para DNA-HPV quanto à variáveis socioeconômicas e hábitos de vida.

2.1.5 Objetivos

2.1.5.1 Objetivo geral

Determinar a positividade de DNA-HPV em tecidos placentários.

2.1.5.1 Objetivo específico

Identificar os subtipos virais mais prevalentes, se de baixo ou alto risco oncogênico.

Determinar os desfechos gestacionais e neonatais mais frequentes com a positividade de DNA-HPV nos tecidos placentários.

Caracterizar o perfil das pacientes com resultado positivo para DNA-HPV quanto à variáveis socioeconômicas e hábitos de vida.

2.1.6 Justificativa

Adversidades gestacionais relacionadas à presença de HPV nos tecidos placentários são documentadas na literatura, incluindo abortos no primeiro trimestre e prematuridade, associada especialmente à rotura prematura das membranas fetais, quadros que aumentam a morbidade neonatal. Além disso, a transmissão perinatal pode ocorrer no canal do parto, na cesariana por infecção ascendente, no momento da concepção (através do oócito infectado ou no DNA do espermatozoide HPV-positivo), ou via transplacentária, além da amamentação. Nesse contexto, a complicação mais temida é a papilomatose respiratória recorrente juvenil.

A via de infecção mais frequente ao ambiente materno-fetal é a via ascendente do canal cervical, onde o vírus possui tropismo epitelial. No entanto, a detecção do HPV cervical por biologia molecular não é realizada na assistência pré-natal do SUS, o que pode favorecer o subdiagnóstico, com consequente não tratamento, e, portanto, aumentar as taxas de infecção placentária. Estudos demonstram a infectividade viral nas células do trofoblasto e sinciciotrofoblasto. Dessa forma, o diagnóstico da presença do vírus HPV e os genótipos virais específicos nos tecidos placentários são de extrema importância para o entendimento do perfil da população estudada, e consequente conscientização da necessidade de aplicação de rastreamento precoce da infecção viral cervical e vacinação das mulheres em idade reprodutiva.

2.1.7 Referencial teórico

Desenvolvimento e histologia da placenta

A placenta é um órgão temporário que serve como local de trocas fisiológicas entre a mãe e o embrião ou feto. A parte fetal é denominada córion, enquanto que a parte materna é denominada decídua basal. Dessa forma, a placenta é composta de células derivadas de dois indivíduos geneticamente diferentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Durante as primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, conforme ocorre a implantação do blastocisto, surge um pequeno espaço no embrioblasto, que corresponde ao primórdio da cavidade amniótica. Após, as células formadoras de âmnio (amnioblastos) se separam do epiblasto e revestem o âmnio, que envolve a cavidade amniótica. O córion e o âmnion embrionários darão origem à parte do disco placentário e a composição das membranas. O desenvolvimento do trofoblasto

estimula mudanças no endométrio adjacente, alterando-o para dar início à formação da porção materna da placenta (GARTNER; HIATT, 2007).

A placenta a termo, ou seja, depois de 37 semanas de gestação, tem cerca de 3 cm de espessura, diâmetro de 20 cm e pesa cerca de 500 g. O lado fetal da placenta é associado com o âmnio, enquanto o lado materno é parcialmente dividido em 10 ou mais lobos por septos da decídua, derivados da decídua basal e que se estendem até a placa coriônica (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Ao longo da gravidez, portanto, a placenta promove a adaptação fisiológica da mãe e aceitação imunológica do embrião/feto, nutrição e apoio ao embrião em desenvolvimento. Dessa forma, falhas na formação placentária podem comprometer o embrião em crescimento e desenvolvimento, sendo que a placentação anormal é uma característica de diversas complicações da gravidez, como aborto espontâneo, natimorto, trabalho de parto pré-termo, restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) e pré-eclâmpsia. Nesse contexto, infecções podem influenciar o desenvolvimento placentário, como a presença do papilomavirus Humano (HPV), que, apesar de ter tropismo preferencial ao epitélio escamoso, como na ectocérvice, pode colonizar células trofoblásticas e influenciar na sua adesividade e proliferação (BOULENOUAR et al., 2010).

Exame anatomopatológico da placenta

A gestação é um fenômeno fisiológico, que envolve mudanças dinâmicas do ponto de vista físico, social e emocional. No entanto, é considerada uma situação limítrofe que pode implicar riscos para a mãe e para o feto. Nesse contexto, há uma parcela de gestantes que, por características particulares, apresentam maior probabilidade de evolução desfavorável, são as chamadas “gestantes de alto risco” (BRASIL, 2010).

Os marcadores e fatores de risco gestacionais presentes anteriormente à gestação se dividem em: 1) Características individuais e condições sociodemográficas desfavoráveis; 2) História reprodutiva anterior; e 3) Condições clínicas preexistentes. Entre os fatores relacionados à história reprodutiva anterior, estão abortamento habitual; morte perinatal explicada e inexplicada; história de recém-nascido com crescimento restrito ou malformado; parto pré-termo anterior; esterilidade/infertilidade; síndrome hemorrágica ou hipertensiva; diabetes gestacional; entre outros. Em relação aos fatores relacionados à condições clínicas pré-existentes, estão hipertensão

arterial; cardiopatias; endocrinopatias; hemopatias; epilepsia; doenças infecciosas; doenças autoimunes; neoplasias; entre outros (BRASIL, 2010).

Tendo em vista a caracterização de gestação de alto risco, em algumas dessas condições, o Ministério da Saúde recomenda que seja realizado o exame histopatológico da placenta. No entanto, muitas vezes, cabe aos profissionais dos setores de Obstetrícia a decisão de solicitar a realização do exame, após realização do parto. Essa situação ocorre no Hospital São Vicente de Paulo, local em que será realizado o estudo.

Infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV)

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA que apresenta tropismo por células epiteliais, causando infecções na pele e nas mucosas. Além disso, é a infecção sexualmente transmissível mais comum (JACH et al., 2014). Essa família viral é responsável pelo desenvolvimento de verrugas em diferentes grupos de mamíferos, incluindo o homem. São pequenos vírus (50-55nm), não envelopados, com simetria icosaédrica, pertencentes à família *Papoviridae* – gênero *Papillomavirus*. O genoma apresenta aproximadamente 8.000 pares de base (8Kb) de DNA dupla fita e circular (LETO et al., 2011).

Segundo dados de 2017 do Ministério da Saúde, existem mais de 150 tipos diferentes de HPV, dos quais 40 podem infectar o trato genital. Destes, 12 são de alto risco e podem provocar câncer. No entanto, a detecção do vírus HPV cervical não é realizada na assistência pré-natal do SUS, e sabe-se que a detecção viral precoce pode promover uma redução de cerca de 32,6% na taxa de câncer do colo do útero (CASTANON; LANDY; SASIENI, 2013). A ausência de tal rastreamento pode favorecer o subdiagnóstico, com consequente não tratamento, e, portanto, aumentar as taxas de infecção placentária no caso das mulheres gestantes.

Os vírus HPV são agrupados de acordo com o seu tropismo tecidual por determinados tipos de epitélio. Dessa forma, destacam-se três grupos de HPV: cutâneos, mucosos e associados a Epidermodisplasia Verruciforme. Os HPVs mucosos são subdivididos em baixo e alto risco, dependendo de seu potencial oncogênico. O HPV 16 é o tipo mais observado nos carcinomas vulvares e cervicais, mas os HPVs 18, 21, 31, 33 e 34 também podem ser encontrados nessas lesões.

Além desses, diversos outros tipos podem estar associados a lesões mucosas e cutâneas de baixo risco (LETO et al., 2011).

Outro campo de estudo relacionado ao HPV é a relação deste com gestação e infecção vertical, uma vez que, em contraste com evidências epidemiológicas consistentes do papel da transmissão sexual do vírus em adultos, várias vias podem estar relacionadas à infecção pelo HPV em neonatos. Dessa forma, diversos estudos vêm sendo realizados de maneira a esclarecer essa relação, visto que as descrições de doenças relacionadas ao HPV na mucosa orofaríngea e anogenital de bebês e crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus estão aumentando (PARK et al., 2012). Uma revisão de literatura realizada em 2015, avaliou as vias de transmissão do HPV em gestantes e as possíveis complicações dessa infecção para o RN. Quanto às vias de transmissão, os autores concluem que, embora o mecanismo clássico da contaminação seja a passagem pelo canal de parto, outras vias de transmissão podem ocorrer. Entre as vias de transmissão não sexual do HPV estão o contato com pele e mucosas, autoinoculação e fômites. No período perinatal, os mecanismos são através do canal do parto, na cesariana por infecção ascendente, transmissão na concepção ou transplacentária, além da amamentação. Dessa forma, a infecção pelo HPV não constitui indicação exclusiva para parto cesariano. As gestantes devem ser orientadas sobre as diferentes vias de transmissão vertical e possíveis complicações decorrentes dessa infecção (CAMPOS et al., 2016).

As infecções por HPV são frequentemente assintomáticas e, na maioria das vezes, as pacientes estão infectadas sem estarem conscientes da ocorrência de tal situação. A associação do HPV com infertilidade também vem sendo pesquisada. Aparentemente, o HPV pode ser um fator de risco de redução da fertilidade ou infertilidade, atuando, entre outros fatores, na alteração da qualidade do sêmen e em abortos espontâneos, ou ruptura prematura das membranas fetais. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer essa associação (SOUHO; BENLEMLIH; BENNANI, 2015).

Em relação às complicações da infecção pelo HPV para o recém-nascido, há a discussão da existência de infecção verdadeira ou apenas contaminação do neonato. Estudos apontam que, quando há contato com o HPV, a complicação mais temida para o neonato é a papilomatose respiratória recorrente juvenil. Além dessa, tem sido evidenciadas, em menor gravidade, lesões verrucosas no RN (CAMPOS et al., 2016).

Epidemiologia e infectividade do HPV

O Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil), um estudo multicêntrico, executado pelo Hospital Moinhos de Vento (HMV), Porto Alegre – RS, e demandado pelo Ministério da Saúde, teve seus resultados preliminares publicados em 2017. Esse estudo determinou a prevalência nacional da infecção pelo HPV. A população do estudo foi composta por 5.812 mulheres e 1.774 homens. A média de idade foi de 20,6 anos. A nível nacional, a prevalência estimada de HPV foi de 54,6%, sendo que em 38,4% dos participantes estava presente o HPV de alto risco para o desenvolvimento de câncer.

No contexto gestacional, Tseng et al. (1992), realizaram um estudo de investigação da possibilidade de infecção intrauterina por DNA-HPV em fetos, através de transmissão transplacentária do vírus antes do parto. Os autores utilizaram amostras de células cervicovaginais e células mononucleares de sangue periférico de 52 gestantes e sangue do cordão umbilical de seus recém-nascidos, para detectar a presença de DNA-HPV tipo 16 e 18 através do método de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR). Encontraram DNA-HPV tipo 16 no lavado cervical de 11,5% das gestantes e em 17,3% de células mononucleares do sangue periférico. Entre as mães positivas para o DNA-HPV tipo 16 no sangue periférico, 13,5% dos recém-nascidos tiveram o mesmo DNA-HPV detectado em células do cordão umbilical. Dessa forma, os resultados do estudo pareceram sugerir a possibilidade da transmissão transplacentária do vírus.

Adicionalmente, em um estudo Finlandês, Sarkola et al. (2008), analisaram a presença do DNA-HPV no sangue do cordão umbilical e na placenta, incluindo a pesquisa de sua localização celular, em 315 gestantes e seus recém-nascidos, através do método de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR). O DNA do HPV foi detectado em 4,2% das amostras da placenta e 3,5% das amostras do cordão umbilical. Os HPV 6, 16, 39 e 83 foram os subtipos encontrados. Na placenta, foram encontrados os subtipos 6 e 16, localizados em sinciciotrofoblastos. Além disso, os autores concluíram que a positividade do DNA-HPV na placenta e no sangue do cordão umbilical aumentou o risco de HPV oral no neonato e que a modalidade do parto não foi definidora para o status HPV do neonato. Sendo que, se a placenta for HPV-positiva, o risco de o recém-nascido ser portador de HPV no parto aumenta em 8,6 vezes.

