



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) 16 NO CÂNCER DE COLO DO UTERO E
SEU IMPACTO NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA**

Fábio Vidal de Figueiredo

**São Luís
2019**

FÁBIO VIDAL DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) 16 NO CÂNCER DE COLO DO UTERO E
SEU IMPACTO NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Saúde do Adulto e da Criança, como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto

Área de Concentração:

Processos Biológicos em Saúde.

Linha de Pesquisa: HPV e Câncer; Doenças Infecciosas e Endêmicas no Maranhão.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista.

Coordenadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

**São Luís
2019**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Vidal de Figueiredo, Fabio.

AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO HPV 16
NO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO E SEU IMPACTO NA RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA / Fabio Vidal
de Figueiredo. - 2019.

155 p.

Coorientador(a): Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria do Desterro Soares
Brandão Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
SÃO LUIS, 2019.

1. CANCER DE COLO DO ÚTERO. 2. PAPILOMA VÍRUS HUMANO.
3. QUIMIOTERAPIA. 4. RADIOTERAPIA. 5. SEGUIMENTO. I.
da Silva Batista, Profa. Dra. Zulmira. II. Soares Brandão
Nascimento, Profa. Dra. Maria do Desterro. III. Título.

FÁBIO VIDAL DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) 16 NO CÂNCER DE COLO DO UTERO E
SEU IMPACTO NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
RADIOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança, como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em 15/01/2019.

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. José Eduardo Batista - Suplente
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Edilson e Edinah, pela orientação e apoio constantes.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento por acreditar em meu potencial; sua dedicação, disponibilidade e incentivo foram fundamentais nessa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pelo apoio e infraestrutura oferecidos.

A todos professores do PPGSAD, pelo grande comprometimento com o ensino e pesquisa; cada disciplina contribuiu com um novo olhar para a pesquisa.

A todos os professores e funcionários do Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão da UFMA. Em especial a Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista, pelo auxílio na interpretação da árvore filogenética das variantes do HPV 16.

Ao Centro de Estudos Superiores (CESC) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pelo auxílio no sequenciamento das amostras de HPV.

Ao Instituto Nacional do Câncer (INCA), na pessoa do Prof. Dr. Miguel Ângelo Moreira, do Departamento de Genética, pela contribuição e análise do sequenciamento e variantes para composição da árvore filogenética do Papilomavírus Humano 16.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo fomento concedido à pesquisa.

Agradecimento ao Hospital do Câncer Aldenora Bello e ao Hospital do Câncer Tarquínio Lopes Filho pela permissão do levantamento de dados em suas dependências.

Aos funcionários da Secretaria do PPGSAD, José Valente, Emanuel e Sr. Domingos pela presteza e atenção durante todo o período de realização do mestrado.

Agradecimento especial aos colegas de mestrado Rodrigo Lopes da Silva e Gerusinete Bastos; seguir seus passos ajudou nessa trajetória.

Aos bolsistas da Iniciação Científica Liwerbeth dos Anjos Pereira e Lailson Oliveira de Castro, pela ajuda na coleta de dados.

Às pacientes registradas na investigação científica, por aceitarem participar da pesquisa e acreditarem que a mesma contribuiria para um melhor tratamento no futuro.

A Rafael Ricarte, pelo incentivo constante e auxílio na parte gráfica.

A Conceição Castello Branco, pela revisão final do texto.

A todos os colegas da Turma 14 do PPGSAD, pela troca de experiências, pelos momentos de convivência e incentivos mútuos. Com vocês foi mais fácil e divertido.

Dedico este trabalho a todas pacientes pela
colaboração para que essa pesquisa fosse
realizada.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

O câncer de colo do útero ocupa a quarta posição em incidência e mortalidade entre as mulheres com 569.847 novos casos (6,6%) e 311.365 óbitos (7,5%). Sua incidência está relacionada ao índice de Desenvolvimento Humano (IDH), embora sua frequência esteja diminuindo nos países desenvolvidos, observamos um aumento de novos casos em regiões menos desenvolvidas, onde ocorrem 80% dos casos. A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) de alto risco é a principal causa do câncer cervical. O HPV 16 é responsável por metade dos casos de câncer de colo do útero. Vários estudos sugeriram que a variabilidade genética entre as variantes do HPV 16 poderia influenciar o potencial de infecção, a persistência viral e o risco de desenvolvimento do câncer invasivo do colo do útero. Foi feita a hipótese que este polimorfismo filogenético dos nucleotídeos entre as linhagens e sublinhagens do HPV 16 poderia fornecer uma diferença na resposta ao tratamento do câncer cervical com radioterapia e quimioterapia. Este estudo teve como objetivo estimar a frequência de linhagens do HPV 16 em amostras de câncer de colo de útero, relacionar os fatores patológicos nessas variantes e avaliar ao tratamento com radioterapia e quimioterapia. A população do estudo consistiu de mulheres encaminhadas aos hospitais de referência para o tratamento de câncer em São Luís-MA, responderam questionários sociodemográficos e foram coletadas amostras de câncer de colo do útero para testar a presença do DNA dos tipos e variantes do vírus do papiloma humano. As mulheres com linhagem do HPV 16 tratadas com quimioterapia e radioterapia foram avaliadas após 3 meses para determinar a resposta ao tratamento. O protocolo padrão do serviço consistiu de quimioterapia à base de cisplatina na dose de 40mg/m² mais irradiação pélvica convencional na dose de 45-50,4 Gy e Braquiterapia de alta taxa de dose de 28-30 Gy prescritos no Ponto A. O DNA do HPV foi detectado em 104 (88,1%) das pacientes. A presença do HPV 16 foi positiva em 63 mulheres (53%). As linhagens do HPV 16 foram identificadas em 57 pacientes, sendo: 33 da linhagem A (57,8%), 2 da linhagem B (3,5%), 2 da linhagem C (3,5%) e 20 da linhagem D (35,0%). A média de idade dessas pacientes foi de 48,4 anos (faixa de 25 a 85 anos). O carcinoma de células escamosas foi detectado em 48 amostras (84,2%). O adenocarcinoma foi mais frequente na linhagem D, onde foram registradas 3 dos 4 casos de adenocarcinoma. Um total de 11 pacientes com a variante do HPV 16 foi tratada com radioterapia e quimioterapia. Após três meses, observou-se que 9 dos 11 pacientes (81,8%) obtiveram resposta completa: sendo cinco da linhagem A, dois da linhagem C e dois da linhagem D. Os casos de resposta parcial e progressão de doença, um cada, ocorreram na linhagem A. Não foi possível estabelecer uma associação entre linhagens do HPV 1 e resposta local à quimioterapia e radioterapia devido o pequeno número de pacientes e distribuição irregular de linhagens, embora os dois casos de persistência tumoral tenham ocorrido em pacientes portadores da linhagem A.

Palavras-chaves: Câncer de colo do útero; Papilomavírus humano; HPV-16; Radioterapia; Recorrência.

ABSTRACT

Cervical cancer occupies the fourth position in incidence and mortality among women, with 569.847 new cases (6.6%) and 311.365 deaths (7.5%). Its incidence relates to Human Development Index (HDI), although its frequency is declining in developed countries, we observe a burden of new cases in regions less developed, where occur 80% of cases. High-risk human papillomavirus (HPV) infection are the main cause of cervical cancer. The HPV 16 is responsible for half of the cases of cervical cancer. Several studies suggested that this genetic variability between the HPV16 variants could influence the potential for infection, viral persistence and development of invasive cervical cancer. It was hypothesized that this phylogenetic single-nucleotide polymorphism among HPV 16 lineages and sublineages could provide difference in the response to cervical cancer treatment with radiotherapy and chemotherapy depending of the detected HPV variant. This study aimed to estimate the frequency of Human papilloma virus (HPV) 16 lineages in specimens of cervical cancer, relate the pathological factors in those variants and assess the response to treatment with radical chemoradiotherapy. The population consisted of women forwarded to reference cancer hospital in São Luis-MA, answered sociodemographic data and samples of cervical cancer were collected hospital to test the presence of Human papilloma virus types DNA and variants. The women with HPV -16 lineage treated with chemoradiotherapy, were evaluated after three months to assess response to treatment. The standard protocol of the service consisted of cisplatin based chemotherapy 40 mg/m² plus conventional pelvic irradiation in the dose of 45-50.4 Gy and high dose rate brachytherapy of 28-30 Gy to Point A. HPV DNA was detected in 104 (88.1%) of the 118 patients. HPV-16 present in 63 patients (53%). Lineages of HPV 16 identified in 57 patients being: 33 (57.8%) lineage A, 2 lineage B (3.5%), 2 lineage C (3.5%) and 20 (35.0%) lineage D. The median age of the patients was 48.4 years (range 25-85 years). Squamous cell carcinoma was detected 48 times (84.2%). Adenocarcinoma were more likely to occur in lineage D, as three of the four cases occurred in this lineage. A total of 11 patients with HPV-16 variant were treated with chemoradiotherapy. After three months, was observed that nine of the eleven patients (81.8%) achieved complete response: five of the lineage A, two of the lineage C and two of the lineage D. The cases of partial response and progression of disease, one each, occurred in the lineage A. We could not establish a association between HPV-16 lineages and local response to chemoradiotherapy due to small number of patients and irregular distribution of lineages, although the two cases of tumor persistence occurred in patients with lineage D.

Keywords: Cervical cancer; Human papillomavirus; HPV-16, Radiotherapy; Recurrence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação das taxas brutas de incidência de câncer por 100.000 mulheres. (Fonte: Adaptado de Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil, INCA, 2017) ...	22
Tabela 2: Estadiamento de acordo com grupos prognósticos (Fonte: Adaptado de INCA, 2018).....	45
Tabela 3: Dados Sociodemográficos das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, parte 1, (n = 118)	64
Tabela 4: Dados Sociodemográficos das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, parte 2, (n = 118)	65
Tabela 5: Distribuição segundo IDH do Municípios de origem das pacientes com câncer de colo do útero, Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	66
Tabela 6: História reprodutiva e conhecimento sobre preventivo das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	68
Tabela 7: Prática do exame preventivo das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	69
Tabela 8: Fatores patológicos avaliados nas pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	70
Tabela 9: Estadiamento clínico e tratamento realizado nas pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	71
Tabela 10: Frequência dos tipos de HPV de acordo com o tipo histológico do câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	72
Tabela 11: Frequência dos tipos de HPV de acordo com o grau histológico e estadiamento clínico do câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).....	73
Tabela 12: Fatores patológicos e linhagens do HPV 16 nas pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 57).....	75

Tabela 13: Toxicidade ao tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia, em pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 24).....	76
--	----

Tabela 14: Avaliação de resposta ao tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia, em pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 24).....	77
---	----

Tabela 15: Avaliação de resposta ao tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia, em pacientes com câncer de colo do útero e portadoras de variantes do HPV 16, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 11).....	78
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência e mortalidade mundial dos principais tipos de câncer em mulheres para 2018 (Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018).....	8
Figura 2: Taxas de incidência e mortalidade de câncer ajustadas por idade entre mulheres em países de IDH muito alto/alto e países de IDH médio/baixo. (Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018).....	19
Figura 3: Taxas de incidência e mortalidade ajustadas por idade do câncer de colo de útero (Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018).....	20
Figura 4: Incidência de casos novos de câncer, exceto pele não melanoma, estimados para 2018-2019. (Fonte: Adaptado de Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil, INCA, 2017).....	21
Figura 5: Estrutura genômica da cápside do HPV à microscopia eletrônica (esquerda). Diagrama esquemático representando o arranjo das 360 proteínas da cápside, em disposição icosaédrica, formando 72 capsômeros (centro). Microscopia eletrônica de vírions do HPV1, a barra representa 100 nm (direita). (Fonte: ICVT, 2018).....	25
Figura 6: Estrutura genômica do HPV 16. A região regulatória (URR) em cinza. Os genes precoces (early) em setas contínuas, responsáveis pelas sínteses das proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os genes tardios (late) em setas tracejadas, que codificam as proteínas estruturais L1 e L2. (Fonte: Burk, 2010).....	26
Figura 7: Distribuição de frequência de porcentagens de identidade pareada da comparação de sequência nucleotídica de L1 de 118 tipos de papilomavírus (Fonte: de Villiers, 2004).....	28
Figura 8: Árvore filogenética contendo a sequência de 118 tipos de papilomavírus. Os semicírculos externos identificam o gênero. O número do semicírculo interno identifica a espécie. Os números se referem ao tipo de HPV. A outra sequência de letras se refere aos tipos de papilomavírus animais. (Fonte: de Villiers, 2004).....	29
Figura 9: Árvore filogenética contendo a sequência de 170 tipos de papilomavírus humanos, baseados na análise da sequência de L1. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies. (Fonte: de Villiers et al. 2013).....	30
Figura 10: Árvore filogenética do HPV, segundo gêneros, espécies e tipos de acordo com seu tropismo e potencial oncogênico. (Fonte: Crow, 2012).....	31
Figura 11: Prevalência dos tipos de HPV mais frequentes em mulheres, com citologia normal. (Fonte: de Sanjose, 2007).....	33
Figura 12: Progressão das lesões cervicais e prevalência dos tipos de HPV. (Fonte: Crow, 2012).....	34

Figura 13: Organização do ciclo celular viral. Diferentes camadas do epitélio e os estágios do ciclo de vida do HPV (esquerda). A cronologia da expressão de proteínas virais (direita). (Fonte: ICVT 2018).....	36
Figura 14: Esquema de infecção pelo HPV, mostrando a expressão diferencial dos diferentes genes virais nas diferentes camadas do epitélio (Fonte: Frazer, 2004).....	37
Figura 15: Risco de persistência de infecção pelo HPV e progressão. Esquerda: Proporção de infecções por HPV que são resolvidas, persistem ou progridem para NIC III, nos 3 primeiros anos após sua detecção. Direita: Proporção de NIC III não tratadas que progridem pra câncer num período de 30 anos. (Fonte: Schiffman, 2011).....	38
Figura 16: Relação entre 48 das variantes genômicas do HPV 16, divididas em 5 ramos, identificadas em 301 amostras de 25 grupos étnicos e localizações geográficas. (Fonte: Ho, 1993).....	40
Figura 17: Classificação genômica para as linhagens e sublinhagens variantes. (Fonte Burk, 2013).....	41
Figura 18: Estadiamento do câncer de colo do útero, sistemas FIGO e TNM (Fonte: Adaptado de AJCCC Cancer Staging Manual Eight edition, 2017).....	43
Figura 19: Sobrevida em 5 anos, de acordo com estadiamento clínico em portadoras de câncer cervical (Fonte: AJCC, 7th edition).....	46
Figura 20: Mapa com os municípios de origem da população em estudo e IDH.....	67
Figura 21: Prevalência dos tipos de HPV encontrados na população estudada (n = 118).	71
Figura 22: Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a faixa etária (n = 118).....	72
Figura 23: Árvore filogenética com identificação das linhagens do HPV 16.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CACON	Centro de Alta Complexidade Oncológica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
GenBank	Banco de dados mundial de Nucleotídeos
Gy	Gray (unidade de dose de radiação absorvida)
HDR	<i>High Dose Rate</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus humano)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICRU	<i>International Commission on Radiation Units</i>
ICVT	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IVL	Invasão vascular linfática
JEC	Junção escamo-colunar
LCR	<i>Long control region</i>
nm	Nanômetro
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da Polimerase)
pRb	Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleico
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Classificação de tumores malignos
UNACON	Unidade de Alta Complexidade em Oncologia
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 Epidemiologia do Câncer de Colo do Útero.....	18
2.2 Fatores de risco para o Câncer de Colo de Útero.....	22
2.3 Histórico do HPV e Câncer de Colo do Útero.....	23
2.4 Estrutura genômica do HPV.....	25
2.5 Taxonomia viral.....	27
2.6 Classificação do papilomavírus humano.....	30
2.7 Prevalência dos tipos virais em lesões e câncer cervical.....	32
2.8 Ciclo biológico do HPV e carcinogênese.....	34
2.9 Variações intratipo do HPV.....	38
2.10 Aspectos histológicos do Câncer de Colo do Útero.....	42
2.11 Estadiamento do Câncer de Colo do Útero e sobrevida.....	43
2.12 Fatores prognósticos do Câncer de Colo do Útero e risco de recorrência.....	47
2.13 Tratamento do Câncer de Colo do Útero por estágio clínico.....	48
2.14 Cirurgia no Câncer de Colo do Útero.....	50
2.15 Quimioterapia e Radioterapia no Câncer de Colo do Útero.....	51
2.16 Seguimento após tratamento primário do Câncer de Colo do Útero.....	53
2.17 Tratamento da recidiva após tratamento primário.....	54
3 JUSTIFICATIVA.....	55
4 OBJETIVOS.....	56
4.1 Objetivo Geral.....	56
4.2 Objetivos Específicos.....	56
5 METODOLOGIA.....	57

5.1 População do estudo.....	57
5.2 Coleta de dados epidemiológicos.....	57
5.3 Critérios de inclusão.....	58
5.4 Critérios de exclusão.....	58
5.5 Cálculo da amostra.....	58
5.6 Coleta das amostras.....	59
5.7 Extração e quantificação do DNA.....	60
5.8 PCR Nested.....	60
5.9 Visualização dos produtos amplificados.....	61
5.10 Purificação do produto da PCR.....	61
5.11 Sequenciamento automático.....	61
5.12 Identificação das variantes do HPV 16.....	62
5.13 Seguimento pós-tratamento oncológico.....	62
5.14 Análise estatística.....	63
5.15 Aspectos éticos.....	63
 6 RESULTADOS.....	 64
6.1 Dados sociodemográficos.....	64
6.2 Análise dos tipos de HPV.....	71
6.3 Análise das variantes do HPV 16.....	73
6.4 Tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia.....	76
6.5 Avaliação de resposta ao tratamento nas linhagens do HPV 16.....	77
 7 DISCUSSÃO.....	 79
 8 CONCLUSÃO.....	 87
 REFERÊNCIAS.....	 88

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	103
ANEXO B - Questionário Sociodemográfico.....	106
ANEXO C – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	117
APÊNDICE A – Questionário Clínico.....	127
APÊNDICE B – Recibo de artigo submetido como primeiro autor em periódico, indexado com índice de impacto B1 da área de Medicina II da CAPES.....	126
APÊNDICE C – Artigo submetido – “Impact of HPV16 lineages infection on response to radio-chemotherapy in cervical câncer”.....	129
APÊNDICE D – Artigo submetido como primeiro autor em periódico, indexado com índice de impacto A2 da área de Medicina II da CAPES – “Prognostic significance of Human Papillomavirus genotype undetected in cervical cancer: an overview of evidence”.....	141

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico para um conjunto de doenças com duas características básicas: o crescimento celular descontrolado e a capacidade de se espalhar para outros tecidos, invasão esta, que pode ser local ou à distância (metástase). A maior parte dos cânceres pode ser curada por: cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia; especialmente se forem detectados precocemente (Desforges, 1978). Muitos tipos de câncer podem ser evitados, através da diminuição da exposição a fatores de risco como: tabagismo, etilismo e alguns tipos de vírus (Schottenfeld *et al.*, 2013).

Fatores como envelhecimento da população, mudanças nos fatores de risco e desenvolvimento socioeconômico estão associados com o aumento na incidência e mortalidade do câncer. Mundialmente espera-se que o câncer seja a principal causa de morte e isoladamente seja a principal barreira que impeça o aumento da expectativa de vida no século XXI. Para 2018 estimam-se 17 milhões de novos casos (excluindo tumores de pele não melanoma) e um total de 9,5 milhões de mortes. Apresenta incidência crescente, estima-se em 29,5 milhões de casos novos para 2040. Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda (Bray *et al.*, 2018). O tabagismo é o fator de risco mais importante para o câncer, sendo responsável por aproximadamente 22% das mortes por câncer. (Collaborators, 2016). Infecções causadas pelo vírus são responsáveis por até 25% dos casos de câncer em países de baixa e média renda. (Plummer *et al.*, 2016).

O câncer de colo do útero, também chamado de câncer cervical, apresenta uma incidência variável e relacionada com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Entre as mulheres, mundialmente é o quarto câncer mais incidente, com 527.459 novos casos em 2012 (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, o câncer cervical é o terceiro mais frequente entre as mulheres, com 16.370 novos casos em 2018. No Maranhão, o câncer de colo de útero é o tumor mais frequente entre as mulheres, sendo esperados 1.090 novos casos para 2018 (INCA, 2017).

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a principal causa do câncer de colo do útero, sendo sua presença considerada necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento deste tipo de câncer (Bosch *et al.*, 1995). Existem vários tipos de HPV; dentre os tipos de HPV de alto potencial oncogênico, destaca-se o HPV 16, o qual é responsável por metade dos casos de câncer cervical (American College Of Gynecologists, 2002).

Além da classificação do HPV em tipos, estes ainda podem ser subdivididos em variantes. As variantes do HPV são definidas através da diferença em até 2,0% do material genético de um mesmo tipo de HPV (Burk *et al.*, 2013). O estudo das variantes está concentrado principalmente sobre as variantes do HPV 16, o tipo mais prevalente, seja em citologia normal ou em neoplasias cervicais (Gheit *et al.*, 2011). O interesse no estudo das variantes do HPV está baseado no fato das variantes apresentarem diferentes potenciais de infecção, de persistência viral e de desenvolvimento de lesão precursoras, podendo provocar alterações no desenvolvimento do câncer (Villa *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2006).

As variantes do HPV 16 podem ser divididas em grupos: europeu (linhagem A) e não europeu (linhagens B, C, D). As linhagens não europeias são apontadas como sendo mais patogênicas que as do grupo europeu (Sichero *et al.*, 2007; Burk *et al.*, 2009). Foi feita a hipótese que essa variabilidade genética entre as variantes do HPV 16 poderiam proporcionar variação na resposta ao tratamento oncológico com Radioterapia e Quimioterapia (Hang *et al.*, 2014). Este estudo se propõe a reportar a detecção de variantes do HPV 16 em pacientes com câncer cervical e a sua resposta ao tratamento oncológico com Radioterapia e Quimioterapia.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Epidemiologia do Câncer de Colo do Útero

O número de casos de câncer tem aumentado progressivamente. Em 1975, observou-se 2,9 milhões de novos casos de câncer (excluindo tumores de pele não melanoma) entre as mulheres. O câncer cervical, em 1975, com 15,8% foi o segundo tumor mais frequente entre as mulheres, com 459.000 novos casos (Parkin *et al.*, 1984). Em 2012, o número total de câncer entre as mulheres aumentou para 6,5 milhões de novos casos. O câncer de colo de útero compareceu com 527.459 novos casos, correspondentes a 7,9%, sendo o quarto tumor mais frequente entre as mulheres (Ferlay *et al.*, 2015).

Para 2018, estima-se em 8,6 milhões de novos casos de câncer entre as mulheres e 4,2 milhões de mortes. O câncer de mama é o mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer. Os próximos na incidência são o câncer colorretal e o câncer de pulmão, os quais apresentam posições inversas no tocante à mortalidade. O câncer de colo de útero ocupa a quarta posição, tanto em incidência quanto em mortalidade (Figura 1).

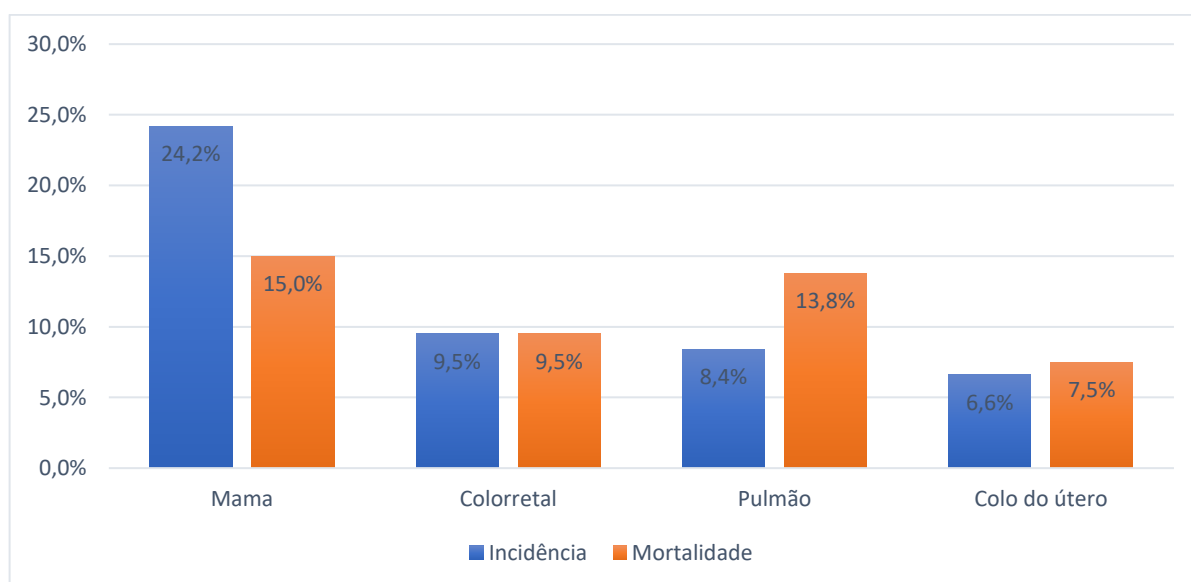


Figura 1: Incidência e mortalidade mundial dos principais tipos de câncer em mulheres para 2018 (Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018).

O câncer cervical comparece com 569.847 novos casos (6,6%) e 311.365 mortes (7,5%), registrados em mulheres, em 2018. Estima-se um aumento na quantidade de casos novos de câncer de colo do útero nos próximos anos. Espera-se para 2020 (609.270 novos casos); 2025 (659.010 novos casos); 2030 (710.249 novos casos); 2035 (756.273 novos casos); 2040 (776.657 novos casos) (Bray *et al.*, 2018). Os países de IDH médio e baixo (49,7% da população mundial) são responsáveis por 63,6% da incidência e de 74,5% da mortalidade dos casos de câncer de colo do útero, sugerindo uma associação com o nível socioeconômico (Figura 2).

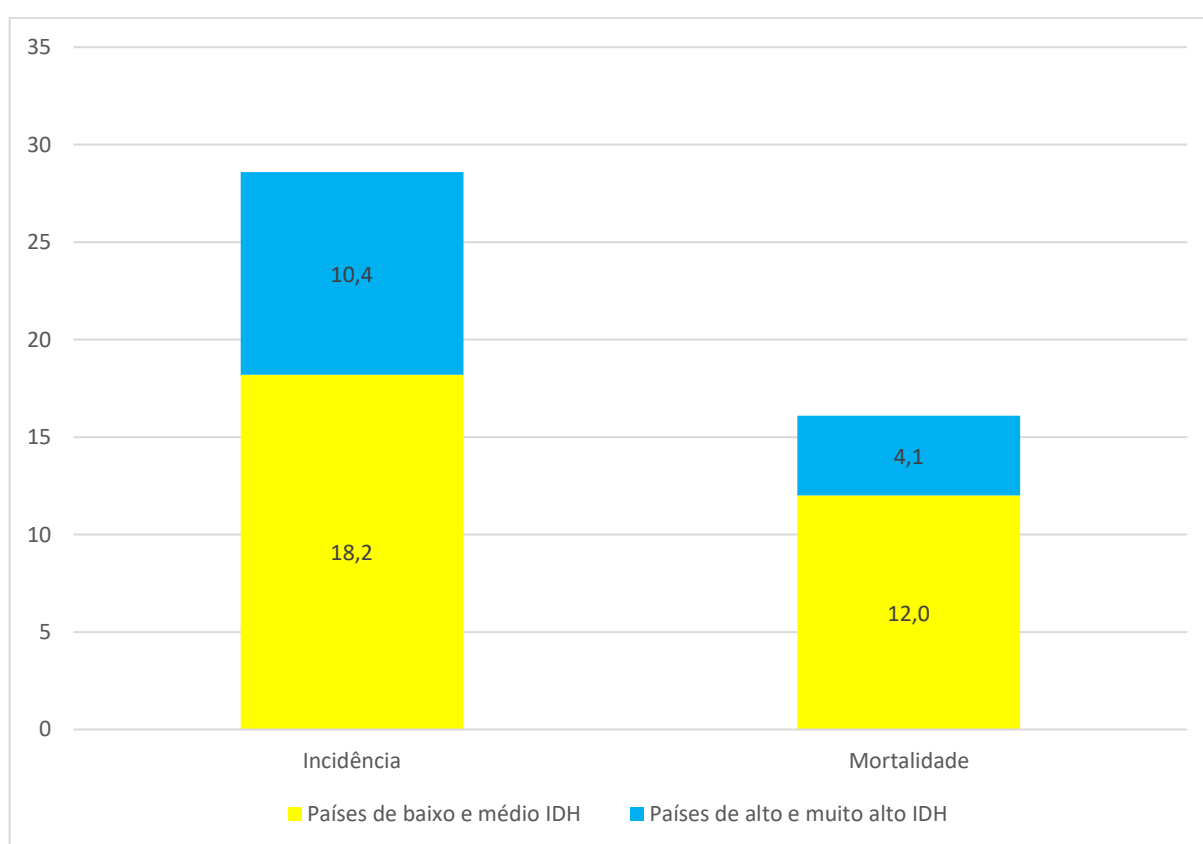


Figura 2: Taxas de incidência e mortalidade do câncer de colo do útero, ajustadas por idade para cada 100.000 mulheres, em países de IDH muito alto/alto e países de IDH médio/baixo. (Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018).