Em um estudo brasileiro, realizado no Rio Grande do Sul, Rombaldi et al. (2008), além de estudar a transmissão transplacentária do HPV, buscaram os fatores epidemiológicos envolvidos na infecção viral materna. O estudo incluiu apenas mulheres grávidas positivas para DNA-HPV, em diferentes localidades (cervical, orofaríngea, cavidade oral, região inguinal ou axilar), no momento do parto. O DNA-HPV foi identificado utilizando o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e houve consideração de transmissão transplacentária quando ocorreu concordância específica do tipo de HPV encontrada entre a mãe, sua placenta e o recém-nascido ou entre a mãe e o sangue do cordão umbilical. Encontraram infecções placentárias em 23,3% das gestantes e transmissão transplacentária em 12,2% dos casos. Esses autores também observaram correlação positiva e significativa entre a transmissão transplacentária da infecção por HPV e as variáveis maternas de histórico de imunodepressão.

Em outro estudo realizado no Rio Grande do Sul, Teixeira et al. (2015), pesquisaram a frequência do Papilomavírus Humano na placenta e no colostro de parturientes e no sangue do cordão umbilical de seus recém nascidos, através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O HPV foi detectado em 4% de amostras do lado materno das placentas, 3,3% de amostras do lado fetal, 2,2% no sangue do cordão e 0,8% no colostro. Além disso, encontraram uma taxa de transmissão vertical de 50%. Dessa maneira, obtiveram resultados que sugerem que o HPV pode infectar a placenta, o colostro e o sangue do cordão umbilical. Os genótipos encontrados foram o HPV-6 (60%) de baixo risco, e HPV-16 e HPV-18 (20% cada), de alto risco.

Dessa forma, as evidências da infecção placentária pelo vírus HPV e sua transmissão ao neonato vem sendo consolidadas por diversos estudos em diferentes países. Portanto, o diagnóstico da presença do vírus HPV e os genótipos virais específicos nos tecidos placentários são de extrema importância para o entendimento do grau de risco de contaminação do neonato, o perfil da população estudada e consequente conscientização da necessidade de aplicação de rastreamento precoce da infecção viral e vacinação das mulheres em idade reprodutiva.

Técnica de detecção do HPV por PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular

muito utilizada atualmente para investigar a presença de microrganismos em uma determinada amostra biológica. Essa técnica possui alta especificidade na busca de agentes infecciosos, uma vez que, para identificá-los, utiliza-se uma sequência de material genético (DNA ou RNA) específico e correspondente do microrganismo estudado. Nesse contexto, a PCR vem sendo empregada para a detecção e genotipagem do HPV em diversas amostras biológicas, inclusiva na pesquisa de rotina disponíveis em alguns serviços de saúde, o que demonstra sua efetividade e complementação diagnóstica de lesões celulares sugestivas da infecção viral.

Além disso, existem outras técnicas de hibridização associadas ao PCR para identificação do HPV, tais como hibridização in situ por fluorescência (FISH), Amplificação de Sonda Multiplex Dependente de Ligadura (MLPA) e Southern Blotting (TSAKOGIANNIS et al., 2017). Alguns testes comerciais de detecção de HPV utilizados atualmente empregam a técnica de PCR em tempo real. A técnica consiste na utilização de *primers* e sondas marcados com substâncias fluorescentes que são captadas automaticamente ao passo que a amplificação do DNA ocorre durante a técnica de PCR. No entanto, a PCR convencional ainda é uma técnica eficaz e acessível devido ao menor custo, e, portanto, importante ferramenta para o diagnóstico molecular.

Embora a infecção por HPV possa ficar latente nas células por anos, a detecção do DNA-HPV em amostras biológicas, favorecida pelas técnicas de biologia molecular, é uma importante ferramenta no rastreamento de lesões precoces, especialmente nos epitélios e mucosas. Nas gestantes, o conhecimento da infecção nos tecidos placentários pode contribuir ao entendimento da fisiopatologia viral e disfunção placentária, que pode provocar desfechos gestacionais e neonatais desfavoráveis.

2.1.8 Metodologia

2.1.8.1 Tipo de estudo

Estudo quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico.

2.1.8.2 Local e período de realização

O estudo será realizado durante o período de outubro de 2019 à julho de 2020 no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul, em Passo Fundo – RS.

2.1.8.3 População e amostragem

A população do estudo será constituída por pacientes parturientes do Hospital São Vicente de Paulo, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), cuja placenta foi encaminhada para análise, mediante a solicitação do exame pelos profissionais dos setores de Obstetrícia. A amostra, não probabilística, selecionada por conveniência, será constituída de pacientes cujas placentas foram encaminhadas para análise anatomopatológica no ano de 2017 no laboratório de Patologia do referido hospital. De acordo com pesquisa no livro de registros de exames anatomopatológicos de placentas realizados no laboratório, estimou-se que foi realizada a análise em 370 amostras no referido período.

Critério de inclusão: todas as parturientes cuja placenta foi encaminhada para o setor de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, pelo convênio do Sistema Único de Saúde (SUS), para análise anatomopatológica, no ano de 2017.

Quanto aos critérios de exclusão, serão considerados prontuários com o dado de desfecho gestacional (item 1 do Apêndice A) incompleto e inadequabilidade da amostra para realização das técnicas.

2.1.8.4 Variáveis e coleta de dados

A definição da logística do estudo tem o objetivo de programar as etapas do trabalho e evitar atrasos na coleta. Após aprovação da Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do HSVP e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, iniciará a análise dos prontuários em outubro de 2019. A acadêmica da equipe de pesquisa se deslocará na sala de estudo do Laboratório de Patologia do HSVP, nas terças-feiras, quinzenalmente, das 8h30min às 17h. Nesse período, estará disponível um computador para uso, com senha própria de acesso ao sistema, fornecida pelo serviço.

De maneira a discutir os achados do trabalho e definir e organizar o andamento do mesmo, serão realizadas, quinzenalmente, reuniões junto à orientadora e coorientadora. A data e o horário serão definidos previamente, com duração de aproximadamente 1h30min.

Para a obtenção dos dados e amostras que serão utilizados na pesquisa, será realizada uma busca no livro de registros de análises anatomopatológicas de placentas, de pacientes que realizaram seu parto na maternidade do Hospital São Vicente de Paulo, R. Teixeira Soares, 808 – Centro de Passo Fundo – RS, no ano de 2017, pelo convênio do Sistema Único de Saúde (SUS), e que tiveram suas placentas encaminhadas para análise anatomopatológica. Esses registros estão contidos do Laboratório de Patologia do mesmo hospital.

Nos livros de registros estão contidos os nomes e os números de prontuários de todas as pacientes. A partir desse número, será realizada a busca dos dados da situação demográfica das pacientes no programa TASY (Philips), utilizado pelo HSVP e Laboratório de Patologia. A equipe de pesquisa realizará essa busca ou em sala privada da Biblioteca do hospital ou no Laboratório de Patologia, com o intuito de preservar a privacidade das pacientes e não interferir na rotina diária do Laboratório.

Os dados obtidos através dos prontuários eletrônicos serão transcritos para a ficha de coleta de dados (Apêndice A). As variáveis da parturiente analisadas no estudo serão desfecho gestacional, idade, etnia, estado civil, grau de escolaridade, idade gestacional, paridade, tipo de parto e comorbidades. As variáveis analisadas do recém-nascido serão peso ao nascimento e APGAR no 1º e 5º minuto. As variáveis obtidas através da análise da placenta através da Reação em Cadeia da Polimerase serão positividade para DNA-HPV e definição de subtipos 6/11, 16 ou 18. A diferenciação entre as variáveis quantitativas dependentes e independentes está detalhada no item 2.1.8.5 (processamento, controle de qualidade e análise dos dados).

No mesmo Laboratório também estão armazenados os blocos de parafina das amostras das pacientes. Os materiais correspondentes às pacientes selecionadas serão transportados ao Laboratório de Bioquímica da UFFS, no qual ocorrerão as análises de PCR, pela acadêmica da pesquisa, com auxílio da Drª. Jossimara Polettini.

As amostras selecionadas serão submetidas à realização da análise da presença do DNA-HPV e subtipos 6/11, 16 ou 18, através do método de PCR (Reação

em Cadeia da Polimerase). As análises serão realizadas no Laboratório de Bioquímica da UFFS, pela acadêmica da pesquisa, com auxílio da Dra. Jossimara Polettini. As análises serão realizadas nas terças-feiras, quinzenalmente, das 8h30min às 17h. Após, os dados das análises de PCR serão registrados na ficha de coleta de dados (Apêndice A), e após, serão digitados no sistema de dados da pesquisa.

Os blocos de parafina referentes às amostras das pacientes selecionadas para o estudo serão seccionados em micrótomo comum, obtendo-se 3 cortes de 6 µm de espessura. Os fragmentos serão acondicionados em microtubos estéreis e submetidos à desparafinização em xilol e subsequente extração de DNA total pelo método CTAB/NaCl.

Após desparafinização e acondicionamento dos fragmentos em tampão TET (Tris-EDTA-Tween), será adicionado 50µL de proteinase K em uma concentração final de 400 µg/ul. As amostras serão incubadas a 56ºC por 12h para a digestão do material e, após esse período, a proteinase K será inativada por aquecimento a 96ºC durante 7 minutos. Em seguida, serão adicionados 100 µl de uma solução de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65ºC, com posterior incubação por 10 minutos a 65ºC. Após a incubação será acrescentado 750 µl de clorofórmio - álcool isoamilico 24:1 e centrifugação por 5 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante será então transferido para novo tubo e adicionado 450 µl de etanol absoluto a - 20ºC com posterior incubação por 10 minutos à TA. Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4ºC, o sobrenadante será descartado e 450 µl de etanol 70% será adicionado ao pellet. Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4ºC, o etanol 70% será removido e as amostras serão ressuspendidas em 50 µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de PCR.

Para pesquisa de HPV será empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores MY09 e MY11, que flanqueiam uma região do gene L1 do HPV, e que gera um produto amplificado de 450pb, seguido de Nested-PCR com os primers e GP5+/GP6+, que flanqueiam um fragmento interno de 150pb à região anterior para ampliar a sensibilidade da reação (HUSMAN et al., 1995). Os controles positivos das reações, ou seja, DNA extraído de células HeLa e os clones de cada subtipo analisado, e os respectivos *primers* para as PCRs serão gentilmente cedidas pela Dra. Márcia Guimarães da Silva, do Laboratório de Imunopatologia da

Relação Materno-Fetal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A extração do DNA das amostras estudadas será verificada pela amplificação do gene constitutivo da β-globina.

As reações de PCR e Nested-PCR serão realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de *Go Taq Green Master Mix 2X* (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6µL de cada primer na concentração de 10µM; 4,8 µL de água estéril e 4µL de cada amostra pesquisada. As incubações serão realizadas em termociclador com os parâmetros de 95ºC durante 5 minutos e 95ºC durante 45 segundos para desnaturação, 47,7ºC durante 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72ºC durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final será de 72ºC por 7 minutos e resfriamento a 4ºC. Em todas as reações realizadas será utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa.

Para a determinação dos tipos virais presentes nas amostras que apresentaram positividade para DNA de HPV será empregada a técnica de PCR-multiplex. Serão utilizados primers específicos para os tipos 6/11, 16, 18 (VAN DEN BRULE et al., 1990). As reações serão realizadas volume final de 20 uL, composto por 10 uL de PCR Buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega); 1,0 uL de cada primer na concentração de 10 uM; água estéril q.s.p. e 2uL de amostra de DNA. Os parâmetros utilizados serão 94ºC durante 5 minutos e 94ºC durante 1 minuto para desnaturação, 53,5ºC durante 30 segundos para anelamento dos primers e 72ºC durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 37 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final será de 72ºC por 7 minutos e resfriamento a 4ºC.

A eficiência das amplificações será monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados será comparado com o padrão de 100 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra-violeta.

2.1.8.5 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados

Os dados obtidos nos livros de registros do laboratório de patologia serão duplamente digitados, com o objetivo de aumentar a precisão dos resultados, em banco de dados desenvolvido no programa Epidata versão 3.1 (distribuição livre). A análise estatística será executada no programa de análises estatísticas PSPP (distribuição livre) e compreenderá a média e desvio padrão das variáveis numéricas e distribuição de frequências, absoluta e relativa, das variáveis categóricas.

A análise de associação entre as variáveis independentes com a variável dependente será verificada por meio do teste Qui-quadrado, empregando-se nível de significância de 5%. Será avaliada a positividade de DNA-HPV, assim como a relação da positividade e tipagem viral com os desfechos gestacionais e neonatais.

Em um primeiro momento, será analisada a variável categórica dependente positividade para DNA-HPV e seus subtipos em relação às variáveis independentes categóricas de desfecho gestacional, estado civil e grau de escolaridade. Também serão analisadas as variáveis dependentes categóricas APGAR no 1º e 5º minuto e peso ao nascer em relação à variável independente categórica de positividade para o DNA-HPV e seus subtipos. O restante dos dados contidos na Ficha de Transcrição (Apêndice A) serão utilizados para a descrição da amostra.

2.1.8.6 Aspectos éticos

Para cumprimento dos aspectos éticos, o estudo será submetido, primeiramente, à Comissão de Pós-Graduação e Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo. Após aprovação por essa comissão, será submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul, de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A pesquisa será realizada com respeito à todos os preceitos éticos estabelecidos, zelando pela legitimidade, privacidade e sigilo das informações, quando necessárias, tornando os resultados desta pesquisa públicos.

Presente no Apêndice B, encontra-se a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A solicitação de dispensa é adequada uma vez que o estudo é baseado em dados de prontuários eletrônicos, os pacientes não são acompanhados regularmente pelo hospital, mudaram de endereço ou podem ter vindo à óbito.

Por fim, no Apêndice C está contido o termo de compromisso para uso de dados em arquivo, com o objetivo de afirmar o comprometimento da equipe em preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados. Visto que a equipe terá acessos aos dados através de cadastro eletrônico, existe o risco do paciente ter seus dados de identificação revelados. Como forma de minimizar esse risco, o nome de cada paciente será substituído por um número específico. No caso do risco ocorrer, a atividade desenvolvida será interrompida. Os dados computados serão armazenados por um período de cinco anos, em local seguro, e serão destruídos após esse período.

Não há benefícios diretos aos participantes da pesquisa, uma vez que já ocorreu o desfecho da gestação. No entanto, a pesquisa poderá ter benefício indireto através do conhecimento gerado aos profissionais da saúde e às gestantes, na busca de planos de ação relacionados à condição estudada.

De maneira a fornecer uma devolutiva às instituições envolvidas, a equipe pretende entregar um relatório documentando os resultados obtidos na pesquisa. Já em relação à devolutiva para a população em geral, pretende-se desenvolver uma cartilha com informações e os principais resultados da pesquisa.

2.1.9 Recursos

Tabela 1 - Recursos

Itens	**Quantidade**	**Custo unitário (R$)**	**Custo total (R$)**
Canetas	10	1,00	10,00
Impressões	1000	0,15	150,00
PCR	370	10,00	3700,00
Total			R$ 3860,00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As despesas descritas na Tabela 1 serão custeadas com recursos próprios pela equipe de pesquisa. Os equipamentos utilizados, bem como o local de realização das análises de Reação em Cadeia da Polimerase, pertencem à Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

2.1.10 Cronograma

Cronograma para o ano de 2019 e 2020:

- Revisão de literatura: de julho de 2019 à julho de 2020;
- Coleta de dados: de outubro de 2019 à dezembro de 2019;
- Execução das análises de PCR: de outubro de 2019 à dezembro de 2019;
- Relatório parcial para o Comitê de Ética: dezembro de 2019;
- Processamento de dados: de janeiro de 2020 à março de 2020;
- Análise de dados: de abril de 2020 à março de 2020;
- Relatório final para o comitê de ética: julho de 2020;
- Publicação dos dados: de junho de 2020 à julho de 2020.

2.1.11 Referências

ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO. **Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo HPV (POP Brasil)**: resultados preliminares. Porto Alegre, nov. 2017. Disponível em: <https://www.sboc.org.br/images/downloads/LIVRO-POP.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2019.

BOULENOUAR, S. et al. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 473-480, mar. 2010.

CAMPOS, R. S. P. et al. Gestação e papilomavírus humano (HPV): vias de transmissão e complicações. **Diagn. tratamento**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 109-114, jul./set. 2016.

CASTANON, A.; LANDY, R.; SASIENI, P. How much could primary human papillomavirus testing reduce cervical cancer incidence and morbidity? **Journal of Medical Screening**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 99–103, jun. 2013.

HUSMAN, A. R. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 76, n. 4, p. 1057-1062, abr. 1995.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

JACH, R. et al. Vertical transmission of HPV in pregnancy. A prospective clinical study of HPV-positive pregnant women. **Ginekologia Polska**, [S.L.], v. 85, n. 9, p. 672-676, set. 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

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

BRASIL. **Gestação de alto risco**: manual técnico. 5. ed. Brasília: Editora MS, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao_alto_risco.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2019.

BRASIL. **Guia prático sobre HPV**: perguntas e respostas. Brasília, nov. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/07/Perguntas-e-respostas-HPV-.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2019.

MUSSI-PINHATA, M. M.; YAMAMOTO, A. Y. Infecções congênitas e perinatais. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 75, n. S1, p. 15-30, jan./fev. 1999.

PARK, H. et al. Rate of vertical transmission of human papillomavirus from mothers to infants: relationship between infection rate and mode of delivery. **Virology Journal**, [s.l.], v. 80, n. 9, p. 1-7, abr. 2012.

ROMBALDI, R. L. et al. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. **Virology Journal**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 106-120, set. 2008.

SARKOLA, M. E. et al. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. **Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica**, [s.l.], v. 87, n. 11, p. 1181-1188, jan. 2008.

SOUHO, T; BENLEMLIH, M; BENNANI, B. Human Papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 5, e0126936, mai. 2015.

TEIXEIRA, L. O. et al. Frequência do Papilomavírus Humano na placenta, no colostro e no sangue do cordão umbilical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [s.l.], v. 37, n. 5, p. 203-207, mai. 2015.

TSAKOGIANNIS, D. et al. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–20, fev. 2017.

TSENG, C. J. et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 166, n. 1, p. 35-40, jan. 1992.

VAN DEN BRULE, A. J. C. et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 2739-2743, 1990.

2.1.12 Apêndices

APÊNDICE A – FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E RESULTADO DAS ANÁLISES PCR

Pesquisador Responsável: Profª. Ms. Daniela Augustin Silveira

Contatos: telefone (54) 99113-7893 – Email: danielasilveira@gmail.com

Número do formulário:	nform _____
DADOS DA PARTURIENTE	
1. Número do prontuário:	npront _____
2. Número da prescrição:	npresc _____
3. Número do exame anatomopatológico:	nap _____
4. Idade na entrada do serviço:	idad __ __
5. Etnia: (1) Branco (2) Pardo (3) Negro (4) Não consta	etn __
6. Estado civil: (1) Casado (2) Solteiro (3) Divorciado (4) Viúvo (5) União estável (6) Não consta	estaciv __
7. Grau de escolaridade: (1) Ensino Fundamental incompleto (2) Ensino Fundamental completo (3) Ensino Médio completo (4) Ensino Superior completo (5) Não consta	grauesc __
8. Idade gestacional	idgest _____
9. Paridade	G__P__C__A__
10. Tipo de parto (1) Vaginal (2) Cesárea	part ___
11. Comorbidades (1) Tabagismo (2) Alcoolismo (3) HAS (4) Diabetes Mellitus (5) Hipotireoidismo (6) Depressão (7) Lesão placentária (8) DHEG	cb ___
12. Desfecho gestacional	_____
DADOS DO RECÉM NASCIDO	
13. Escala APGAR 1º minuto	apg1 __
14. Escala APGAR 5º minuto	apg5 ___
15. Peso ao nascimento (kg)	peso _____
RESULTADO ANÁLISE PCR	
16. Resultado da análise PCR: (1) Positivo genótipo viral 06/11 (2) Positivo genótipo viral 16 (3) Positivo genótipo viral 18 (4) Negativo	pcr __

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA

PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Esta pesquisa será desenvolvida por Roberta Klering, discente do curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus de Passo Fundo, sob orientação da Profª. Msª. Daniela Augustin Silveira e coorientação da Profª. Drª. Jossimara Polettini.

O objetivo central do estudo é identificar a prevalência do Papiloma Vírus Humano (HPV) em tecidos placentários de pacientes que realizaram seu parto no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), no ano de 2017, cujas amostras estão armazenadas no Laboratório de Patologia do Hospital. Além disso, pretende-se avaliar a relação da presença do vírus à comorbidades gestacionais, como parto prematuro e rotura prematura de membranas.

Apesar de não haver benefícios diretos aos participantes da pesquisa, uma vez que a gestação já ocorreu, o estudo se justifica por proporcionar benefícios indiretos através das informações geradas aos profissionais de saúde, gestantes e população em geral. Além de possibilitar aos profissionais melhor conhecimento sobre a patologia estudada e seus modos de transmissão, o estudo poderá auxiliar na busca de planos de ação relacionados à mesma, gerando um impacto positivo no desfecho de pacientes sabidamente portadores do vírus.

Será fornecida uma devolutiva dos resultados encontrados às instituições envolvidas. Ao HSVP, a equipe pretende entregar um relatório documentando os resultados obtidos na pesquisa. Para a população em geral, pretende-se desenvolver uma cartilha com informações e os principais resultados da pesquisa.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações obtidas. Visto que a equipe terá acesso aos dados em prontuário eletrônico, há o risco de o paciente ter sua identidade revelada. De maneira à minimizar esse risco, o nome do paciente será substituído por um número. Os dados computados serão armazenados por um período de cinco anos, em local seguro, e serão destruídos após esse período.

As informações serão utilizadas para realização de um estudo quantitativo, observacional, retrospectivo, descritivo e analítico. A coleta de dados ocorrerá no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo. Os instrumentos de coleta consistem em formulários, que serão preenchidos com dados sociodemográficos e clínicas (dados da parturiente: idade, raça, estado civil, grau de escolaridade, idade gestacional, paridade, tipo de parto e comorbidades; dados do recém-nascido: escala APGAR no 1º e 5º minuto e peso ao nascimento), conforme contido no prontuário eletrônico de cada participante. A amostra será composta por 370 participantes. A coleta de dados iniciará somente após a ciência e concordância do hospital, aprovação do protocolo de pesquisa e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS, conforme Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Devido à importância da pesquisa e com base na Resolução CNS Nº 466 de 2012 – IV.8, solicito a dispensa da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pois o estudo trata-se de uma pesquisa retrospectiva, baseado em dados de prontuários eletrônicos e os pacientes não são acompanhados regularmente pelo hospital, mudaram de endereço ou podem ter vindo à óbito. Além disso, alguns pacientes são procedentes de outros locais, uma vez que a maternidade do HSVP é referência para diversos municípios que compõem a 6ª Coordenadoria Regional de Saúde.

Os resultados serão divulgados em eventos e/ou publicações científicas mantendo sigilo dos dados pessoais.

Passo Fundo, _____ de _____ de 2019.

_____

Profª. Msª. Daniela Augustin Silveira

APÊNDICE C – TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE MEDICINA

TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO
Título da Pesquisa: PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

O(s) pesquisador(es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

I. Preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados;

II. Assegurar que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;

III. Assegurar que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

_____

Msª Daniela Augustin Silveira

_____

Drª. Jossimara Polettini

_____

Roberta Klering

Passo Fundo, ____ de _____ de 2019.

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

O Projeto de Pesquisa acima foi elaborado no primeiro semestre do ano de 2019, no componente curricular de “Pesquisa em Saúde”. No segundo semestre do mesmo ano, no componente curricular de “TCC I”, e entre janeiro e outubro de 2020, no componente curricular de “TCC II”, foi elaborado o presente Relatório, com o objetivo de detalhar as atividades realizadas nesse período.

No início do segundo semestre de 2019, o projeto de pesquisa foi enviado para a Comissão de Pós-Graduação e Pesquisa do Hospital São Vicente de Paulo, com o objetivo de obter a Declaração de Autorização De Pesquisa, uma vez que é nessa instituição que ocorreria a coleta de dados da pesquisa. A aprovação ocorreu após um mês.

No dia 13 de setembro, após a obtenção da Declaração De Autorização de Pesquisa pelo HSVP, o trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul, através da Plataforma Brasil, conforme Anexo B. No dia 21 de outubro foi divulgado o Parecer da comissão de avaliação da Plataforma, no qual algumas pendências foram descritas. No dia 01 de novembro essas pendências foram respondidas através de uma carta de pendências e as modificações solicitados foram realizadas na Plataforma Brasil e respectivos documentos anexados. O projeto de pesquisa foi aprovado no dia 14 de novembro, conforme Anexo C.

Após a aprovação, algumas atividades de organização de materiais e reagentes foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS, local em que seriam analisadas as análises do projeto.