O câncer de colo do útero apresenta uma situação paradoxal em sua incidência, enquanto o total de novos casos vem aumentando, o seu percentual entre a totalidade dos cânceres tem diminuído. Nas últimas décadas as taxas de incidência e mortalidade pelo câncer cervical tem se mostrado em declínio em várias partes do mundo. O aumento dos níveis socioeconômicos tem contribuído para uma melhor cobertura de exames preventivos, diminuição da paridade,

diminuição de doenças sexualmente transmissíveis, resultando na diminuição no risco de infecção persistente por tipos de HPV de alto risco (Franceschi, 2005).

Apresenta uma taxa de incidência mundial correspondente a 14,3/100.000 mulheres, com uma alta variação entre os países. As regiões com maiores índices ($> 25/100.000$ mulheres) incluem o sul da África (43,1/100.000), África oriental (40,1/100.000), África ocidental (29,6/100.000) e Melanésia (27,7/100.000). As taxas mais baixas são observadas na América do Norte (6,8/100.000), Austrália e Nova Zelândia (6,0/100.000), e Ásia ocidental (4,1/100.000) (Figura 3).

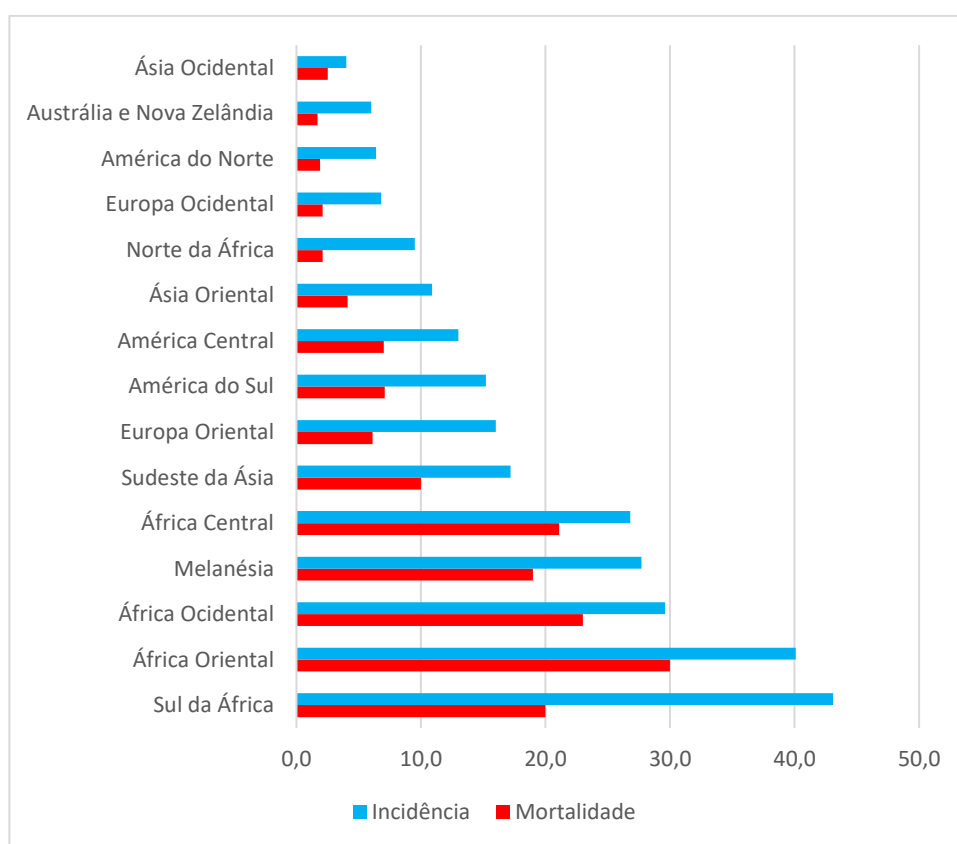


Figura 3: Taxas de incidência e mortalidade ajustadas por idade do câncer de colo de útero (Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018).

Em 2018 foram projetadas um total de 4,2 milhões de mortes por câncer em mulheres, o câncer cervical contribui com 7,5% (311.365 mortes). As regiões de médio e baixo IDH contribuem com a maior parte dessas mortes (63,6%). As taxas de mortalidade variam de menos de 2,5/100.000, observadas na Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia, até taxas superiores a 20/100.000, observadas na África Central (21,1), África ocidental (23,0) e África oriental (30,0) (Bray *et al.*, 2018).

No Brasil, para o ano de 2018, estima-se que os tipos de câncer mais incidentes em mulheres (excluindo o tumor de pele não melanoma) sejam: em primeiro lugar, o câncer de mama (29,5%), com 59.700 novos casos, seguido do câncer colorretal (9,4%), com 18.980 novos casos, e na terceira posição, o câncer de colo de útero (8,1%), com 16.370 novos casos. (Figura 4). Estima-se um aumento dos casos de câncer de colo de útero no Brasil (22.211 casos novos em 2020), (24.674 casos novos em 2025), (27.099 casos novos em 2030). (INCA, 2017).

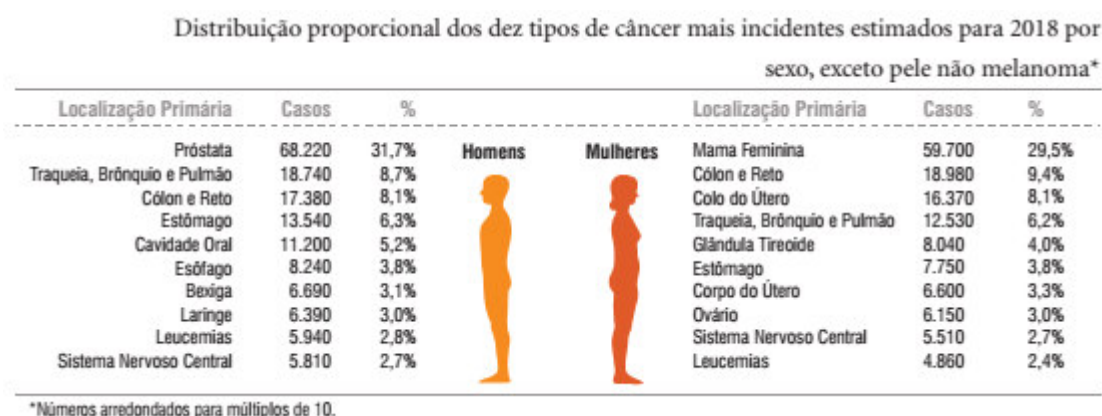


Figura 4: Incidência de casos novos de câncer, exceto pele não melanoma, estimados para 2018-2019. (Fonte: Adaptado de Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil, INCA, 2017).

Observa-se uma grande variabilidade na incidência de câncer de colo do útero entre as regiões do Brasil. Descontando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo uterino, ocupa a quarta posição na região sul (14,0/100.000) e na região sudeste (9,9/100.000), ocupa a segunda posição na região centro oeste (18,3/100.000) e na região nordeste (20,4/100.000), e é o tumor mais frequente na região norte (25,6/100.000). Enquanto as menores taxas de incidência de câncer de colo do útero são observadas nos estados de Minas Gerais (8,37/100.000) e São Paulo (8,43/100.000); as maiores taxas de incidência ocorrem nos estados do Maranhão (30,5/100.000) e Amazonas (40,9). (Tabela 1).

Tabela 1: Representação das taxas brutas de incidência de câncer por 100.000 mulheres. (Fonte: Adaptado de Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil, INCA, 2017).

	Brasil	Região Sudeste	Região Sul	Região Centro-Oeste	Região Nordeste	Região Norte
1º	Mama 56,3	Mama 69,5	Mama 73	Mama 51,9	Mama 40,3	Colo útero 25,6
2º	Colorretal 17,9	Colorretal 23,8	Colorretal 22,9	Colo útero 18,3	Colo útero 20,4	Mama 19,2
3º	Colo útero 15,4	Pulmão 12,7	Pulmão 20,5	Colorretal 17,9	Colorretal 9,5	Colorretal 7,3
4º	Pulmão 11,8	Colo útero 9,9	Colo útero 14,0	Pulmão 11,5	Pulmão 7,8	Pulmão 5,8

A variação na distribuição do câncer cervical nas regiões brasileiras pode ser explicada pela grande extensão territorial do país e pelas desigualdades sociais entre as diferentes regiões. Taxas reduzidas de incidência e mortalidade são encontradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste, onde as mulheres são essencialmente urbanas e possuem melhor acesso a serviços de saúde de qualidade. As regiões Norte e Nordeste apresentam os menores índices de desenvolvimento humano (IDH) do país, com condições socioeconômicas precárias e reduzido acesso da população aos serviços de saúde (Vale *et al.*, 2016). No Maranhão, o câncer de colo de útero é a neoplasia mais frequente entre as mulheres, sendo estimados para 2018, 1.090 novos casos, 28,6 % do total das neoplasias entre as mulheres (INCA 2017).

2.2 Fatores de risco para o Câncer de Colo de Útero

A infecção persistente pelo HPV está diretamente relacionada com o surgimento de lesões pré-malignas e o desenvolvimento do câncer cervical. É uma condição necessária, mas não suficiente, sendo necessária a associação com outros fatores para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intraepiteliais (Walboomers *et al.*, 1999). Cerca de doze tipos de HPV são classificados como de alto risco oncogênico. Os subtipos 16 e 18 são encontrados em 70% dos cânceres de colo uterino (American College Of e Gynecologists, 2002). Devido à alta prevalência de HPV na população feminina em geral e relativamente baixa taxa de câncer cervical, fatores ambientais e genéticos poderiam influenciar a progressão de infecção para câncer.

Estudos tem demonstrado uma associação entre o tabagismo e o risco de desenvolvimento de câncer cervical. Mulheres fumantes e ex-fumantes, infectadas pelo HPV, tem risco aumentado em duas a três vezes para desenvolver lesão intraepitelial de alto grau ou câncer invasivo. O fumo passivo também está associado com risco aumentado, mas em menor grau (Trimble *et al.*, 2005).

O uso de anticoncepcionais hormonais, mais comumente formulações orais com associação de estrogênio e progesterona, está associado com o desenvolvimento de lesões pré-invasivas e câncer cervical invasor. O risco aumenta significativamente quando a duração é superior a cinco anos. Aumenta em até quatro vezes o risco de câncer cervical naquelas mulheres positivas para HPV, comparadas com as mulheres positivas para HPV, mas que nunca usaram anticoncepcional (Munoz *et al.*, 2002).

A precocidade do início da atividade sexual (antes dos 20 anos de idade) e multiplicidade de parceiros sexuais (mais de seis parceiros) promovem aumento significativo do risco para o desenvolvimento de câncer cervical. A multiparidade também aumenta o risco de desenvolver o câncer de colo do útero. Mulheres com um ou dois partos tem risco aumentado em 1,8 vezes, enquanto que as que tiveram mais de 7 partos, este risco aumenta 3,8 vezes, quando comparado com mulheres nulíparas (Moreno *et al.*, 2002).

Mulheres imunodeprimidas devido infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) cursando com AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) ou em uso de imunomoduladores após transplante renal, apresentam maiores taxas de infecção pelo HPV e de neoplasia cervical (Dugue *et al.*, 2013). Fatores como baixo nível de escolaridade, idade mais avançada, obesidade e miséria, estão independentemente relacionados a taxas mais baixas de rastreio do câncer cervical (Datta *et al.*, 2006).

2.3 Histórico do HPV e Câncer de Colo do Útero

Os primeiros relatos da existência de verrugas genitais têm origem desde antes da era cristã, onde eram chamadas de condiloma acuminado, na Roma e Grécia antigas, e já eram associadas à promiscuidade sexual. O compêndio *De Medicina*, baseado em textos gregos, descreve o surgimento e a evolução dessas lesões, inclusive o tratamento preconizado naquela época, com o uso de cinzas da borra de vinho. O termo condiloma sobreviveria aos séculos que viriam, sem maiores descobertas acerca de seu agente causador (Donaldson, 2014).

A epidemia de sífilis na Europa no fim do século XV renova o interesse nas doenças genitais, as quais são atribuídas a um “veneno venéreo” e sem diferença na causalidade entre as doenças agora conhecidas como sífilis, gonorreia e verrugas genitais. Posteriormente a crença que as verrugas eram causadas pela sífilis foi abandonada, seguida da dissociação das mesmas da gonorreia. No fim do século XVII é documentado que a morte devido câncer cervical é rara em virgens e freiras, sendo mais comum em mulheres casadas e viúvas, sendo feita a primeira associação de câncer com doença venérea (Oriel, 1971).

Em 1891, Joseph F. Payne, no artigo “On the contagiousness of common warts”, descreve a natureza contagiosa das verrugas cutâneas, ao raspar lesões de uma criança em sua própria pele e observar o surgimento de verrugas após uma semana. Na mesma época é sugerido que as verrugas cutâneas sejam causadas pelo mesmo agente patológico que causa as verrugas genitais. Em 1907, G. Ciuffo demonstra a natureza viral das verrugas genitais, ao inocular na pele um extrato filtrado através de poros capazes de reter fungos e bactérias, mas que deixam passar vírus. (Oriel, 1971).

Nas décadas seguintes são realizadas várias descobertas. É demonstrado que tumores epiteliais benignos em coelhos, chamados de papiloma, podiam malignizar e se transformar em câncer invasor (Rous e Beard, 1935). A descrição de partículas de HPV em verrugas cutâneas. (Strauss *et al.*, 1949). O conceito de coilócitose em esfregaços e biópsias cervicais, sugestivos da presença de HPV (Koss e Durfee, 1956; Meisels e Fortin, 1976). A descrição do grupo papovavírus (Melnick, 1962). A identificação da estrutura genômica do HPV, sendo concluído tratar-se de um DNA circular de dupla fita (Crawford, 1965; Klug e Finch, 1965). A demonstração do HPV em verrugas genitais através da microscopia eletrônica (Dun e Ogilvie, 1968). E finalmente as descobertas feitas pelo virologista alemão Herald zur Hausen, a hipótese de correlação entre HPV e o câncer cervical humano (Zur Hausen, 1976), a descobertas dos tipos de HPV 16 e 18 (Boshart *et al.*, 1984), estudos detalhados do papel desses vírus no câncer genital (Zur Hausen e De Villiers, 1994), o papel dos genes virais E6 e E7 em linhagens de tumor cervical através da integração do genoma viral e a imortalização do vírus na célula (Zur Hausen, 2002). Pela sua pesquisa zur Hausen recebeu o prêmio Nobel de Medicina em 2008.