Com o início do recesso acadêmico da Universidade Federal da Fronteira Sul, teve início a coleta de dados de prontuários, que foi realizada entre dezembro de 2019 e março de 2020. Nesse período, visando complementar os dados colhidos em prontuários, novas variáveis foram adicionadas à Ficha de transcrição de dados sociodemográficos. Entre os novos dados coletados estão o resultado do exame anatomopatológico das placentas, informações sobre a mortalidade dos recém nascidos e informações da gestação. A ficha de coleta de dados atualizada pode ser consultada no Apêndice A deste volume.

Devido à suspensão do calendário acadêmico da Universidade Federal da Fronteira Sul, em março de 2020, em virtude da pandemia do Coronavírus, conforme deliberação do Conselho Universitário (conforme Portaria Nº 363/GR/UFFS/2020), o corte dos blocos de parafina referentes às amostras selecionadas e, por conseguinte, a execução das análises de PCR sofreram atraso em seu prazo de realização previsto.

Em julho de 2020, foi divulgada a Proposta de Retorno Gradual às Atividades Presenciais do Campus Passo Fundo, que previu o retorno das atividades acadêmicas para o dia 10 de agosto, com consequente encurtamento do semestre. Assim, conforme a necessidade de adaptação do plano de ensino das disciplinas, o componente curricular de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II) sofreu alterações nos prazos de entregas dos artigos e data das apresentações.

Dessa forma, com o atraso do calendário acadêmico em decorrência da pandemia, o início das análises de PCR ocorreu em agosto em 2020. A entrega da primeira versão do artigo para os professores da disciplina estava prevista para o dia 9 de setembro. Dessa maneira, surgiu a necessidade de adaptar o tema do artigo, de maneira que utilizasse as informações teóricas já coletadas e o resultado das análises de PCR que pudessem ser realizadas nesse período.

Assim, visto que o projeto de pesquisa englobava um questionário com uma gama ampla de informações sociodemográficas, gestacionais e de resultados anatomopatológicos de placenta, utilizou-se tais dados para a escrita de um artigo sobre “Prevalência de prematuridade e fatores associados em usuárias do sistema único de saúde de um hospital terciário da região norte do estado do Rio Grande do Sul”, que foi entregue como dados parciais na primeira entrega do artigo final da disciplina de TCC II.

Após a entrega da primeira versão do artigo, prosseguiram as análises de detecção de HPV em tecidos placentários no Laboratório de Biologia Molecular da UFFS, no entanto, não foi possível a realização das análises do n previamente proposto. Em setembro de 2020 ocorreu o processamento dos dados. No mesmo período também foi realizada a análise estatística. A escrita do artigo final e a confecção do presente volume final de TCC ocorreu nos meses de agosto e setembro de 2020. A revista escolhida para nortear as normas do artigo foi a Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, conforme Anexo D.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Roberta Klering[1], Jossimara Polettini[2], Daniela Augustin Silveira[2]

[1]Discente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.
[2]Docente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

Autor correspondente:
Daniela Augustin Silveira
Universidade Federal da Fronteira Sul
R. Cap. Araújo, 20 - Centro, Passo Fundo - RS
CEP 99010-200
E-mail: daniela.silveira@uffs.edu.br

Resumo

Introdução: O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus DNA que causa infecções na pele e mucosas, porém investigações recentes demonstraram tropismo viral pelas células trofoblásticas e buscam elucidar a relação deste vírus com desfechos gestacionais e neonatais adversos. **Objetivo:** Determinar a positividade do DNA-HPV em tecidos placentários, e relacionar com o perfil sociodemográfico e as características do parto e do recém-nascido. **Material e Métodos:** Estudo transversal com dados e amostras de tecidos placentários (parênquima e membranas fetais) de parturientes de um hospital terciário, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2017, cuja placenta foi encaminhada para análise anatomopatológica. As amostras parafinizadas foram seccionadas, desparafinizadas em xilol e submetidas à extração de DNA total. A pesquisa de HPV foi realizada pela técnica de Nested-PCR utilizando os iniciadores MY09 e MY11 e GP5+/GP6+. Os dados sociodemográficos, gestacionais e dos recém-nascidos foram coletados dos prontuários eletrônicos. Os dados foram apresentados como distribuição de frequências absoluta e relativa das variáveis. **Resultados:** Foram incluídas 327 gestantes, e observou-se menos de 5% de gestações na adolescência, e

mais de 20% das pacientes estudadas eram de idade materna avançada (> 35 anos). Em relação aos dados obstétricos, observou-se a maioria das mulheres na sua primeira gestação, cesárea como tipo de parto mais prevalente e altas taxas de comorbidades materna. A pesquisa de HPV foi negativa em todas as amostras avaliadas. **Conclusão:** A positividade de HPV não foi observada e, portanto, não foi possível fazer a correlação dessa variável com a prematuridade ou outras características gestacionais e novos estudos com maior amostragem devem ser realizados para melhor compreensão das características da população estudada.

Palavras chave: Papiloma Vírus Humano. Reação em Cadeia da Polimerase. Gestação. Prematuridade.

Introdução

A placenta e os anexos embrionários protegem o embrião em desenvolvimento e são responsáveis pela nutrição, respiração, excreção e produção de hormônios durante o desenvolvimento[1]. No entanto, falhas na formação placentária podem comprometer o embrião em crescimento e desenvolvimento, sendo que a placentação anormal é uma característica de diversas complicações da gravidez, como aborto espontâneo, feto natimorto, trabalho de parto pré-termo, crescimento intra-uterino restrito (CIUR) e pré-eclâmpsia. Nesse contexto, infecções podem influenciar o desenvolvimento placentário, como a presença do Papilomavírus Humano (HPV), que, apesar de ter tropismo preferencial ao epitélio escamoso, como na ectocérvice, pode colonizar células trofoblásticas e influenciar na sua adesividade e proliferação[2].

O HPV apresenta preferencialmente tropismo por células epiteliais, causando infecções na pele e nas mucosas. São pequenos vírus (50-55nm), não envelopados, com simetria icosaédrica, pertencentes à família Papoviridae – gênero *Papillomavirus*. O genoma apresenta aproximadamente 8.000 pares de base (8Kb) de DNA dupla fita e circular[3]. A infecção por HPV é considerada atualmente a infecção sexualmente transmissível mais comum[4]. Segundo o Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV, a prevalência estimada no ano de 2017 foi de 54,6%[5]. Segundo o Ministério da Saúde, existem atualmente

mais de 150 tipos diferentes de HPVs, dos quais 40 podem infectar o trato genital e destes, 12 são de alto risco e podem provocar câncer[6]. Sabe-se que a detecção viral precoce pode promover uma redução de cerca de 32,6% na taxa de câncer do colo do útero[7].

Na gestação, a via de infecção ao ambiente materno-fetal mais comum é a via ascendente do canal cervical, e uma possível consequência para o neonato, quando há contato com o HPV, é a papilomatose respiratória recorrente juvenil[8]. Estudos com amostras biológicas distintas sugerem também a transmissão transplacentária do HPV. Nesse contexto, Sarkola et al.[9], encontraram DNA-HPV em 4,2% de amostras de placentas e 3,5% das amostras de cordão umbilical. De forma semelhante, Teixeira et al.[10], detectaram DNA-HPV em 4% de amostras do lado materno das placentas, 3,3% de amostras do lado fetal e 2,2% no sangue do cordão. Por outro lado, a positividade de DNA-HPV placentário pode chegar a cerca de 25% nos casos de mulheres grávidas positivas para DNA-HPV cervical no momento do parto. Adicionalmente, entre as mães positivas para o DNA-HPV tipo 16, 13,5% dos recém-nascidos tiveram o mesmo DNA-HPV detectado em células do cordão umbilical e os autores concluíram que a positividade do DNA-HPV na placenta e no sangue do cordão umbilical aumentou o risco de HPV oral no neonato, sendo que a modalidade do parto não foi definidora para o status HPV do neonato. No entanto, apesar das evidencias de relação de infecção cervical e acometimento gestacional, a detecção do HPV cervical por biologia molecular não é realizada na assistência pré-natal do SUS, o que pode favorecer o subdiagnóstico, com consequente não tratamento, e, portanto, aumentar as taxas de infecção placentária[9,10].

Adversidades gestacionais relacionadas à presença de HPV nos tecidos placentárias são documentadas na literatura, incluindo abortos no primeiro trimestre e prematuridade, associada especialmente à rotura prematura das membranas fetais, quadros que aumentam a morbidade neonatal[11]. Estima-se taxas de prematuridade em 6 a 12% das gestações, e que, anualmente, 15 milhões de bebês nascem antes de 37 semanas e aproximadamente 1 milhão de crianças morrem

a cada ano devido a complicações de parto prematuro[12,13]. Embora seja bem estabelecido etiologia multifatorial para o parto pré-termo, a infecção da cavidade amniótica, geralmente advinda do trato genital inferior, é, até o momento, o principal fator associado à sua fisiopatologia por ativar precocemente a cascata inflamatória na interface materno-fetal[14]. Os mediadores inflamatórios induzem a produção de prostaglandinas, que, por sua vez, estimulam a contratilidade uterina[15]. No entanto, apesar dos inúmeros trabalhos e das tecnologias existentes, os mecanismos envolvidos no desencadeamento do trabalho de parto ainda não estão completamente elucidados[16].

Nesse contexto, o exame anatomopatológico da placenta é um aliado nas investigações das alterações relacionadas ao parto e à gestação[17]. Através do exame macro ou microscópico desse órgão é possível identificar e mensurar alterações na estrutura, implantação, vascularização, inflamação ou adversidades no ambiente intrauterino, que resultam em consequências fetais[18]. Dessa forma, sua análise é altamente relevante para o melhor entendimento da fisiopatologia placentária, cujas alterações podem levar ao comprometimento do desenvolvimento neonatal ou ainda à natimortalidade[19].

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de HPV nos tecidos placentários, bem como sua associação com características sociodemográficas, gestacionais, neonatais e placentárias em gestantes atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em um hospital terciário da região norte do estado do Rio Grande do Sul. Destaca-se que tal diagnóstico é de extrema importância para o entendimento do perfil da população estudada, fisiopatologia viral e disfunção placentária, que pode provocar desfechos gestacionais e neonatais desfavoráveis.

Métodos

Trata-se de um estudo transversal quantitativo, descritivo e analítico, desenvolvido no período de agosto de 2019 a outubro de 2020 no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul, em Passo Fundo – RS. A amostra foi constituída por pacientes parturientes, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no HSVP, que, por motivo de gestação de alto risco, ou critérios estabelecidos pela equipe obstétrica, tiveram suas placentas encaminhadas para análise anatomopatológica no ano de 2017. Foram excluídos os casos nos quais não foi possível encontrar o prontuário materno a partir do exame anatomopatológico.

Os dados sociodemográficos e gestacionais foram obtidos através de prontuários eletrônicos. As variáveis da parturiente analisadas foram desfecho gestacional, idade, etnia, estado civil, grau de escolaridade, idade gestacional, paridade, tipo de parto e comorbidades. Além disso, as informações relativas ao resultado do exame anatomopatológico da placenta também foram analisadas. As variáveis analisadas do recém-nascido foram peso ao nascimento, APGAR no 1º e 5º minuto e ocorrência de morte neonatal.

O termo "recém-nascido 1" foi adotado para a descrição relativa ao recém-nascido de gestações únicas e ao primeiro recém-nascido de gestações gemelares. O termo "recém-nascido 2" foi adotado para a descrição relativa ao segundo recém-nascido de gestações gemelares. O escore de APGAR considerado satisfatório no 1º e 5º minuto foi o APGAR > 7. O peso ao nascimento considerado baixo foi o peso < 2500g.

Os blocos de parafina referentes às amostras placentárias – parênquima e membranas corioamnióticas – selecionadas para o estudo foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se 3 cortes de 10 μm de espessura. Os fragmentos foram acondicionados em microtubos estéreis e submetidos à desparafinização em xilol e subsequente extração de DNA

utilizando-se o método *in house*, baseado na dissolução do DNA em clorofórmio - álcool isoamilico e precipitação em gradiente de etanol absoluto e etanol 70%.

Para pesquisa de HPV foi empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores MY09 e MY11, que flanqueiam uma região conservada do gene L1 do HPV, e que gera um produto amplificado de 450pb, seguido de Nested-PCR com os iniciadores GP5+/GP6+, que flanqueiam um fragmento interno à região anterior para ampliar a sensibilidade da reação[20].

As reações de PCR e Nested-PCR foram realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de Go Taq Green Master Mix 2X (Promega, WI, USA); 0,6µL de cada primer na concentração de 10uM; 4,8 µL de água estéril e 4µL de cada amostra pesquisada. As incubações foram realizadas em termociclador com os parâmetros de 95ºC durante 5 minutos para desnaturação, seguidos de 30-35 ciclos de termociclagem de acordo com os parâmetros dos *primers* utilizados, incluído ciclo de desnaturação, anelamento dos *primers* e polimerização da dupla fita de DNA. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa. A eficiência da extração do DNA das amostras estudadas foi verificada pela amplificação do gene constitutivo da β-globina.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corado com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pares de base (pb) e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra-violeta.

Os dados obtidos foram duplamente digitados em planilha no programa Epidata versão 3.1. A análise estatística foi executada no programa Stata versão 13.0 e compreendeu a distribuição de frequências absoluta e relativa das variáveis categóricas.

Resultados

Foram identificados 339 exames anatomopatológicos placentários de gestantes que tiveram parto realizado no HSVP pelo SUS, no entanto, 12 não foram incluídos por discrepância entre a identificação do exame e o prontuário materno, sendo assim, incluídos dados de 327 pacientes. No referido hospital, no ano de 2017, foram registrados 3412 nascimentos. Dessa forma, a amostra analisada correspondeu à 9,9% de todos os nascimentos, aproximadamente.

A Tabela 1 demonstra as características sociodemográficas das pacientes estudadas. Em relação à idade, 4,3% possuía menos de 18 anos, 74,6% entre 18 e 34 anos e 21,1% possuía 35 anos ou mais. A etnia branca (82,9%) e estado conjugal com companheiro (82,6%) foram os mais prevalentes e 42,5% das gestantes possuíam o Ensino Médio Completo.

Os dados da história pregressa reprodutiva e gestação atual das pacientes estudadas estão apresentados na Tabela 2. As primigestas representaram 42,2% da amostra, enquanto a multiparidade (3 ou mais partos) foi observada em 26,6% dos casos. Abortos prévios ocorreram em 14,3% das mulheres. Em relação à gestação em estudo, o tipo de parto mais prevalente foi o parto por cesárea (84,4%), 31 (9,5%) foram gestações gemelares e 2 tiveram como desfecho o aborto (0,6%). Dos 327 casos estudados, 206 (62,9%) foram partos entre 22 e 36 semanas completas de gestação, considerados pré-termo, 119 (36,4%) partos com mais de 37 semanas (a termo) e 2 abortos (<22 semanas).

Ainda, a Tabela 2 demonstra as comorbidades das pacientes, sendo que as condições de Pré-eclâmpsia, Síndrome *HELLP*, Eclâmpsia, Crescimento Intra-Uterino Restrito (CIUR), Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), doença hipertensiva específica da gestação (DHEG), trabalho de parto prematuro e alterações de volume do líquido amniótico estiveram presentes de 15 a 20% das gestações estudadas.

Em relação aos recém-nascidos, conforme Tabela 3, observou-se que 43,4% dos recém-nascidos 1 e 51,6% dos recém-nascidos 2 necessitou de internação em UTI neonatal, assim

como mais da metade apresentou baixo peso ao nascer. Os escores de APGAR foram satisfatórios em 68,9% dos recém-nascidos 1 e 51,7% dos recém-nascidos 2 no 1º minuto, e em 90% dos recém-nascidos 1 e 93,2% dos recém-nascidos 2 no 5º minuto pós nascimento. Os números de mortes neonatais precoces e tardias variaram entre 3 e 7%.

Os resultados dos exames anatomopatológicos das placentas e anexos referentes a alterações inflamatórias demonstrou corioamnionite em 78 (24,3%), funisite (cordão umbilical) em 20 (6,2%) e vilite (parênquima) em 14 (4,4%) das amostras avaliadas. Adicionalmente, infartos placentários e maturação irregular foram observados em 83 (25,9%) e 28 (8,7%) casos.

Os resultados da pesquisa de HPV são apresentados de forma parcial. Foram analisadas 96 amostras, divididas entre parênquima placentário e membranas corioamnióticas. Foi possível recuperar o DNA total em 48 (50%) das amostras, tanto de parênquima placentário como de membranas corioamnióticas, evidenciado pela positividade da PCR para o gene constitutivo da beta-globina (Figura 1A e 1B). Por outro lado, a pesquisa de HPV foi negativa em todas as amostras avaliadas até o momento (Figura 2). Portanto, não foi possível fazer a correlação dessa variável com a prematuridade ou outras características gestacionais e neonatais.

Discussão

A infecção por HPV na gravidez pode ser uma causa de adversidades, incluindo abortos e prematuridade. Embora a infecção intrauterina ascendente com colonização do trofoblasto seja comumente observada, a infecção descendente hematogênica também deve ser considerada. Bober et al [21] relataram que pacientes com um curso anormal do primeiro trimestre de gravidez apresentam maior positividade de HPV, incluindo genótipos de alto risco. Dessa forma, o conhecimento do perfil populacional e taxas de infecção podem contribuir para melhor entendimento e medidas preventivas de adversidades gestacionais[21].

No presente estudo, foi possível caracterizar gestantes parturientes, que, por motivo de gestação de alto risco, ou critérios estabelecidos pela equipe obstétrica, tiveram suas placentas encaminhadas para análise anatomopatológica de acordo com recomendação do Ministério da Saúde. Nessa população, observou-se dados de etnia, situação conjugal e escolaridade nas faixas encontradas na maioria dos estudos brasileiros[22,23]. Por outro lado, menos de 5% de gestações foram observados na adolescência, dados favoráveis em relação às taxas registradas na população brasileira em geral, na qual as gestações nessa faixa etária representam cerca de 12 a 26% das gestações. No entanto, visto que a amostra é constituída por gestantes de alto risco e que as gestações na adolescência apresentam, em sua maioria, menor número de comorbidades, esse resultado precisa ser analisado com cautela, por não apresentar uma representatividade comparável às gestações da população em geral[24,25]. Ainda, mais de 20% das pacientes estudadas eram de idade materna avançada (> 35 anos), o que aumenta as chances de adversidades gestacionais[26] e pode estar relacionado às diversas comorbidades observadas, embora essa análise não tenha sido realizada.

Em relação aos dados obstétricos, observa-se a maioria das mulheres na sua primeira gestação, com parto cesáreo presente em quase 85%, e esta alta taxa pode ser justificada pelos inúmeros casos de complicações gestacionais encontradas na população estudada. É importante ressaltar que o HSVP é um hospital terciário, de referência regional de atendimento do SUS, por isso a alta taxa de adversidades, como pré-eclâmpsia, diabetes, prematuridade, entre outras. Nesse mesmo contexto, o peso do recém-nascido foi abaixo do esperado em mais de 50% dos casos, assim como alta porcentagem de neonatos apresentou baixo escore de APGAR[27]. Em revisão sistemática recente, Veloso et al. (2019)[28] reportaram fatores de risco significativamente associados com a mortalidade neonatal no Brasil, dentre os quais alguns em concordância com os achados desse estudo, como idade materna ≥ 35 anos, presença de intercorrências durante a gestação, de malformação congênita na gestação em estudo, Apgar < 7 no quinto minuto, baixo

e muito baixo peso ao nascer, idade gestacional ≤ 37 semanas e parto cesariano[28]. Dessa forma, evidencia-se que a população estudada apresenta características condizentes com fatores de adversidades gestacionais e neonatais, o que deve ser considerado nas políticas de atendimento e seguimento dessas pacientes.

Em relação ao exame anatomopatológico da placenta, observou-se principalmente alterações inflamatórias, o que pode inferir sobre possível colonização placentária por microrganismos. A corioamnionite histológica, considerada importante indicador de infecção da cavidade amniótica é definida pela presença de leucócitos polimorfonucleares nas estratificações das membranas corioamnióticas, podendo também ser avaliada a densidade e degeneração tecidual para estimar a intensidade e progressão da resposta inflamatória materna[29], e foi observada em quase um quarto das amostras. Nesse contexto, na presença de corioamnionite acompanhada por funisite, ou seja, presença de infiltrado inflamatório no cordão umbilical, a associação com as adversidades neonatais é ainda mais evidente. A probabilidade de infecção neonatal em recém-nascidos prematuros, quando os neutrófilos polimorfonucleares estão presentes nas membranas corioamnióticas é de 62,5%, e de 0,5% quando os tecidos se apresentam normais[30]. Estes dados sugerem que corioamnionite histológica tem de ser considerada como um importante fator de risco para infecção precoce em recém-nascidos prematuros. Dessa forma, a análise é altamente relevante para o melhor entendimento da fisiopatologia placentária, cujas alterações podem levar ao comprometimento do desenvolvimento neonatal ou ainda à natimortalidade.

Tuominen et al. (2018)[31] demonstraram que a presença de HPV altera a microbiota placentária, sendo considerado um cofator nas infecções dos tecidos placentários[31]. Nesse contexto, portanto, existem evidências de que a infecção pelo HPV na placenta aumente o risco de complicações da gravidez, incluindo aborto no primeiro trimestre, infecção nasofaríngea ou bucal do recém-nascido e prematuridade associada à rotura prematura de membranas[21,32]. No

entanto, no presente estudo, os dados parciais de pesquisa de HPV demonstraram que não houve positividade da presença viral em parênquima placentário e/ou membranas corioamnióticas de gestantes que realizaram exame anatomopatológico desses tecidos. Uma possível justificativa para tal resultado é o baixo número de amostras processadas para essa variável (n=43), e, considerando que as taxas de positividade variam de 4 a 5% [9,10], uma amostragem maior poderia refletir a positividade esperada. Adicionalmente, o processo de inclusão de amostras teciduais em parafina, apesar de oportunizar às unidades hospitalares o armazenamento dessas amostras a longo prazo, e proporcionar assim uma importante fonte para estudos adicionais retrospectivos, como utilizado nesse estudo, faz a utilização do formol, o qual, juntamente com o posterior processamento histológico, geram certa degradação e modificações químicas nas células que podem se apresentar em graus variáveis.

Nesse contexto, é importante considerar que existem diferenças em relação ao processamento das amostras nos Laboratórios de Patologia. Por exemplo, o uso de formalina tamponada (acrescida de fosfato de sódio e pH 7,2) favorece a preservação do DNA/RNA, no entanto, nem todos os Serviços adotam esse fixador como protocolo. Dessa forma, foi possível fazer a recuperação do DNA em cerca de 50% das amostras, nas quais a detecção viral não se evidenciou, apesar da reação em cadeia da polimerase ter grande sensibilidade devido ao seu enorme potencial de amplificação de um segmento específico de DNA do agente investigado. Acredita-se, portanto, que o aumento da amostragem e melhoria nos protocolos de recuperação de DNA poderão gerar dados mais condizentes sobre a real prevalência de HPV nos tecidos placentários na população estudada.

A imunidade materna é outro aspecto importante a ser ressaltado na relação do HPV com a gestação. Para o desenvolvimento embrionário adequado, é necessário que o sistema imunológico reduza a atividade inflamatória previamente estabelecida no primeiro trimestre, através do aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas IL-4 e IL-

10, características de um perfil de resposta Th2, ideal para o desenvolvimento no segundo trimestre[33]. Estudos mostraram que a secreção cervical de pacientes com infecção por HPV apresentam citocinas Th2 aumentadas, relacionadas à persistência viral[34], o que pode contribuir para o entendimento da relação da infecção placentária por HPV e adversidades gestacionais. No entanto, tal relação ainda é escassa na literatura.

Importante ressaltar que atualmente existe uma vacinação bem sucedida para prevenir infecções e doenças causadas por infecção por HPV, sendo que estão disponíveis duas vacinas profiláticas: a quadrivalente, que previne infecções contra os HPVs 6,11,16 e 18, e a bivalente, contra os tipos 16 e 18[35]. Assim, estudo recente demonstrou diminuição do risco de complicações na gravidez em mulheres previamente vacinadas[36]. No Brasil, a vacina quadrivalente é ofertada pelo governo no Sistema Único de Saúde para meninas de 9 a 14 anos e, a partir de 2017, também para meninos de 11 a 14 anos, com a finalidade de proporcionar uma proteção durável antes da exposição viral por início da atividade sexual, porém a aderência ainda é aquém do esperado. Em 2017, a cobertura vacinal acumulada da vacina HPV nas meninas foi de 82,6% para a primeira dose e de 52,8% para a segunda dose, e para os meninos, a cobertura vacinal com a primeira dose foi de 43,8%[37]. Acredita-se que isso se deva ao baixo conhecimento sobre a infecção viral e seus possíveis efeitos, especialmente entre estudantes[38].