Na década de 90 inicia o estudo das variações intratipo do HPV, abordando as variações genômicas do HPV de acordo com sua distribuição geográfica (Ho *et al.*, 1993). As variantes virais foram estudadas através das técnicas de hibridização por Southern Blotting ou digestão por enzimas de restrição (De Villiers *et al.*, 2004; Burk *et al.*, 2011), até se chegar à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do DNA viral, fornecendo evidências de que variações intratipos de HPV 16 e 18 poderiam influenciar na heterogeneidade das neoplasias

cervicais (De Villiers *et al.*, 2004; Arias-Pulido *et al.*, 2005). Associação do genoma completo do vírus e suas variantes com aspectos biológicos (Burk *et al.*, 2013).

2.4 Estrutura genômica do HPV

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus do tipo não envelopado, que mede 55 nm, cujo genoma é composto por DNA em formato de dupla fita circular. Ao microscópio eletrônico lembra uma bola de golfe (Van Doorslaer *et al.*, 2018). A partícula viral, ou vírion, consiste de uma camada externa ou capsídeo que envolve o genoma viral. A cápside viral não é envolta por membrana lipídica, apresenta uma simetria icosaédrica, e consiste de 360 cópias (arranjadas como 72 pentâmeros), da proteína maior do capsídeo, L1 e 12 moléculas da proteína menor do capsídeo L2 (Figura 5) (Baker *et al.*, 1991; Sapp *et al.*, 1995).

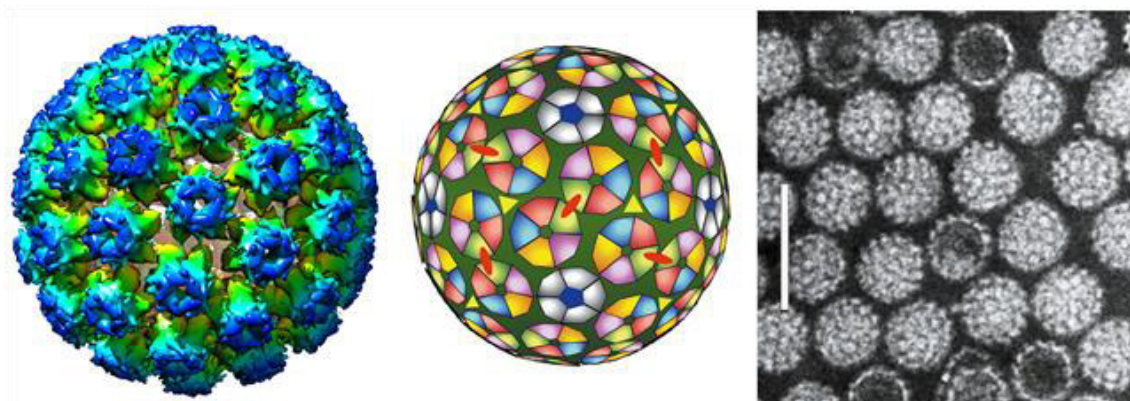


Figura 5: Estrutura genômica da cápside do HPV à microscopia eletrônica (esquerda). Diagrama esquemático representando o arranjo das 360 proteínas da cápside, em disposição icosaédrica, formando 72 capsômeros (centro). Microscopia eletrônica de vírions do HPV1, a barra representa 100 nm (direita). (Fonte: ICVT, 2018).

O genoma do papilomavírus humano (HPV) contém poucos genes, todos codificados na mesma cadeia do DNA, em formato de dupla hélice circular, com cerca de 7.900 pares de base, ligadas covalentemente e associadas a histonas de origem celular (Favre, 1975). O genoma viral pode ser dividido em três regiões: região não codificadora, região precoce e região tardia. As regiões precoce e tardia possuem fases abertas de leitura, chamadas de ORF (*Open Reading Frame*) que contém os genes codificantes das proteínas. A região não codificadora, representa 10% do material genético, é chamada de LCR (*Long Control Region*) ou de URR (*Upstream*

Regulatory Region), não apresenta função de codificar proteínas, mas contém elementos que regulam o início da replicação e da transcrição viral (Booy *et al.*, 1998).

A região precoce E “Early”, ocupa 50% do material genético, engloba seis fases abertas de leitura (E1, E3, E4, E5, E6 e E7), que codificam proteínas que regulam a transcrição e a replicação viral, controlando o ciclo celular, apresentando potencial para transformar e imortalizar as células hospedeiras.

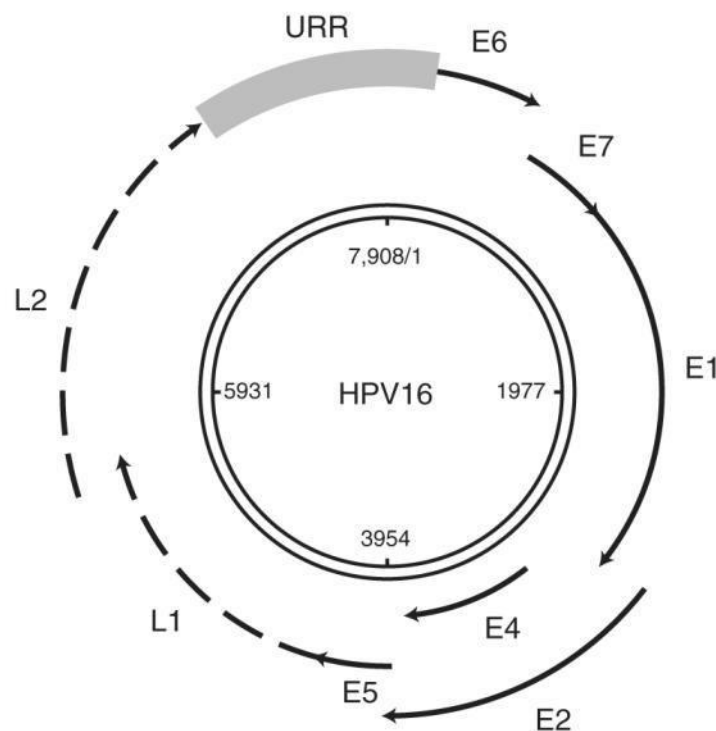


Figura 6: Estrutura genômica do HPV 16. A região regulatória (URR) em cinza. Os genes precoces (early) em setas contínuas, responsáveis pelas sínteses das proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os genes tardios (late) em setas tracejadas, que codificam as proteínas estruturais L1 e L2. (Fonte: Burk, 2010)

A proteína E1 está relacionada com a replicação e amplificação do DNA episomal do vírus no núcleo das células infectadas, permitindo que o vírus utilize os mecanismos da célula hospedeira para replicar o seu genoma (Bergvall *et al.*, 2013). A proteína E2 também é expressa nos estágios iniciais e intermediários do ciclo celular viral, atuando na regulação da transcrição viral (Bernard *et al.*, 1989; McBride, 2013). A proteína E4, cuja fase aberta de leitura é sobreposta ao gene E2, tem função não totalmente esclarecida, aventando-se papel na amplificação genômica viral (Doorbar, 2013). A proteína E5 estimula a proliferação celular e inibe a apoptose (Zhang *et al.*, 2002; Dimaio e Petti, 2013). As proteínas E6 e E7, são oncogenes que inativam proteínas supressoras de tumor, são responsáveis pela transformação maligna

celular e sua imortalização, ao inibir a apoptose e promover proliferação celular com instabilidade cromossômica. A proteína E6 degrada as proteínas p53 e BAK, envolvidas na apoptose e interrupção do ciclo celular (Werness *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 2000), além de ativar a enzima telomerase (Veldman *et al.*, 2001). A proteína E7 interage com a proteína do retinoblastoma (pRb) que ativa genes envolvidos na síntese de DNA e progressão do ciclo celular (Dyson *et al.*, 1992).

A região tardia L (*late region*), ocupa 40% do genoma viral, codifica duas proteínas L1 e L2. A proteína maior L1 é responsável pela maior parte do capsídeo viral, e apresenta uma estrutura altamente imunogênica (Kirnbauer *et al.*, 1992), fato que propiciou o surgimento de vacinas contra o HPV. A proteína menor L2, atua no encapsulamento viral e no processo infeccioso (Day *et al.*, 1998). Esses são os genes que costumam ter sequências mais conservadas em todos os papilomavírus (Bernard *et al.*, 1994).

2.5 Taxonomia viral

A sua classificação dos papilomavírus é baseada em genótipos, com base nas diferenças do próprio genoma. A classificação se baseia na comparação de sequências de nucleotídeos do gene L1, que é o sítio genômico mais conservado entre os tipos virais. Os papilomavírus estão agrupados em família, subfamília, gênero, espécies, tipos e variantes. Família apresenta 60% de diferença nas sequências nucleotídicas da proteína L1. Subfamília apresenta 55% de diferença nas sequências nucleotídicas da proteína L1. Gênero apresenta diferença maior de 40% nas sequências nucleotídicas da proteína L1. Espécie apresenta ao menos 30% de diferença nas sequências nucleotídicas da proteína L1. Tipo apresenta ao menos 10% de diferença nas sequências nucleotídicas da proteína L1. (De Villiers *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2015; Kukimoto e Muramatsu, 2015)

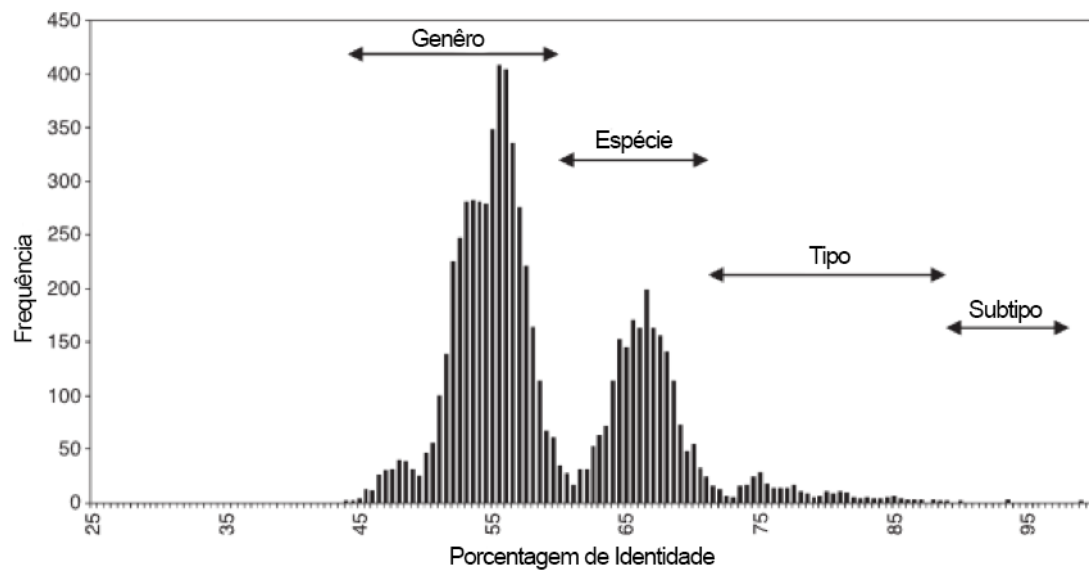


Figura 7: Distribuição de frequência de percentagens de identidade pareada da comparação de sequência nucleotídica de L1 de 118 tipos de papilomavírus (Fonte: de Villiers, 2004).

A taxonomia e a nomenclatura dos vírus são elaboradas por um comitê internacional de taxonomia viral (ICVT) da Divisão de Virologia da União Internacional de Associações de Microbiologia. Até 1995, a família Papovaviridae englobava os gêneros Papillomavirus e Polyomavirus. Em 2000 foi criada a família Papillomaviridae, na qual passou a ser incluído o gênero Papillomavirus. Esta família é composta de duas subfamílias: Firstpapillomavirinae (com mais de 50 gêneros de Papillomavirus, designados pelas letras do alfabeto grego: alpha, Beta, Gamma, Delta, etc; e mais 130 espécies) e Secondpapillomavirinae (com um gênero de Papillomavirus). As espécies são nomeadas de acordo com o grupo de animais que infectam: Human papillomavirus (HPV), Bovine papillomavirus (BPV), Canine papillomavirus, Cottonnail rabbit papillomavirus, Deer papillomavirus, e assim por diante (Van Doorslaer *et al.*, 2018).

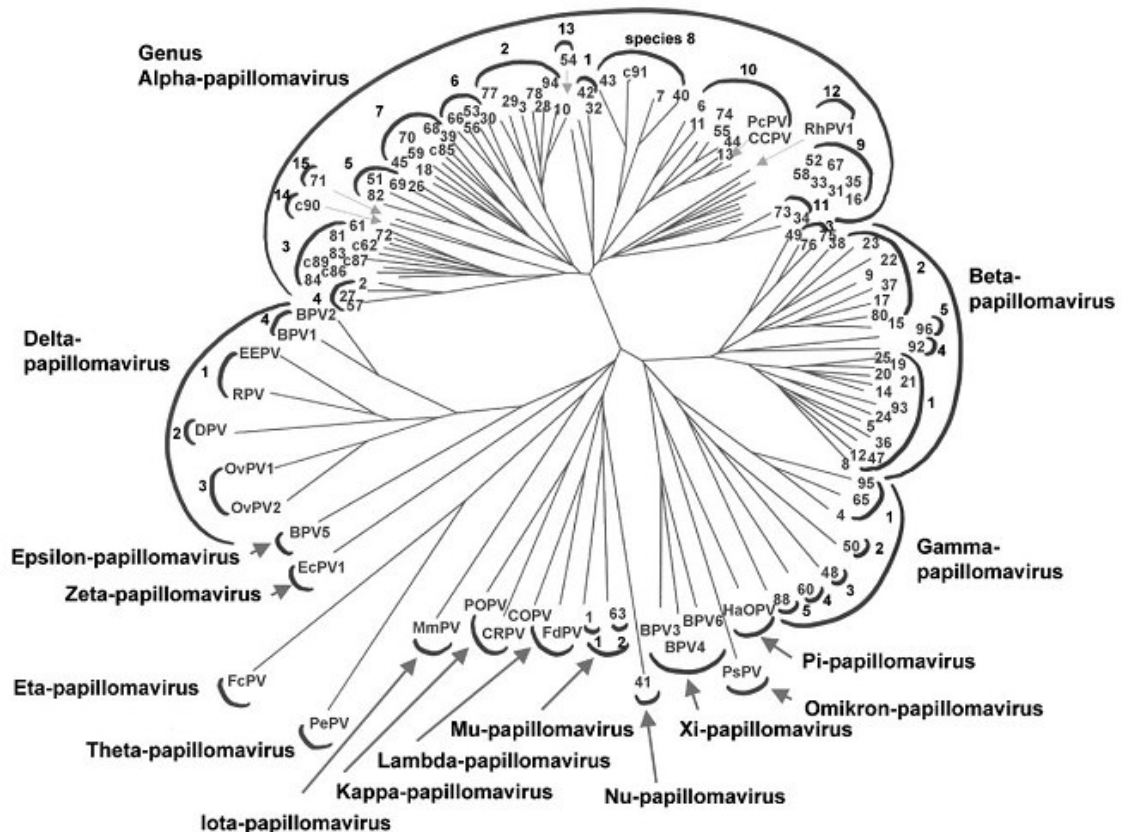


Figura 8: Árvore filogenética contendo a sequência de 118 tipos de papilomavírus. Os semicírculos externos identificam o gênero. O número do semicírculo interno identifica a espécie. Os números se referem ao tipo de HPV. A outra sequência de letras se refere aos tipos de papilomavírus animais. (Fonte: de Villiers, 2004).