Dessa forma, considerando a amostra e metodologia empregadas, conclui-se que a positividade de HPV não foi observada e relacionada aos dados sociodemográficos, gestacionais e neonatais, portanto, novos estudos com maior amostragem devem ser realizados para melhor compreensão das características da população estudada. No entanto, o diagnóstico da presença do HPV nos tecidos placentários são de extrema importância para o entendimento do perfil da população estudada e relação com desfechos gestacionais. Embora a infecção por HPV possa ficar latente nas células por anos, a detecção do DNA-HPV em amostras biológicas, favorecida pelas técnicas de biologia molecular, é uma importante ferramenta no rastreamento

de lesões precoces, especialmente nos epitélios e mucosas. Nas gestantes, o conhecimento da infecção nos tecidos placentários pode contribuir ao entendimento da fisiopatologia viral e disfunção placentária, que pode provocar desfechos gestacionais e neonatais desfavoráveis. Além disso, tal conhecimento promove maior conscientização da necessidade de aplicação de rastreamento precoce da infecção viral cervical e vacinação das mulheres em idade reprodutiva.

Referências

1. Kierszenbaum AL, Tres LL. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

2. Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, Moussa Ali M, Favre M, Delvenne PO et al. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. Carcinogenesis. 2010; 31(3): 473-480.

3. Leto MGP, Santos JGF, Porro AM, Tomimori J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. An. Bras. Dermatol. 2011; 86(2): 306-317.

4. Jach R, Galarowicz B, Huras H, Pawlik D, Basta T, Streb J, Wolski H, Ludwin A, Ludwin I. Vertical transmission of HPV in pregnancy. A prospective clinical study of HPV-positive pregnant women. Ginekol Pol. 2014; 85(9): 672-676.

5. Associação Hospitalar Moinhos De Vento. Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo HPV (POP Brasil): resultados preliminares. 1 ed. Porto Alegre; 2017.

6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia prático sobre HPV: perguntas e respostas. Brasília, 27 fev 2014.

7. Castanon A, Landy R, Sasieni P. By how much could screening by primary human papillomavirus testing reduce cervical cancer incidence in England?. J Med Screen. 2017; 24(2): 110-112.

8. Campos RSP, Souza LBLN, Prata MCS, Hime LFCC. Gestação e papilomavírus humano (HPV): vias de transmissão e complicações. Diagn. Tratamento. 2016; 21(3): 109-114.

9. Sarkola ME, Grénman SE, Rintala MA, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008; 87(11): 1181-1188.

10. Teixeira LO, Amaral SC, Finger-Jardim F, Hora VP, Gonçalves CV, Soares MA, Martinez ANB. Frequência do Papilomavírus Humano na placenta, no colostro e no sangue do cordão umbilical. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2015; 37(5): 203-207.

11. Gomez LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. Hum Reprod. 2008; 23(3): 709-715.

12. Blencowe EH, Couses S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. Lancet. 2012; 379(9832): 2162-2172.

13. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. Lancet. 2016; 388(10063): 3027-35.

14. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van Den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. BJOG. 2009; 116(10): 1315-1324.

15. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition--a review. Placenta. 2003; 24(A): 33-46.

16. Behnia F, Sheller S, Menon R. Mechanistic Differences Leading to Infectious and Sterile Inflammation. Am J Reprod Immunol. 2016; 75(5): 505-518.

17. Silva TG, Lima TABC, Mota AVP, Guedes VR. A importância do exame anatomopatológico da placenta em obstetrícia e neonatologia. Hu rev. 2016; 42(3): 171-175.

18. Araujo CP. et al. Alterações placentárias macroscópicas associadas à ocorrência de fetos/recém-nascidos macrossômicos na gestação de alto risco [58ª Reunião Anual da SBPC; 2006; Florianópolis].

19. Chang GKT. Pathological examination of the placenta: raison d'etre, clinical relevance and medicolegal utility. Singapore Med J. 2009; 5(12): 1123-1133.

20. De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol. 1995; 76(4): 1057-1062.

21. Bober L, Guzowski G, Moczulska H, Sieroszewski P. Influence of human Papilloma Virus (hPV) infection on early pregnancy. *Ginekol Pol*. 2019;90(2):72-75.

22. Barbosa CNS, Gonçalves LRB, Silva GRF, Brandão EC, Rêgo ES, Ferreira MM. Caracterização dos partos segundo aspectos obstétricos e sócio-demográficos das parturientes de Teresina-PI. Rev Enf UFPI. 2013;02(02)40-7.

23. Queiroz MVO, Brasil EGM, Alcântara CM de, Carneiro M da GO. Profile of pregnancy in adolescence and related clinical-obstetric occurrences. Rev Rene. 2014;15(3):455–62.

24. Andréia A, Gravena F, Gisleine De Paula M, Marcon SS, Dalva Barros De Carvalho M, Pelloso SM, et al. Maternal age and factors associated with perinatal outcomes. Acta Paul Enferm. 2013;26(2):130-5.

25. Santos LAV, Lara MO, Lima RCR, Rocha AF, Rocha EM, Glória JCR, et al. História gestacional e características da assistência pré-natal de puérperas adolescentes e adultas em uma maternidade do interior de Minas Gerais, Brasil. Ciênc. saúde coletiva. 2018;23(2):617-26.

26. Santos GHN, Martins MG, Sousa MS, Batalha SJC. Impacto da idade materna sobre os resultados perinatais e via de parto. Rev Bras Ginecol Obstet. 2009;31(7):326-34.

27. Saloio CA, Morais Neto OL, Gonçalves DA, Bessa HEM, Coelho Júnior JP, Afonso MSM, et al. Magnitude e determinantes da mortalidade neonatal e pós-neonatal em Goiânia, Goiás: um estudo de coorte retrospectivo, 2012. Epidemiol Serv Saúde [preprint]. 2020.

28. Veloso FCS, Kassar LML, Oliveira MJC, Lima THB, Bueno NB, Gurgel RQ et al. Analysis of neonatal mortality risk factors in Brazil: a systematic review and meta-analysis of observational studies. J. Pediatr. 2019;95(5):519-530.

29. Menon R, Taylor RN, Fortunato SJ. Chorioamnionitis - a complex pathophysiologic syndrome. Placenta. 2010;31(2):113–20.

30. Korbage de Araujo MC, Schultz R, do Rosario Dias De Oliveira L, Ramos JL, Vaz FA. A risk factor for early-onset infection in premature newborns : invasion of chorioamniotic tissues by leukocytes. Early hum. dev. 1999;56(1):1–15

31. Tuominen H, Rautava S, Syrjänen S, Collado MC, Rautava J. HPV infection and bacterial microbiota in the placenta, uterine cervix and oral mucosa. Sci Rep. 2018;8(1):1–11.

32. Ambühl LM, Baandrup U, Dybkær K, Blaakær J, Uldbjerg N, Sørensen S. Human Papillomavirus Infection as a Possible Cause of Spontaneous Abortion and Spontaneous Preterm Delivery. Infect Dis Obstet Gynecol. 2016;2016:1-19.

33. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:122.

34. Feng Q, Wei H, Morihara J, Stern J, Yu M, Kiviat N et al. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma. Gynecol Onc. 2012;127(2):412-419.

35. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, Sanjose S, Garnett G et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. Bulletin of the World Health Organization. 2007;85(9):719-726.

36. Lawton B, Howe AS, Turner N, et al. Association of prior HPV vaccination with reduced preterm birth: A population based study. 2018;36(1):134-140.

37. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Informe técnico da ampliação da oferta das vacinas papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) – vacina HPV quadrivalente e meningocócica C (conjugada). Brasília, mar 2018.

38. Navarro C, Fonseca AJ, Sibajev A, Souza CIA, Araújo DS, Teles DAF et al. Cervical cancer screening coverage in a high-incidence region. Rev. Saúde Pública. 2015;49(1):1-8.

Tabela 1. Caracterização sociodemográfica de gestantes com resultado de exame anatomopatológico da placenta, atendidas pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017 (n=327).

Variáveis	n	%
Idade na entrada do serviço		
< 18	14	4,3
18-24	110	33,6
25-34	134	41
35 ou mais	69	21,1
Etnia		
Branca	271	82,9
Não-branca	55	16,8
NA	1	0,3
Situação conjugal		
Com companheiro	270	82,6
Sem companheiro	53	16,2
NA	4	1,2
Grau de escolaridade		
Ensino Fundamental incompleto	78	23,9
Ensino Fundamental completo	92	28,1
Ensino Médio completo	139	42,5
Ensino Superior completo	18	5,5
Hábitos de vida		
Tabagismo	35	10,7
Alcoolismo	1	0,3
Usuária de drogas	2	0,6

NA: não analisado/informado

Tabela 2. Caracterização gestacional de pacientes com resultado de exame anatomopatológico da placenta atendidas pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017. (n=327).

Variáveis	n	%
Número de gestações		
1	138	42,2
2	102	31,2
≥ 3	87	26,6
Número de abortos prévios		
0	280	85,6
1	38	11,6
≥2	9	2,7
Tipo de parto na gestação atual		
Vaginal	49	15
Cesárea	276	84,4
Aborto	2	0,6
Gemelaridade	31	9,5
Idade gestacional em semanas + dias		
< 21+6 semanas	2	0,6
22 até 36+6 semanas	206	63,0
37 até 41+6	119	36,4
> 42	0	0
Comorbidades maternas		
Pré-eclâmpsia, síndrome HELLP e eclâmpsia	66	20,2
Crescimento intra-uterino restrito (CIUR)	63	19,3
Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doença hipertensiva específica da gestação (DHEG)	57	17,4
Trabalho de parto prematuro	53	16,2
Alterações de volume do líquido amniótico	52	15,9
Hipotireoidismo	47	14,4
Ruptura prematura de membranas	36	11,0
Diabetes Mellitus (DM) e DM gestacional	33	10
Descolamento prematuro de placenta (DPP)	29	8,9
Corioamnionite	23	7,0
Infecção gestacional por Sífilis, Toxoplasmose e HPV	19	5,8
Obesidade	13	4,0
Depressão	3	0,9

NA: não analisado/informado

Tabela 3. Caracterização neonatal de gestações com resultado de exame anatomopatológico da placenta, realizados pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017. (n=327).

	Recém-nascido 1		Recém-nascido 2	
Variáveis	**n**	**%**	**n**	**%**
Desfecho gestacional				
Aborto (< 22 semanas)	2	0,6	2	6,4
Feto morto intraútero/natimorto (> 22 semanas)	17	5,2	0	0
Alojamento Conjunto	108	33,0	7	22,6
Berçário/Observação	58	17,8	6	19,3
UTI Neonatal	142	43,4	16	51,6
Peso ao nascimento (g)				
Até 999 (Extremo baixo peso)	28	9,1	3	10,3
1000 - 1499 (Muito baixo peso)	35	11,3	4	13,8
1500 - 2499 (Baixo peso)	137	44,5	14	48,3
2500-3999	104	33,8	6	20,7
> 4000 (Macrossomia)	4	1,3	0	0
NA	0	0	2	6,9
Escala APGAR 1º minuto				
0-3	41	13,2	2	6,8
4-6	55	17,9	12	41,3
>7	212	68,9	15	51,7
Escala APGAR 5º minuto				
0-3	9	2,9	1	3,4
4-6	22	7,1	1	3,4
>7	277	90	27	93,2
Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)				
Sim	14	4,5	2	6,9
Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)				
Sim	10	3,2	1	3,4

NA: não analisado/informado

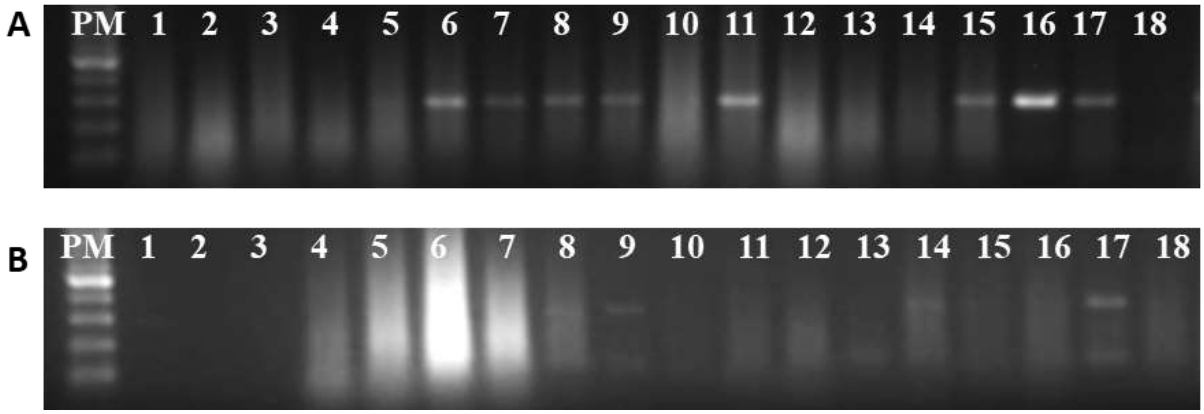


Figura 1. Gel de agarose corado com brometo de etídeo após eletroforese para separação e visualização das bandas representativas do gene da beta-globina, demonstrando extração do DNA total das amostras. **A. Amostras de parênquima placentário:** linhas 1-4; 10; 12-14: amostras negativas; linhas 6-9; 11; 15-16: amostras positivas; linha17: controle positivo; linha 18: controle negativo).

B. Amostras de membranas corioamnióticas: linhas 1; 3; 8-9; 14-16: amostras positivas; linhas: 10-13 amostras negativas; linhas 4 a 7: inconclusivas; linha17: controle positivo; linha 18: controle negativo).

(PM: peso molecular 100 pares de base (bp); tamanho esperado do produto amplificado: 268pb)

Figura 2. Gel de agarose corado com brometo de etídeo após eletroforese para separação e visualização das bandas representativas do gene do HPV amplificado pela Reação de Nested-PCR, em amostras de parênquima placentário e de membranas corioamnióticas. Linhas 1-12: amostras negativas; linha 13: controle negativo; linha 14: controle positivo).

(PM: peso molecular 100 pares de base (bp); tamanho esperado do produto amplificado: 150pb (banda a: banda remanescente da primeira reação de PCR (450bp) e banda b: banda da reação de Nested-PCR (150bp)).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após execução do projeto de pesquisa e a apresentação de resultados no artigo cientifico, foi concluído que o objetivo de determinar a positividade do DNA-HPV em tecidos placentários foi cumprido parcialmente, devido às dificuldades relacionadas a pandemia do Coronavírus, como a suspensão do calendário acadêmico, bem como pelas dificuldades impostas pelas técnicas de extração de DNA e análises PCR.

Quanto aos resultados obtidos, foram incluídos dados de 327 pacientes, relacionados as características sociodemográficas, história reprodutiva pregressa e da gestação atual, bem como caracterização neonatal, conforme resultados apresentados no artigo científico. A positividade de HPV não foi observada e, portanto, não foi possível fazer a correlação dessa variável com a prematuridade ou outras características gestacionais e novos estudos com maior amostragem devem ser realizados para melhor compreensão das características da população estudada.

A revista escolhida para nortear as normas do artigo foi a Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil. No entanto, alguns ajustes ainda devem ser realizados no artigo científico de maneira a obedecer as normas da revista, como por exemplo, o número máximo de palavras e referências.

5. APÊNDICES

APÊNDICE A – NOVA FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, GESTACIONAIS E RESULTADO DAS ANÁLISES PCR

Pesquisador Responsável: Profª. Ms. Daniela Augustin Silveira

Contatos: telefone (54) 99113-7893 – Email: danielasilveira@gmail.com

1. Número do formulário:	nform _____
Dados da parturiente	
2. Número do prontuário:	npront _____
3. Número do exame anatomopatológico:	nap A17-_____
4. Idade na entrada do serviço:	idad ____
5. Etnia: (1) Branco (2) Pardo (3) Negro (4) Não consta	etn __
6. Estado civil: (1) Casado (2) Solteiro (3) Divorciado (4) União estável (5) Não consta	estciv __
7. Grau de escolaridade: (1) Ensino Fundamental incompleto (2) Ensino Fundamental completo (3) Ensino Médio completo (4) Ensino Superior completo (5) Não consta	esc __
8. Idade gestacional em dias	idgest _____
9. Número de gestações	G__
10. Número de partos vaginais	P__
11. Número de cesáreas	C__
12. Número de abortos	A__
13. Tipo de parto (1) Vaginal (2) Cesárea	part ___
Comorbidades da mãe e informações da gestação	
14. Tabagismo (1) Sim (2) Não	tab __
15. Alcoolismo (1) Sim (2) Não	alc __
16. HAS (1) Sim (2) Não	has __
17. DHEG (1) Sim (2) Não	dheg __
18. Diabetes Mellitus (1) Sim (2) Não	dm __
19. DM Gestacional (1) Sim (2) Não	dmg __
20. Hipotireoidismo (1) Sim (2) Não	hipo __
21. Hipertireoidismo (1) Sim (2) Não	hiper __
22. Depressão (1) Sim (2) Não	dep __
23. Epilepsia (1) Sim (2) Não	epi __
24. Plaquetopenia (1) Sim (2) Não	plaq __
25. Asma (1) Sim (2) Não	asm __

26. Trombofilia	(1) Sim (2) Não	tbf __
27. Usuária de drogas	(1) Sim (2) Não	dro __
28. Obesidade	(1) Sim (2) Não	obe __
29. Câncer de colo uterino	(1) Sim (2) Não	cac __
30. HIV	(1) Sim (2) Não	hiv __
31. Sífilis na gestação, tratada	(1) Sim (2) Não	st __
32. Sífilis na gestação, inadequadamente tratada	(1) Sim (2) Não	snt __
33. Toxoplasmose na gestação, tratada	(1) Sim (2) Não	txt __
34. Toxoplasmose na gestação, inadequadamente tratada	(1) Sim (2) Não	txnt __
35. HPV	(1) Sim (2) Não	hpv __
36. Anidrâmnio	(1) Sim (2) Não	ani __
37. Oligodrâmnio	(1) Sim (2) Não	oli __
38. Polidrâmnio	(1) Sim (2) Não	poli __
39. CIUR	(1) Sim (2) Não	ciur __
40. Centralização fetal	(1) Sim (2) Não	centf __
41. Corioamnionite	(1) Sim (2) Não	corio __
42. Pré-eclâmpsia	(1) Sim (2) Não	prec __
43. HELLP	(1) Sim (2) Não	hel __
44. Eclâmpsia	(1) Sim (2) Não	ecl __
45. Alterações no US morfológico (malformações)	(1) Sim (2) Não	altus __
46. Alterações na Cardiotocografia (CTG)	(1) Sim (2) Não	ctg __
47. Aloimunização	(1) Sim (2) Não	aloi __
48. Alteração no ducto venoso	(1) Sim (2) Não	altdu __
49. Lesão placentária identificada no US	(1) Sim (2) Não	lesp __
50. Anemia fetal	(1) Sim (2) Não	ane __
51. Macrossomia fetal	(1) Sim (2) Não	mac __
52. Hidropsia fetal	(1) Sim (2) Não	hid __
53. Incompetência istmo-cervical	(1) Sim (2) Não	iic __
54. Descolamento prematuro de placenta (DPP)	(1) Sim (2) Não	dpp __
55. Ruptura Prematura de Membranas (RUPREME-PT)	(1) Sim (2) Não	rup __
56. Depósito de mecônio	(1) Sim (2) Não	mec __
57. Acretismo placentário	(1) Sim (2) Não	acr __
58. Placenta prévia ou baixa	(1) Sim (2) Não	plp __
59. Desproporção cefalopélvica (DCP)	(1) Sim (2) Não	dcp __
60. Iteratividade	(1) Sim (2) Não	ite __
61. Trabalho de parto prematuro	(1) Sim (2) Não	tpp __
62. Apresentação desfavorável	(1) Sim (2) Não	apd __
63. **Desfecho gestacional**		

(1) Aborto (< 22 semanas) (2) Feto morto intraútero/natimorto (> 22 semanas) (3) Alojamento Conjunto (4) Berçário/Observação (5) UTI Neonatal		desf __
Dados do recém-nascido		
64. Escala APGAR 1º minuto		apg1 __
65. Escala APGAR 5º minuto		apg5 __
66. Peso ao nascimento (kg)		peso _____
67. Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)	(1) Sim (2) Não	mnp __
68. Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)	(1) Sim (2) Não	mnt __
69. **Gestação gemelar**	(1) Sim (2) Não	gem __
Dados do recém-nascido 2 (Gemelar)		
70. Escala APGAR 1º minuto		2apg1 __
71. Escala APGAR 5º minuto		2apg5 __
72. Peso ao nascimento (kg)		2peso _____
73. **Desfecho gestacional do recém-nascido 2 (Gemelar)**		
(1) Aborto/< 22 semanas (2) Feto morto intraútero/natimorto/> 22 semanas (3) Alojamento Conjunto (4) Berçário/Observação (5) UTI Neonatal		2desf __
74. Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)	(1) Sim (2) Não	2mnp __
75. Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)	(1) Sim (2) Não	2mnt __
Resultado do exame anatomopatológico		
Alterações da maturação		
76. Maturação irregular	(1) Sim (2) Não	matir __
77. Imaturidade vilosa	(1) Sim (2) Não	imavil __
Alterações inflamatórias		
78. Membranas (Corioamnionite)	(1) Sim (2) Não	corioam __
79. Parênquima (Vilite)	(1) Sim (2) Não	vil __
80. Vasos umbilicais (Funisite)	(1) Sim (2) Não	fun __
Alterações circulatórias do parênquima		
81. Infartos	(1) Sim (2) Não	inf __
82. Vasculites	(1) Sim (2) Não	vas __
83. Tromboses	(1) Sim (2) Não	tro __
84. Arteriolopatia decidual	(1) Sim (2) Não	artdec __
85. Corioangioma	(1) Sim (2) Não	corang __
86. **Neoplasia**	(1) Sim (2) Nã**o**	neop __
87. **Depósito de mecônio**	(1) Sim (2) Não	meco __
88. **Cordão curto**	(1) Sim (2) Não	cordc __
89. **Malformações**	(1) Sim (2) Não	malf __
Segunda placenta (gestação gemelar)	(1) Sim (2) Não	plac2 __
Resultado do exame anatomopatológico da placenta 2		

Alterações da maturação		
90. Maturação irregular	(1) Sim (2) Não	matir __
91. Imaturidade vilosa	(1) Sim (2) Não	imavil __
Alterações inflamatórias		
92. Membranas (Corioamnionite)	(1) Sim (2) Não	corioam __
93. Parênquima (Vilite)	(1) Sim (2) Não	vil __
94. Vasos umbilicais (Funisite)	(1) Sim (2) Não	fun __
Alterações circulatórias do parênquima		
95. Infartos	(1) Sim (2) Não	inf __
96. Vasculites	(1) Sim (2) Não	vas __
97. Tromboses	(1) Sim (2) Não	tro __
98. Arteriolopatia decidual	(1) Sim (2) Não	artdec __
99. Corioangioma	(1) Sim (2) Não	corang __
100. **Neoplasia**	(1) Sim (2) Nã**o**	neop __
101. **Depósito de mecônio**	(1) Sim (2) Não	meco __
102. **Cordão curto**	(1) Sim (2) Não	cordc __
103. **Malformações**	(1) Sim (2) Não	malf __
104. Resultado da análise PCR		
(1) Positivo genótipo viral 06/11 (2) Positivo genótipo viral 16 (3) Positivo genótipo viral 18 (4) Negativo		pcr __

6. ANEXOS

ANEXO A – ACEITE DE ORIENTAÇÃO E COORIENTAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* PASSO FUNDO/RS**
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC

FORMULÁRIO DE ACEITE DE ORIENTAÇÃO E COORIENTAÇÃO

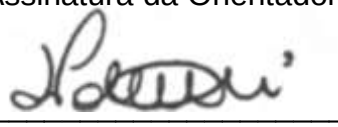
Eu, professora Daniela Augustin Silveira, aceito orientar o TCC da Acadêmica Roberta Klering, cujo tema é Pesquisa de Papiloma Vírus Humano (HPV) em tecidos placentários.

Eu, professora Jossimara Polettini, aceito co-orientar o TCC da Acadêmica Roberta Klering, cujo tema é Pesquisa de Papiloma Vírus Humano (HPV) em tecidos placentários.

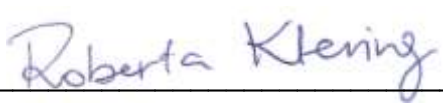
Por ser verdade, firmo o presente documento.

Passo Fundo, 30 de agosto de 2020.