Os papilomavírus humanos foram identificados em cinco gêneros: Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Gamma, Mu-papillomavirus e Nu-papillomavirus (Bernard *et al.*, 2006). À medida que diferentes tipos de HPV foram sendo descobertos, receberam números sequenciais como, por exemplo: HPV-6, HPV-11, HPV-16 e HPV-18. A “International Human Papillomavirus Reference Center” (<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>) até o momento identificou mais de 150 tipos, mas nem todos eles foram totalmente sequenciados (Bzhalava *et al.*, 2015; Doorbar *et al.*, 2015) (Figura 8).

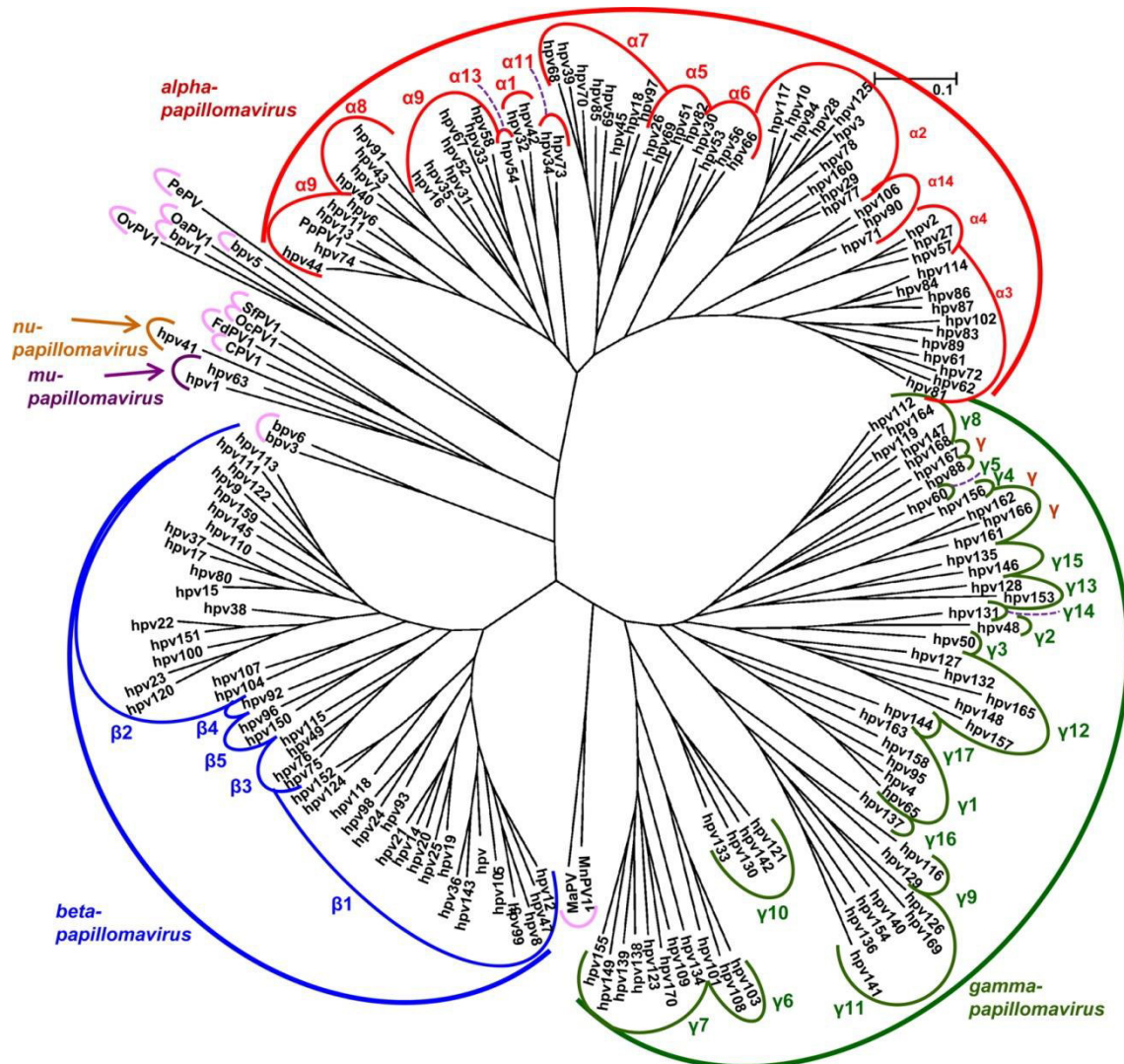


Figura 9: Árvore filogenética contendo a sequência de 170 tipos de papilomavírus humanos, baseados na análise da sequência de L1. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies. (Fonte: de Villiers et al. 2013).

2.6 Classificação do papilomavírus humano

Os vírus da família *Papillomaviridae* são conhecidos por provocarem em seus hospedeiros, lesões chamadas de papilomas, do latim papila, diminuto de papula, saliência em forma de mamilo e da desinência “oma”, nome já usado pelos antigos médicos gregos e romanos. São vírus que evoluíram durante milhões de anos, se propagando ao infectar várias espécies: peixes, répteis pássaros e mamíferos, inclusive humanos. Vírus que co-evoluem lentamente junto com seu hospedeiro, costumam causar infecções crônicas não aparentes, invés

de lesões graves, esse é um dos motivos ser possível isolar HPV em pele, swabs em pessoas da população em geral (Antonsson *et al.*, 2003).

As relações filogenéticas entre os tipos de HPV, com base na variação de sequências em uma dada região do genoma, permitem interpretar como os diferentes tipos e subtipos evoluíram. A construção, com o auxílio de softwares especializados, de árvores filogenéticas dos papilomavírus humanos e de outros animais, tem mostrado que a classificação genômica tem uma correlação com o tropismo por um tipo específico de epitélio (pele ou mucosa). Os vírus dos gêneros: beta, gamma, mu e nu infectam apenas pele, enquanto que os vírus do gênero alpha infectam pele e mucosa (Crow, 2012).

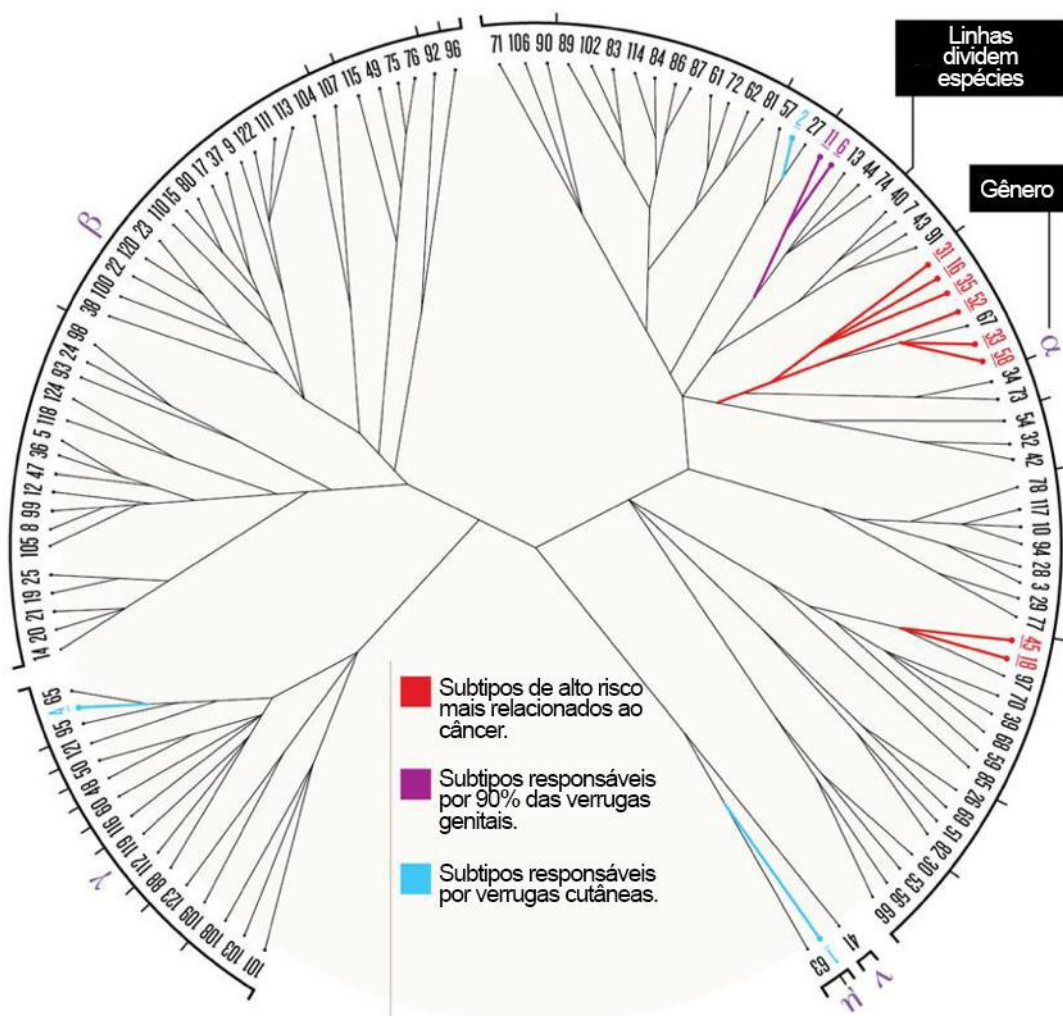


Figura 10: Árvore filogenética do HPV, segundo gêneros, espécies e tipos de acordo com seu tropismo e potencial oncogênico. (Fonte: Crow, 2012).

Os tipos cutâneos são aqueles que infectam a pele, os tipos mais comuns identificados em lesões verrucosas em mãos e pés, são os tipos: 1, 2, 3, 4 e 10. O vírus mucoso trópicos são os que infectam as mucosas urogenitais, anais e oro respiratórias. Os HPV cutâneos são filogeneticamente distantes dos HPVs tipo mucoso (De Villiers, 2013; Van Doorslaer, 2013).

Os do tipo mucoso trópico podem ainda ser divididos em baixo ou alto risco oncogênico, de acordo com o potencial de risco de progressão ao câncer. Considera-se como de baixo risco oncogênico, os tipos 6 e 11, frequentemente encontrados em verrugas genitais benignas, chamadas de condiloma. Os HPV 16 e o HPV 18 são considerados carcinogênicos desde 1995. Todos os tipos de HPV com alto potencial oncogênico pertencem ao gênero alfa e se encontram distribuídos da seguinte forma, na espécie: 5 (tipo 51), espécie 6 (tipos 56, 66), espécie 7 (tipos 18, 39, 45, 59), espécie 9 (16, 31, 33, 35, 52, 58) (Munoz *et al.*, 2003; Crow, 2012).

2.7 Prevalência dos tipos virais em lesões e câncer cervical

A maior parte dos indivíduos sexualmente ativos irá adquirir infecção de um HPV com tropismo ano genital em alguma fase de sua vida. A técnica de PCR (polymerase chain reaction) já demonstrou a presença de material genético do HPV 16 em amostras de tecido cervical de 5% a 40%, de mulheres sem evidências clínicas ou histológicas de infecção por esse vírus (Syrjanen *et al.*, 1990; Hildesheim *et al.*, 1994). A mais extensa compilação de dados sobre prevalência de HPV em mulheres com citologia normal foi provida por uma meta-análise de 78 estudos, publicados entre 1995 e 2005, que avaliaram 157 879 mulheres nos diversos continentes, observou que a prevalência geral de HPV em mulheres com citologia cervical normal foi estimada em 10,4%. As estimativas correspondentes por região foram África 22,9%, América latina 18,64%, América do Norte 13,8%, Ásia 8,3% e Europa 6,6% (Figura 9). Em todas as regiões do mundo, a prevalência do HPV foi maior em mulheres com menos de 35 anos de idade, diminuindo em mulheres com idade mais avançada. Na África, nas Américas e na Europa, um claro segundo pico de prevalência do HPV foi observado em mulheres com 45 anos ou mais. Com base nessas estimativas, cerca de 291 milhões de mulheres em todo o mundo são portadoras de DNA de HPV (De Sanjose *et al.*, 2007). Apesar da infecção pelo HPV ser um evento comum, 90% dessas infecções cervicais são resolvidas num intervalo de até 2 anos, se a infecção persistir, poderão surgir células anormais, e apenas se essas células cruzarem a membrana basal, que essa condição passa a ser considerada câncer cervical (Crow, 2012).