Assinatura da Orientadora



Assinatura da Coorientadora



Assinatura da Acadêmica

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS
Pesquisador: Daniela Augustin Silveira
Versão: 2
CAAE: 21478519.4.0000.5564
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 121761/2019
Patrocionador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS que tem como pesquisador responsável Daniela Augustin Silveira, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS em 20/09/2019 às 11:45.

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3°
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br

ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS
Pesquisador: Daniela Augustin Silveira
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 21478519.4.0000.5564
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.704.977
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Não há impedimentos éticos no protocolo de pesquisa.
Considerações Finais a critério do CEP:
Prezado (a) Pesquisador(a)
A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.
Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento “Deveres do Pesquisador”.

Lembre-se que:
1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.

2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:
Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;
Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;
Contate a "central de suporte" da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.
Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1432044.pdf	01/11/2019 20:21:18		Aceito
Outros	NovoTermoUsodeDados.pdf	01/11/2019 20:20:16	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoAtualizado.pdf	01/11/2019 20:05:19	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	CartadePendencias.pdf	01/11/2019 19:56:23	Daniela Augustin Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NovoTCLE.pdf	01/11/2019 19:47:28	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	termodecienciainstituicaoHSVP.pdf	13/09/2019 19:46:19	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	fichadecoletadedados.pdf	13/09/2019 19:45:02	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	13/09/2019 19:36:56	Daniela Augustin Silveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 14 de Novembro de 2019

Assinado por:

Fabiane de Andrade Leite (Coordenadora)

ANEXO D – NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Normas da Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil

Artigos Originais divulgam resultados de pesquisas inéditas e devem procurar oferecer qualidade metodológica suficiente para permitir a sua reprodução. Para os artigos originais recomenda-se seguir a estrutura convencional, conforme as seguintes seções: *Introdução:* onde se apresenta a relevância do tema estudos preliminares da literatura e as hipóteses iniciais, a questão da pesquisa e sua justificativa quanto ao objetivo, que deve ser claro e breve; *Métodos:* descrevem a população estudada, os critérios de seleção inclusão e exclusão da amostra, definem as variáveis utilizadas e informam a maneira que permite a reprodutividade do estudo, em relação a procedimentos técnicos e instrumentos utilizados. Os trabalhos quantitativos devem informar a análise estatística utilizada. *Resultados:* devem ser apresentados de forma concisa, clara e objetiva, em sequência lógica e apoiados nas ilustrações como: tabelas e figuras (gráficos, desenhos, fotografias); *Discussão:* interpreta os resultados obtidos verificando a sua compatibilidade com os citados na literatura, ressaltando aspectos novos e importantes e vinculando as conclusões aos objetivos do estudo. Aceitam-se outros formatos de artigos originais, quando pertinente, de acordo com a natureza do trabalho.

Os manuscritos deverão ter no máximo 5.000 palavras, e as tabelas e figuras devem ser no máximo cinco no total; recomenda-se citar até 30 referências bibliográficas.

Notas

1. Em todos os tipos de arquivo a contagem do número de palavras exclui títulos, resumos, palavras-chave, tabelas, figuras e referências;

2. Por ocasião da submissão os autores devem informar o número de palavras do manuscrito.

3. Nos artigos de título extenso (12 ou mais termos) é exigido também apresentar o título abreviado (máximo 9 termos).

4. *Cover Letter*. No texto de encaminhamento do manuscrito para a Revista (cover letter) deve ser informado sobre a originalidade do mesmo e a razão porque foi

submetida à RBSMI. Além disso deve informar a participação de cada autor na elaboração do trabalho, o autor responsável pela troca de correspondência, as fontes e tipo de auxílio e o nome da agência financiadora.

Apresentação dos manuscritos

Os manuscritos deverão ser digitados no programa Microsoft Word for Windows, em fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo.

Estrutura do manuscrito

Identificação título do trabalho: em português ou espanhol e em inglês, nome e endereço completo dos autores e respectivas instituições (uma só por autor).

Resumos deverão ter no máximo 210 palavras e serem escritos em português ou espanhol e em inglês. Para os Artigos Originais, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão Sistemática os resumos devem ser estruturados em: *Objetivos, Métodos, Resultados, Conclusões*. Relatos de Caso/Série de Casos devem ser estruturados em: *Introdução, Descrição, Discussão*. Nos artigos de Revisão Sistemática os resumos deverão ser estruturados em: *Objetivos, Métodos* (fonte de dados, período, descritores, seleção dos estudos), *Resultados, Conclusões*. Para o Informes Técnico-Institucionais e Artigos Especiais o resumo não é estruturado.

Palavras-chave para identificar o conteúdo dos trabalhos os resumos deverão ser acompanhados de três a seis palavras-chave em português ou espanhol e em inglês, utilizando-se os Descritores em Ciências da Saúde (DECS) da Metodologia LILACS, e o seu correspondente em inglês o Medical Subject Headings (MESH) do MEDLINE, adequando os termos designados pelos autores a estes vocabulários.

Ilustrações tabelas e figuras somente em branco e preto ou em escalas de cinza (gráficos, desenhos, mapas, fotografias) deverão ser inseridas após a seção de Referências. Os gráficos deverão ser bidimensionais.

Agradecimentos à colaboração de pessoas, ao auxílio técnico e ao apoio financeiro e material, especificando a natureza do apoio, e entidade financiadora.

Citações e Referências as citações no texto devem ser numeradas em sobrescrito conforme sua ordem de aparecimento. As referências devem ser organizadas em sequência numérica correspondente às citações; não devem ultrapassar o número estipulado em cada seção de acordo com estas Instruções aos Autores. A Revista adota as normas do *International Committee of Medical Journals*

Editors - ICMJE (Grupo de Vancouver), com algumas alterações; siga o formato dos exemplos aqui especificados:

Quando autor for o mesmo da casa editora: não mencionar a casa editora:

WHO (World Health Organization). WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. Geneva; 2011.

- **Livro (Autor. Título. Edição. Local: casa editora; Ano)**

Heeringa SG, West BT, Berglund PA. Applied survey data analysis. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2017.

- **Capítulo de Livro (Autor. Título do capítulo. In: organizadores. Título do livro. Edição. Local: casa editora; Ano. Páginas inicial e final do capítulo)**

Demakakos P, McMunn A, Steptoe A. Well-being in older age: a multidimensional perspective. In: Banks J, Lessof C, Nazroo J, Rogers N, Stafford M, Steptoe A, editors. Financial circumstances, health and well-being of the older population in England. The 2008 English Longitudinal Study of Ageing (Wave 4). London: The Institute for Fiscal Studies; 2010. p. 131-93.

- E-book

Editor, Organizador, Compilador (Autor (es), editor. Título. Local: casa editora; Ano)

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington, D.C.: National Academy Press; 2001.

- Eventos no todo (Reuniões, Encontros Científicos)

(Evento; Data; Local do evento. Local: casa editora; Ano)

Anais do IX Congresso Estadual de Medicina Veterinária; 13-16 jul 1985; Santa Maria, RS. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 1985. Proceedings of the 12th International Triennial Congress of the International Ergonomics Asociation; 1994 Aug 15-19; Toronto, CA. Toronto: IEA; 1994.

- Trabalho apresentado em evento (anais publicados)

(Autor. Título do trabalho. In: evento; Data; Local do evento. Local: casa editora; Ano. Páginas inicial e final)

Jung MRT. As técnicas de marketing a serviço da Biblioteconomia. In: Anais IX Congresso Brasileiro de Biblioteconomia e Documentação; 18 - 19 maio 2005; Salvador, BA. Brasília, DF: Associação Brasileira de Bibliotecários; 2005. p. 230-9.

- Trabalho apresentado em evento (não publicados)

(Autor. Título [Evento; Data; Local do evento]

Philippi Jr A. Transporte e qualidade ambiental [Apresentação ao Seminário Riscos do Cotidiano no Espaço Urbano: desafios para a saúde pública; 1994 set 20; Rio de Janeiro, Brasil].

- Dissertações e Teses

(Autor. Título [dissertação/tese]. Local: entidade responsável; Ano.)

Pedroso M. Inteligência decisória e análise de políticas públicas: o caso das Unidades de Pronto Atendimento (UPAs) **[tese]**. Brasília: Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da Universidade de Brasília; 2011.

Jardim DMB. Pai-acompanhante e a sua compreensão sobre o processo de nascimento do filho **[dissertação]**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

Considerando que o estilo Vancouver não considera com as informações das leis brasileiras, há adaptações:

- Documentos de Natureza Governamental

Competência (país, estado, cidade). Título (especificações da legislação, número e data). Ementa. Título da publicação oficial. Local (cidade), Data (dia, mês abreviado e ano); Seção, volume, número, paginação.

Brasil. Ministério da Educação e Cultura. Secretaria da Cultura. Portaria n.º 23, de 26 de outubro de 1982. Modifica o Plano Nacional de Microfilmagem de Periódicos Brasileiros criado pela Portaria DAC n.º. 31, de 11 de dezembro de 1978. Diário Oficial da União [DOU]. Brasília, 1 dez 1982; Seção 1, v.120, n.227, p. 22438.

Brasil. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. [acesso em 10 mai 2009]. Disponível em: http//portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/LEI880.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 154, 24 de janeiro de 2008. Cria os Núcleos de Apoio à Saúde da Família (NASF). [acesso em 20 set 2009]. Disponível em: http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/ portaria154_ 24_01_08.pdf

- Artigo Publicado em Periódico

(Autor. Título. Sigla do Periódico. Ano; Volume (número): páginas inicial e final)

El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. Int J Women Health. 2017; 9: 331-45.

- Artigo Publicado em Número Suplementar

(Autor. Título. Sigla do Periódico. Ano; Volume (número suplemento): páginas inicial e final)

Lothian JA. The coalition for improving maternity services evidence basis for the ten steps of mother-friendly care. J Perinat Educ. 2007; 16 (Suppl.): S1-S4.

- Citação de Editorial, Cartas

(Autor. Título [Editorial/Carta]. Sigla do Periódico. Ano; Volume (número): páginas inicial e final)

Cabral-Filho JE. Pobreza e desenvolvimento humano: resposta das revistas científicas ao desafio do Council of Science Editors [editorial]. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2007; 7 (4): 345-6.

Fernandes EC, Ferreira ALCG, Marinho TMS. Das ações às palavras [Carta]. Rev Bras Saúde Mater Infant. 2009; 9 (1): 95-6.

- Artigo Publicado em periódico eletrônico

(Autor. Título. Sigla do Periódico [internet]. Ano [data de acesso]; Volume (número): páginas inicial e final. Site disponível)

Neuman NA. Multimistura de farelos não combate a anemia. J Pastoral Criança [periódico *on line].* 2005 [acesso em 26 jun 2006]. 104: 14p. Disponível em: www.pastoraldacriança.org.br/105/pag14/pdf.

Najim RA, Al-Waiz MM, Al-Razzuqi RA. Acetylator phenotype in Iraqui patients with atopic dermatitis. Dermatol Online J [Internet]. 2006 [cited 2007 Jan 9]; 12 (7). Available from: http://dermatology. cdlib.org/127/original/acetylator/najim.html

National Osteoporosis Foundation of South Africa. Use of generic alendronate in the treatment of osteoporosis. S Afr Med J [Internet]. 2006 [cited 2007 Jan 9]; 96 (8): 696-7. Available from: http://blues.sabinet.co.za/WebZ/Authorize?essionid=0:autho=pubmed:password=pubmed2004&/AdvancedQuery?&format=F&next=images/ejour/m_samj/ m_samj_v96_ n8_a12.pdf

- Artigo aceito para publicação em periódico (Autor. Título. Sigla do Periódico. Ano. (*No prelo*).

Quinino LRM, Samico IC, Barbosa CS. Análise da implantação do Programa de Controle da Esquistossomose em dois municípios da zona da mata de Pernambuco, Brasil. Cad Saúde Coletiva (Rio J.). 2010. (*No prelo*).

- Materiais eletrônicos disponíveis em CD-Rom (Autor. Título [tipo de material]. Editor, Edição. Versão. Local: Editora; Ano.)

Reeves JRT, Maibach H. CDI, clinical dermatology illustred [monografia em CD-ROM]. Multimedia Group, producers. 2 ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

- Material de acesso exclusivo em meio eletrônico

- **Homepage**

Autoria. Título. [suporte]. Local; Ano [acesso dia mês ano].

Disponibilidade de acesso

Instituto Oswaldo Cruz. Departamento de Ensino. IOC ensino [*online*]. Rio de Janeiro, Brasil; 2004. [acesso 3 mar 2004]. Disponível em: http://157.86.113.12/ensino/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/html

Para outras informações consulte o site ICMJE: *https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html*