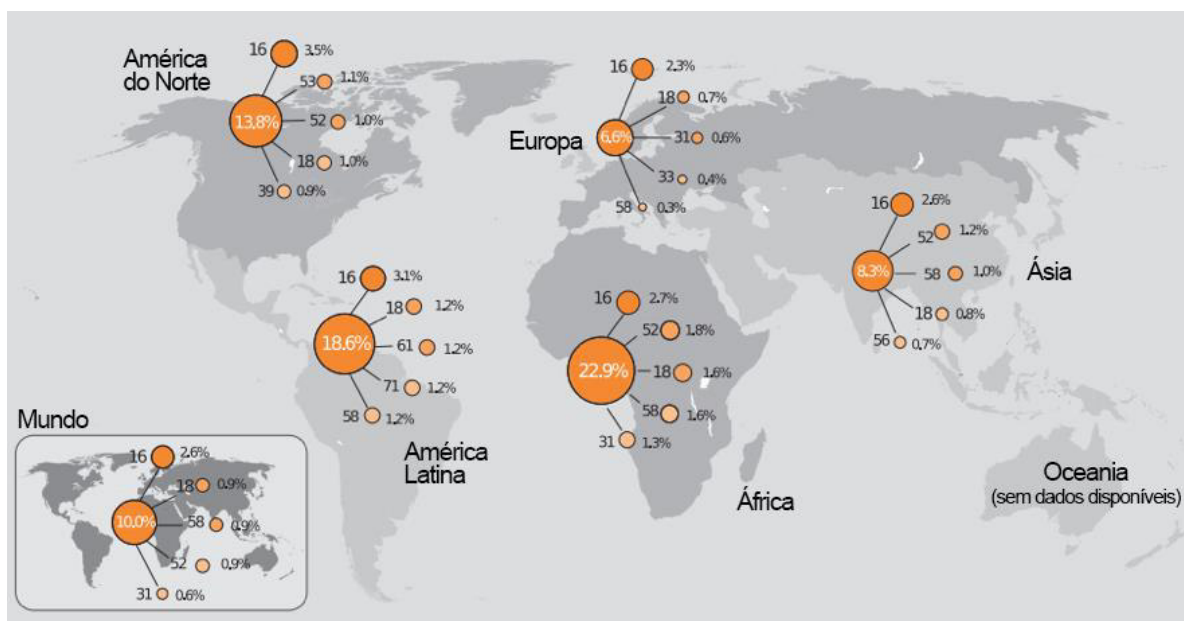


Figura 11: Prevalência dos tipos de HPV mais frequentes em mulheres, com citologia normal. (Fonte: de Sanjose, 2007)

Os oito tipos de HPV mais frequentes foram: HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 52 e HPV 58. Todos pertencem ao gênero Alpha-papillomavirus e apresentam alto risco oncogênico. O HPV 16 é o tipo mais comum em todas as regiões, com uma prevalência global de 2,6%, o que significaria 7,8 milhões de mulheres no mundo infectadas pelo HPV 16. A prevalência mais alta do HPV 16 foi observada na América do Norte, com 3,5%, enquanto a mais baixa foi na Europa, com 2,3%. Mundialmente o segundo tipo mais prevalente é HPV 18 com 0,9% (De Sanjose *et al.*, 2007). A prevalência de HPVs de alto risco correlaciona com a incidência de câncer cervical, e a associação fica mais forte com o aumento da idade (Maucourt-Boulch *et al.*, 2008).

Uma infecção persistente pode provocar o surgimento de poucas células anormais na superfície do colo uterino, que são classificadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de baixo grau (NIC I), que o organismo tipicamente resolve em poucos meses. A progressão para várias células pré-cancerosas na superfície cervical é classificada como lesão de alto grau (NIC II e NIC III), neste estágio o organismo ainda consegue reverter espontaneamente parte dessas lesões. Quando comparamos as lesões de baixo grau (NIC I), lesões de alto grau (NIC II e NIC III) e neoplasia invasiva, observamos que aumenta o percentual dos HPV de alto risco, em especial os tipos 16 e 18. O HPV 16 é detectado 2,6% em colos aparentemente normais, esse número sobe para 18,5% das lesões de baixo grau (NIC I), em 44,1% das lesões de alto grau (NIC III), e está presente em 54,5% das neoplasias invasivas (Crow, 2012).

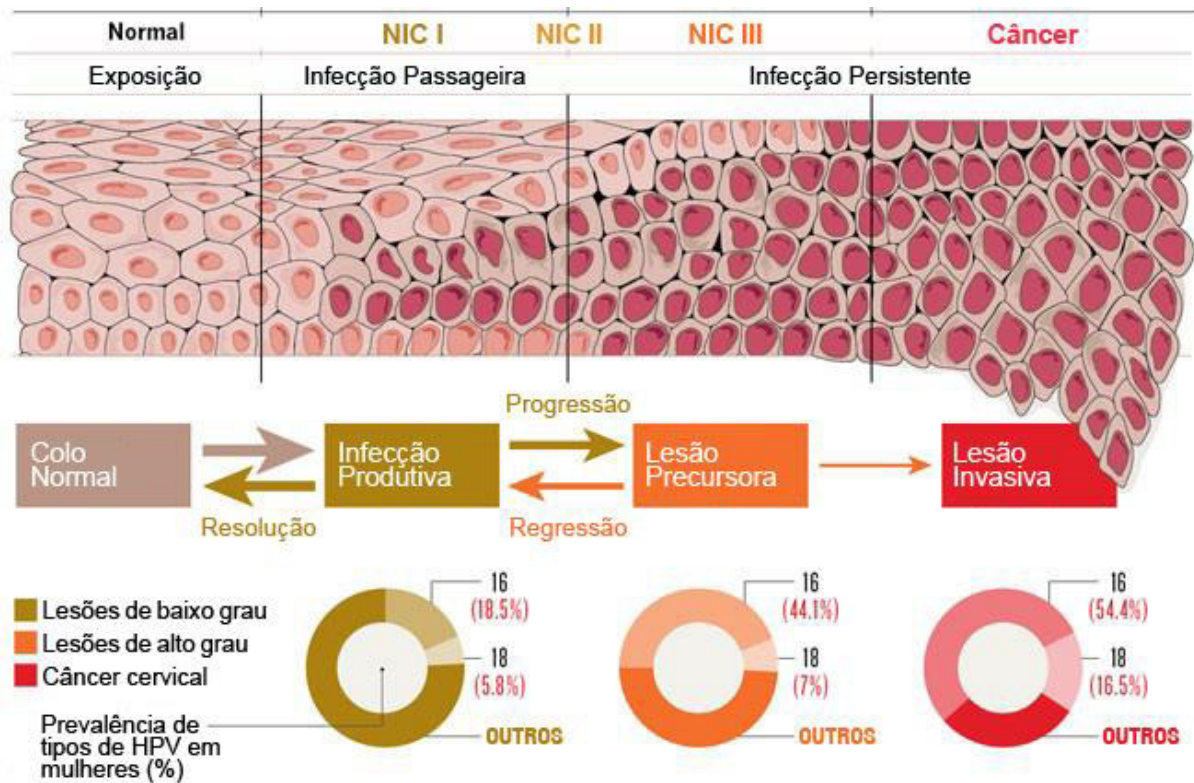


Figura 12: Progressão das lesões cervicais e prevalência dos tipos de HPV. (Fonte: Crow, 2012).

Apenas os HPV 16 e 18 são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical no mundo, seguido pelos tipos 31, 33, 45, 52 e 58. (Munoz *et al.*, 2003; Clifford *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2012). Estudos no Brasil avaliando a presença de DNA de HPV em mulheres com citologia normal demonstraram uma prevalência geral de infecção pelo HPV entre 10% a 24,5% (Ayres e Silva, 2010).

2.8 Ciclo biológico do HPV e carcinogênese

O ciclo biológico do HPV está relacionado com a diferenciação celular do epitélio cervical. O surgimento de micro abrasões, que podem ser provocadas pelo intercuro sexual, no epitélio escamoso do colo do útero, permite o acesso do vírus às camadas basais, onde ocorre a interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da membrana celular (Evander *et al.*, 1997; Mcmillan *et al.*, 1999). Após entrar na célula, o vírion perde seu capsídeo, e o DNA viral é transportado para o interior do núcleo, onde permanece sob a forma circular, episomal, não integrado ao genoma celular. Este DNA episomal replica-se, gerando de 50-100 cópias

por célula (Feller *et al.*, 2009). As células basais infectadas ao se dividirem, distribuem o DNA viral igualmente entre as duas células filhas. Uma célula permanece na camada basal, servindo de depósito de DNA viral e garantindo uma infecção persistente (Walhart, 2015; Hong e Laimins, 2017). A outra célula inicia processo de diferenciação celular e migra para camada suprabasal espinhosa, onde ocorre a amplificação do genoma viral. Nas células da camada granulosa ocorre a síntese das proteínas da cápside. E no estrato córneo ocorre a formação da partícula viral, as quais são liberadas naturalmente pela descamação dos queratinócitos mais superficiais (Doorbar, 2006).

A transcrição dos genes precoces ocorre por “splicing diferencial”, processo pelo qual proteínas são clivadas em diferentes locais da molécula de RNA, a partir de promotores diferentes. As proteínas traduzidas a partir desses RNAs mensageiros vão promover mudanças no funcionamento do ciclo da célula, na sua diferenciação e na apoptose, fenômeno que costuma ocorrer como resposta à infecção viral (Doorbar *et al.*, 1990; Rohlfs *et al.*, 1991).

As proteínas E1 e E2 são expressas nas células da camada basal e regulam a transcrição de genes precoces para a produção de vírions (Feller *et al.*, 2009). A proteína E1, que tem atividade de helicase, inicia a replicação do DNA episomal viral (Yang *et al.*, 1993). A expressão da proteína E2 provoca a diminuição da expressão das proteínas E6 e E7. Quando ocorre a integração do DNA viral com o DNA celular, ocorre a quebra do gene E2, que irá ocasionar aumento na concentração das proteínas E6 e E7, que irão provocar a progressão do ciclo celular e a immortalização celular (Villa, 1997; Doorbar, 2006).

A proteína E6 também atua no controle do ciclo celular, ao degradar a proteína p53, que regula a passagem pelas fases celulares G1/S e G2/M, e que é uma proteína celular supressora de tumor. Observa-se que esta inativação da p53 é muito mais eficiente quando ocorre em HPVs de alto risco oncogênico (Storey *et al.*, 1998). A proteína E7 além de interagir com fatores de transcrição AP1 e promover a proliferação dos queratinócitos infectados, ela também se associa à pRb (proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma), que é quem regula negativamente o ciclo celular, deste modo estimulando a célula a sintetizar material nuclear. As proteínas E6 e E7 são as proteínas de maior potencial de transformação celular, sendo diretamente responsáveis pela proliferação de células infectadas pelo HPV, processo que acarretará a immortalização dessas células e a conversão em células tumorais (Flores *et al.*, 2000).

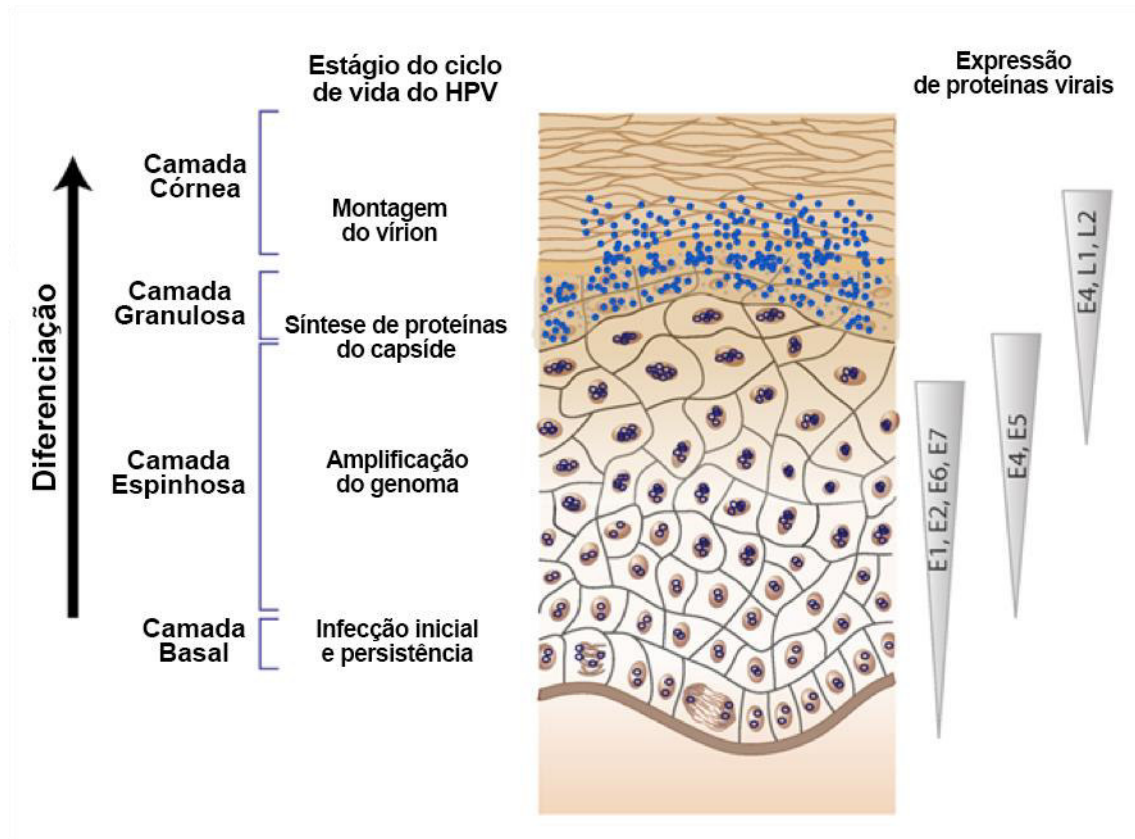


Figura 13: Organização do ciclo celular viral. Diferentes camadas do epitélio e os estágios do ciclo de vida do HPV (esquerda). A cronologia da expressão de proteínas virais (direita). (Fonte: ICVT, 2018).

A expressão da proteína E4 ocorre em células em estágios mais avançados de diferenciação, e sua função ainda não está bem definida. O gene que codifica a proteína E5, frequentemente está excluído em amostras de câncer cervical, demonstrando que sua presença é dispensável para a transformação maligna (Doorbar *et al.*, 1986).

As proteínas de expressão tardia L1 e L2, são as últimas a serem produzidas, são montadas para envolver o material genético viral e originar um novo vírion (Zur Hausen, 2002). A proteína L1 codifica a proteína maior da cápside, enquanto L2 codifica a proteína menor da cápside. Apesar da proteína L2 ser dispensável para a formação do capsídeo, a sua presença multiplica a formação da camada externa da partícula viral. A liberação dos vírions ocorre na superfície da lesão, durante a descamação celular. (Hagensee *et al.*, 1993; Villa, 1997). A fase de incubação tem um período de duração de duas a três semanas, após esse período já podem ser observadas lesões (Oriol, 1971).

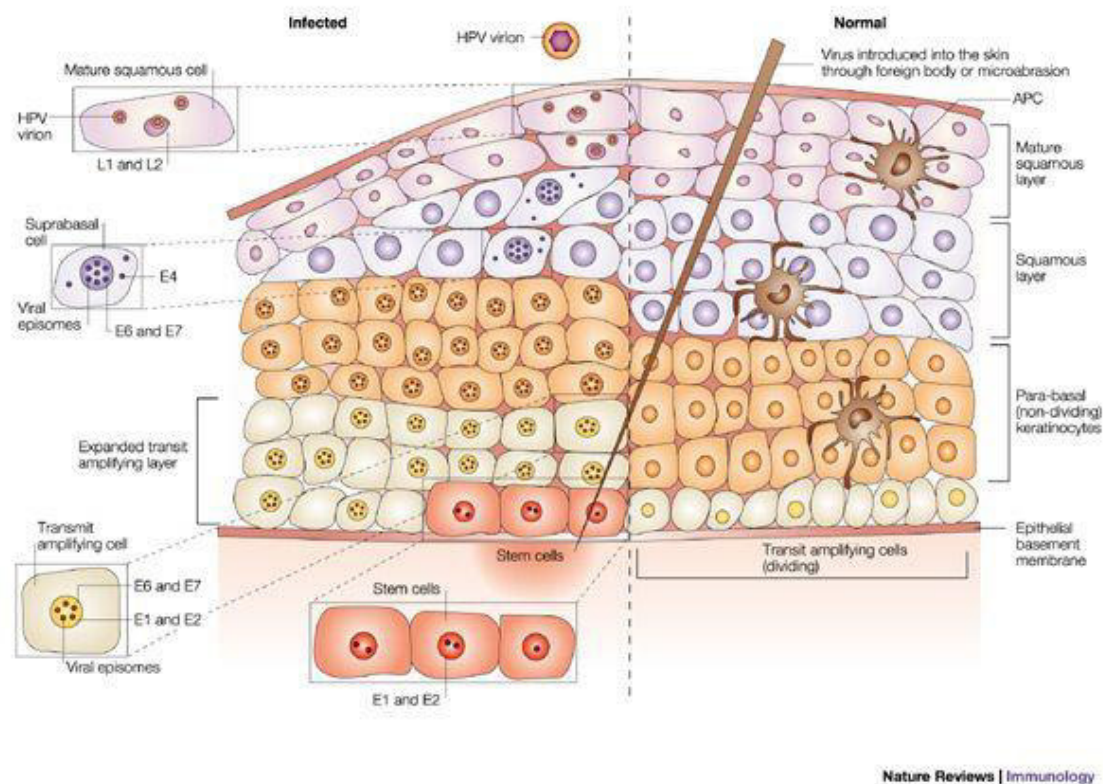


Figura 14: Esquema de infecção pelo HPV, mostrando a expressão diferencial dos diferentes genes virais nas diferentes camadas do epitélio (Fonte: Frazer, 2004).

A infecção cervical pelo HPV é bastante comum. Estima-se que 80% das mulheres sejam infectadas até os 50 anos de idade. Cerca de 90% dessas infecções são eliminadas naturalmente pelo sistema imunológico do organismo em até um ano (Rodriguez *et al.*, 2008). Caso ocorra a persistência da infecção, poderão surgir células anormais. Menos de 1% das infecções persistentes acarretarão um câncer cervical invasivo (Myers *et al.*, 2000).

O momento de cada nova infecção pelo HPV, é definida como “tempo zero”, cuja história natural dessas infecções é basicamente a mesma. Cerca de metade dessas infecções não são detectadas num período de seis a 12 meses e a grande maioria é resolvida em até 2 anos. O risco para desenvolvimento de câncer cervical aumenta bastante para os 5% de infecções por HPV oncogênico que persistem detectadas por alguns anos. (Rodriguez *et al.*, 2008).

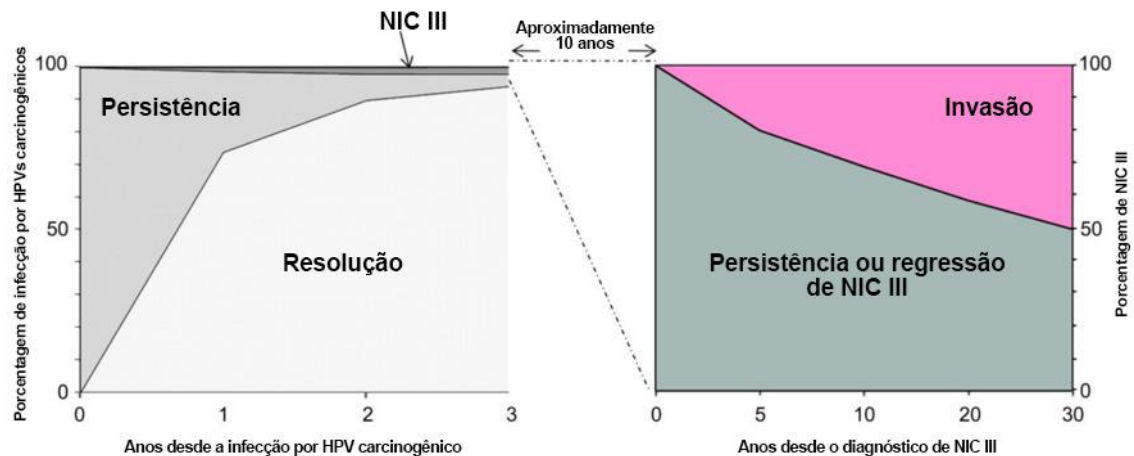


Figura 15: Risco de persistência de infecção pelo HPV e progressão. Esquerda: Proporção de infecções por HPV que são resolvidas, persistem ou progridem para NIC III, nos 3 primeiros anos após sua detecção. Direita: Proporção de NIC III não tratadas que progridem pra câncer num período de 30 anos. (Fonte: Schiffman, 2011).

O processo que leva a célula infectada pelo HPV a transformar-se em lesão maligna, é um processo lento, que está associado ao tipo oncogênico, à carga viral, ao sítio acometido e à persistência da infecção. As lesões intraepiteliais de baixo grau costumam ser observadas nas infecções virais produtivas. A progressão dessas lesões para malignidade está associada à transcrição ativa dos genes virais E6 e E7, que promovem o crescimento celular e contribuem para a imortalização dessas células, com a integração do DNA viral pelo DNA da célula hospedeira (Feller *et al.*, 2009; Egawa *et al.*, 2015).

2.9 Variações intratipo do HPV

Para o HPV ser classificado como tipo, é necessário que seu genoma apresente ao menos 10% de diferença nas sequências nucleotídicas da proteína L1. Subtipo ou variante é definido como quando ocorre uma diferença menor de 10% nas sequências nucleotídicas da proteína L1. Esta classificação baseada na análise de uma única região pode provocar ambiguidade. Foram utilizados outros fragmentos do genoma viral para poder subdividir os tipos em variantes intratipo. Para a análise das variantes intratipo, as regiões LCR e E6 do genoma do HPV, são as mais estudadas, a região LCR por ser formada por regiões promotoras e importantes sítios de ligação para fatores de ligação celulares e os genes codificantes das proteínas E6 e E7 por sua habilidade de inativação de proteínas de controle celular (Zuna *et al.*, 2009). Para ser

considerada uma linhagem de um tipo de HPV, este deve apresentar diferença entre 1 e 10% nas sequências nucleotídicas da proteína L1 e em até 5% na LCR. Sublinhagem apresenta 0,5 a 0,9 % de diferença nas sequências nucleotídicas de E6 e LCR. Estudos tem demonstrado diferença no potencial oncogênico de acordo com a linhagem de um mesmo tipo de HPV (Ho *et al.*, 1993; De Villiers *et al.*, 2004).

A análise comparativa do genoma humano e da filogenia do HPV sugere que a infecção humana pelo HPV ocorreu há milhares de anos e que a divergência evolucionaria dos diferentes tipos e variantes do HPV acompanharam os padrões de migração humana (Chan *et al.*, 1992; Burk *et al.*, 2003). Essas variações genéticas entre um mesmo tipo de HPV podem provocar alterações na replicação e transcrição do DNA viral, imortalização e transformação celular, concorrendo para que ocorra variação na capacidade de promover infecção, na persistência de lesões pré-neoplásicas e no desenvolvimento de câncer invasivo (Bernard *et al.*, 2006; Tamegao-Lopes *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Divergências estas que poderiam ser parcialmente responsáveis pelas diferentes taxas de câncer cervical no mundo.

O HPV 16 é o tipo mais prevalente desde exames de citologia normal, passando por lesões em diferentes estágios de progressão até chegar a câncer cervical, quando é observado em mais de 50% dos casos (De Sanjose *et al.*, 2007; Crow, 2012). E do mesmo modo que já foi demonstrada variação na prevalência do HPV 16, observa-se diferença de prevalência das variantes do HPV 16 em diferentes regiões (Burk *et al.*, 2009).

Inicialmente as variantes do HPV 16 foram classificadas avaliando a região LCR obtidas de amostras cervicais de várias partes do mundo. Estas variantes do HPV 16 foram inicialmente agrupadas em 5 ramos: Europeia (E), sendo esta a linhagem protótipo do HPV16, Asiática (As), Asiático-americana (AA), Africana 1 e Africana 2 (Af 1 e Af 2). (Ho *et al.*, 1993). Um ensaio posterior avaliando sequências de L1 e E6, adicionou a linhagem Norte-Americana (NA) às linhagens já descritas (Yamada *et al.*, 1997).

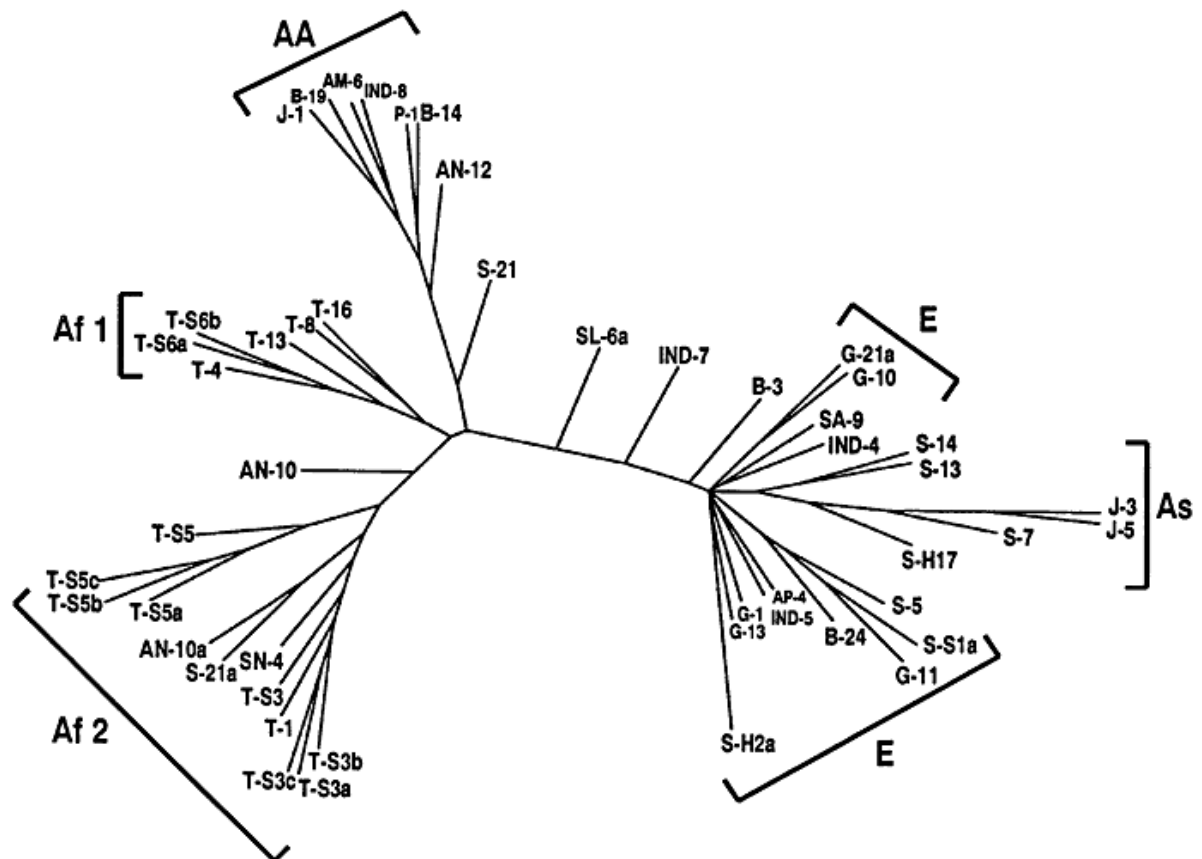


Figura 16: Relação entre 48 das variantes genômicas do HPV 16, divididas em 5 ramos, identificadas em 301 amostras de 25 grupos étnicos e localizações geográficas. (Fonte: Ho, 1993).

A classificação das variantes do HPV 16 foi revista em 2013, quando foi proposto um padrão alfa numérico. As variantes foram agrupadas em quatro linhagens principais: A, B, C e D; que ainda seriam divididas em sublinhagens, adicionando número. A linhagem A inclui as sublinhagens: A1, A2, A3 e A4 (Europeias e Asiática). A linhagem B inclui as sublinhagens: B1 (Africana 1a) e B2 (Africana 1b). A linhagem C, não contém sublinhagem engloba o antigo ramo Africana 2. A linhagem D, inclui as sublinhagens: D1 (Norte Americana), D2 (Asiático Americana 2) e D3 (Asiático Americana 1). As variantes podem ainda ser divididas em dois grandes grupos: o grupo Europeu (E) que incluem as linhagens Europeias (A1, A2, A3) e Asiática (A4); e o grupo Não Europeu (NE) que incluem as linhagens Africana 1 (B1 e B2), Africana 2 (C), Norte Americana (D1) e Asiático Americana (D2 e D3) (Burk *et al.*, 2013).

Type	Lineage	Sublineage	Variant genome ID	GenBank accession no.	Other names*
HPV16	A	A1	Ref	K02718	European (E)
		A2	W0122	AF536179	European (E)
		A3	AS411	HQ644236	E
		A4	W0724	AF534061	Asian, E(As)
	B	B1	W0236	AF536180	African-1, Afr1a
		B2	Z109	HQ644298	African-1, Afr1b
	C		R460	AF472509	African-2, Afr2a
	D	D1	QV00512	HQ644257	North American (NA)1
		D2	QV15321	AY686579	Asian-American (AA)2
		D3	QV00995	AF402678	Asian-American (AA)1

Figura 17: Classificação genômica para as linhagens e sublinhagens variantes. (Fonte Burk, 2013)

Estudos indicam que as variantes do grupo Não Europeu sejam mais patogênicas em comparação às variantes do grupo Europeu. (Sichero *et al.*, 2007; Burk *et al.*, 2013). As variantes não europeias estão associadas a uma maior persistência da infecção viral. Nas variantes do grupo Não Europeu o risco até quadriplica para desenvolver NIC II e NIC III em relação ao grupo Europeu. Até mesmo em um grupo pode haver diferença, estudos demonstraram que dentro do grupo Europeu, a sublinhagem A4 (Asiática) apresenta um risco até dez vezes maior de NIC III, quando comparado com a sublinhagem A1 (Europeia) (Villa *et al.*, 2000; Schiffman *et al.*, 2010). O grupo Não Europeu apresenta um maior risco de câncer, embora muito desse risco seja influenciado pela linhagem D (Asiático Americana) (Zuna *et al.*, 2009). Esta linhagem D também tem um risco maior de desenvolver adenocarcinoma quando comparada com a linhagem A. (Berumen *et al.*, 2001). O grupo europeu pode ainda ser dividido em dois conjuntos, de acordo com o polimorfismo no nucleotídeo E6 350, que leva a troca do aminoácido de leucina para valina, promovendo duas variantes: E-350T e E-350G (Yamada *et al.*, 1997). A variante E-350T apresenta um risco de persistência da infecção viral duas vezes superior ao da variante E-350G (Gheit *et al.*, 2011).

2.10 Aspectos histológicos do Câncer de Colo do Útero

O colo do útero representa o segmento inferior do útero, o qual se projeta para a cavidade vaginal. O colo do útero pode ser dividido em ectocérvice e endocérvice. A ectocérvice é porção externa do colo uterino, em contato com a vagina. É coberta por epitélio escamoso estratificado não queratinizado (escamoso). É similar ao epitélio da vagina, sendo menos sensível a abrasões.

A endocérvice é o lúmen que atravessa o colo uterino, conectando a cavidade uterina ao lúmen da vagina. A abertura deste canal para a cavidade vaginal é conhecida como orifício cervical externo e a abertura para a cavidade uterina é conhecida como orifício cervical interno. É coberta por epitélio cilíndrico simples, colunar. Contém células glandulares produtoras de muco cervical. A junção escamo-colunar (JEC) é parte do colo onde ocorre o encontro do epitélio escamoso ectocervical com epitélio colunar endocervical. A sua localização é variável, de acordo com a fase de vida da mulher; no período reprodutivo encontra-se na ectocérvice, enquanto que na infância e na menopausa encontra-se no canal cervical. (Bartoli *et al.*, 1991; Herfs *et al.*, 2012). A JEC é o local onde as anormalidades costumam surgir, podendo progredir para neoplasia. Os tumores originados na zona de transformação, podem apresentar características de célula escamosa, glandular ou padrão misto (Herfs *et al.*, 2012). Existem dois tipos principais de câncer de colo de útero: o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma (Marsh, 1956).

O carcinoma de células escamosas é responsável por aproximadamente 80% dos casos de câncer de colo de útero. Nos países desenvolvidos apresenta um declínio em sua incidência e mortalidade, provavelmente devido ao resultado de exames preventivos efetivos, embora ainda corram variações de acordo com aspectos raciais, étnicos e geográficos (Bray, Loos, *et al.*, 2005; Barnholtz-Sloan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

O adenocarcinoma de colo de útero representa 20% dos casos de câncer de colo de útero. Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas, provavelmente devido aos métodos de citologia oncológica serem menos efetivos para o adenocarcinoma que costuma incidir no canal endocervical, onde é mais difícil de ser coletada amostra (Bray, Carstensen, *et al.*, 2005; Sherman *et al.*, 2005; Sasieni *et al.*, 2009).

2.11 Estadiamento do Câncer de Colo do Útero e sobrevida

O estadiamento descreve aspectos do câncer, como localização, invasão de estruturas vizinhas e disseminação à distância. Ajuda a definir a melhor conduta terapêutica em cada situação e a prever o prognóstico da paciente (Benedet e Pecorelli, 2006). Existem dois sistemas utilizados para estadiar o câncer do colo útero. O sistema FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) e o sistema TNM da AJCC (American Joint Committee on Cancer).

FIGO	T	Tumor primário
	TX	Tumor primário não pode ser avaliado
	T0	Sem evidência de tumor primário
I	T1	Carcinoma cervical confinado ao útero
IA	T1a	Carcinoma invasor diagnosticado por microscopia
IA1	T1a1	Invasão estromal de até 3 mm de profundidade e até 7 mm de extensão horizontal
IA2	T1a2	Invasão estromal maior que 3 mm a até 5 mm de profundidade e até 7 mm de extensão horizontal
IB	T1b	Lesão clinicamente visível confinada ao colo ou lesão microscópica maior que T1a2/IA2
IB1	T1b1	Lesão clinicamente visível de até 4,0 cm em sua maior dimensão
IB2	T1b2	Lesão clinicamente visível maior que 4,0 cm em sua maior dimensão
II	T2	Tumor que invade além do útero, mas não atinge parede pélvica ou terço inferior da vagina
IIA	T2a	Tumor sem invasão de paramétrio
IIA1	T2a1	Lesão clinicamente visível de até 4,0 cm em sua maior dimensão
IIA2	T2a2	Lesão clinicamente visível maior que 4,0 cm em sua maior dimensão
IIB	T2b	Tumor com invasão de paramétrio
III	T3	Tumor que se estende à parede pélvica, compromete o terço inferior da vagina ou causa hidronefrose ou exclusão renal
IIIA	T3a	Tumor que compromete o terço inferior da vagina, sem extensão à parede pélvica
IIIB	T3b	Tumor que se estende à parede pélvica ou causa hidronefrose ou exclusão renal
IVA	T4	Tumor que invade a mucosa vesical ou retal, ou que se estende além da pelve verdadeira
FIGO	N	Linfonodos Regionais
	NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
	N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
	N1	Metástase em linfonodo regional
FIGO	M	Metástase à distância
	M0	Ausência de metástase à distância
IVB	M1	Metástase à distância

Figura 18: Estadiamento do câncer de colo do útero, sistemas FIGO e TNM (Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual Eight edition, 2017).

O sistema da FIGO já foi revisado diversas vezes, a maioria das mudanças foram realizadas no Estágio I. É originalmente baseado nos resultados do exame clínico, avaliando basicamente a extensão anatômica da doença, é determinado no momento do diagnóstico primário. Permite a utilização de procedimentos como colposcopia, biópsia, conização do colo, cistoscopia e retossigmoidoscopia. A utilização desses procedimentos simples permitiria padronizar o estadiamento em localidades de diferentes níveis de desenvolvimento, sendo possível comparar os resultados usando diferentes modalidades de tratamento. Não permite a utilização de dados cirúrgicos ou exames de imagem mais avançados como tomografia computadorizada ou ressonância magnética (Pecorelli e Odicino, 2003).

A classificação TNM utiliza 3 fatores pra estadiar o câncer: T (indica o tamanho do tumor primário e invasão de estruturas vizinhas), N (a existência de comprometimento linfonodal regional) e M (indica presença de metástases à distância) (Horn *et al.*, 2011). Atualmente está na 8ª edição. É um sistema mais completo que permite a utilização de exames de imagem como tomografia ou ressonância, dados pós-operatórios; que podem avaliar comprometimento linfonodal, que é um dos maiores fatores prognósticos. A incidência de metástases linfonodais pélvicas aumenta com a progressão do estágio da doença. No estágio IA é de 0 a 3,7%, no IB é de 12 a 22%, no IIA de 10 a 27% e no IIB de 34 a 46%. O envolvimento linfonodal paraaórtico segue o mesmo comportamento, no estágio IB é de 2 a 4%, no estágio IIA é 7 a 11% e no estágio IIB acima dos 7% (Sakuragi, 2007). O envolvimento neoplásico paraaórtico tem forte associação com o envolvimento linfonodal pélvico e o risco de metástases linfonodais paraaórticas aumenta em 25% se há linfonodos pélvicos acometidos pela neoplasia (Richard *et al.*, 2008)

Atualmente, o estadiamento da FIGO se alinha ao estadiamento TNM, com exceção do estágio 0, que não existe no sistema da FIGO. Adicionalmente, a avaliação linfonodal não é incluída nos critérios da FIGO. O uso de tomografia ou ressonância nuclear pode auxiliar no planejamento terapêutico, mas não pode ser utilizado para fins de estadiamento (Hricak *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2012). A tomografia computadorizada ajuda a avaliar o tamanho do tumor, identificar a extensão da disseminação da doença, envolvimento linfonodal (aqueles maiores de 1,0 cm são considerados positivos), hidronefrose e alterações hepáticas e ósseas (Lea e Lin, 2012). A ressonância nuclear magnética é especialmente útil para avaliar com acurácia a extensão da doença em estádios iniciais, sendo considerada superior à tomografia e exame clínico para avaliar a medida do tamanho tumoral e determinação de envolvimento do parâmetro. (Mitchell *et al.*, 2006; Thomeer *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2016).

A classificação em grupos prognósticos permite separar por grupos pacientes que apresentam prognóstico semelhante. Um dos valores mais utilizados em termos prognóstico é a taxa de sobrevida em cinco anos, que se refere ao percentual de mulheres que estão vivas após cinco anos do diagnóstico do tumor. As taxas de sobrevida são baseadas em resultados anteriores, refletindo o tratamento realizado pelo menos cinco anos atrás, podendo neste intervalo terem surgido novas opções terapêuticas com melhor resultado. São estatísticas que se baseiam no momento do diagnóstico, não contemplando recidivas ou disseminação do tumor. De um modo geral, a taxa de sobrevida é melhor, quando o tumor é diagnosticado em estágio precoce. Fatores como idade, estado geral, resposta ao tratamento e acesso ao tratamento especializado podem influenciar na taxa de sobrevida.

Tabela 2: Estadiamento de acordo com grupos prognósticos (Fonte: Adaptado de INCA, 2018).

	T	N	M
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio IA	T1a	N0	M0
Estágio IA1	T1a1	N0	M0
Estágio IA2	T1a2	N0	M0
Estágio IB	T1b	N0	M0
Estágio IB1	T1b1	N0	M0
Estágio IB2	T1b2	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio IIA	T2a	N0	M0
Estágio IIA1	T2a1	N0	M0
Estágio IIA2	T2a2	N0	M0
Estágio IIB	T2b	N0	M0
Estágio IIIA	T3	N0	M0
Estágio IIIB	T3b	N0	M0
	T1-3	N1	M0
Estágio IVA	T4	N0-1	M0
Estágio IVB	T1-4	N0-1	M1

A última atualização das taxas de sobrevida em 5 anos das mulheres portadoras de câncer de colo de útero, data de 2010, quando foi publicada a sétima edição do sistema de estadiamento da AJCC e se refere a dados catalogados entre 15.070 casos diagnosticados entre 2000 e 2002. As taxas de sobrevida em 5 anos de acordo com o estadiamento clínico: EC IA (93%), EC IB (80%), EC IIA (63%), EC IIB (58%), EC IIIA (35%), EC IIIB (32%), EC IVA (16%), EC IVB (15%) (AJCC, 7th edition, 2010).

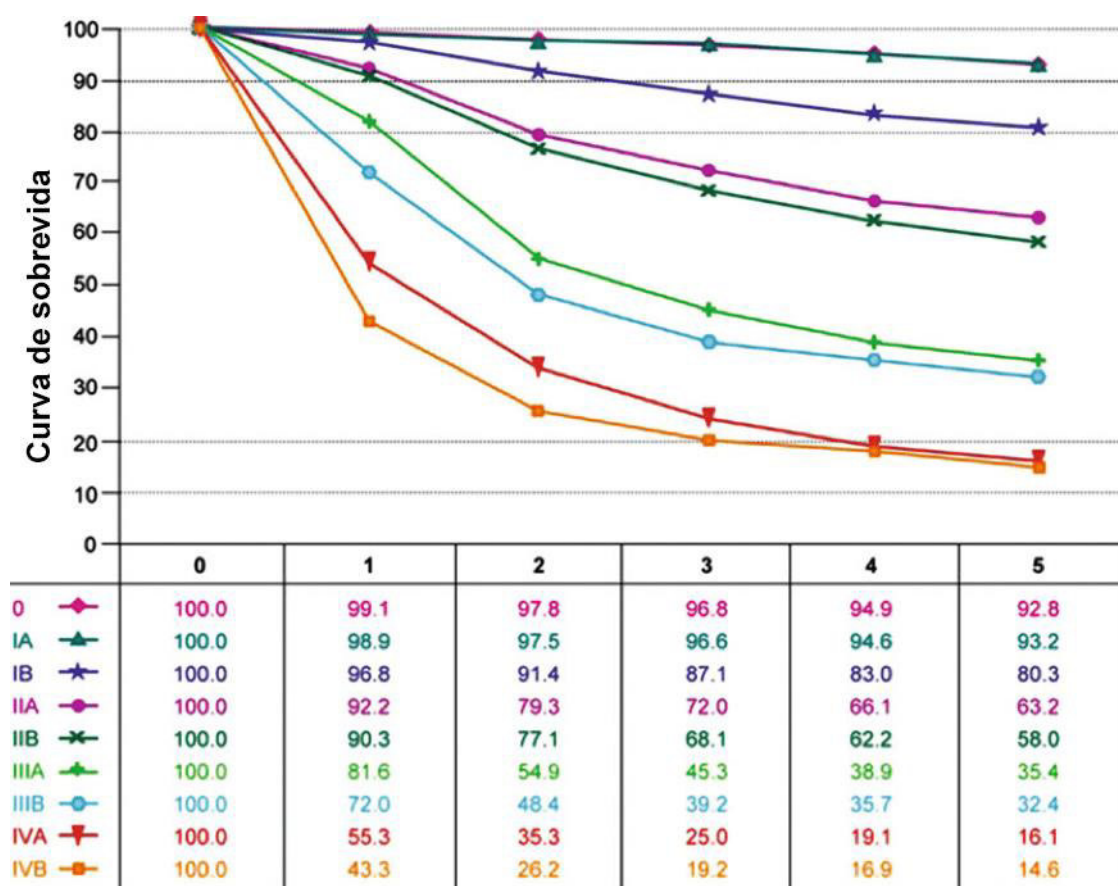


Figura 19: Sobrevida em 5 anos, de acordo com estadiamento clínico em portadoras de câncer cervical (Fonte: AJCC, 7th edition).

No Brasil observa-se que o câncer cervical é diagnosticado em fases mais avançadas. Aventa-se que o acesso aos serviços de saúde (o que inclui a distância ou tempo de deslocamento até o serviço de saúde e o ingresso nesses serviços), a fatores socioeconômicos e demográficos (mulheres em idades mais avançadas ou mais jovens, cor da pele preta ou parda, baixa escolaridade, baixa renda familiar, grande número de filhos), revelando desigualdades no acesso e na cobertura das estratégias de detecção precoce do câncer cervical. No Brasil, o câncer cervical no EC I é diagnosticado em 23,7% dos casos, o EC II em 29,8% dos casos, o EC III em 39,5% dos casos e o EC IV é observado em 7,0 % dos casos (Thuler *et al.*, 2014).

2.12 Fatores prognósticos do Câncer de Colo do Útero e risco de recorrência

Os principais fatores prognósticos para pacientes com câncer de colo de útero, com risco aumentado para recidiva são: envolvimento linfonodal, infiltração de paramétrio, tamanho tumoral, invasão vascular linfática e margens cirúrgicas.

O comprometimento linfonodal representa o fator prognóstico mais importante. Pacientes com envolvimento de linfonodo único ou metástases linfonodais abaixo do nível dos nódulos ilíacos comuns apresentam sobrevida em 5 anos de 85 e 84,6%, respectivamente. Quando ocorre o envolvimento múltiplo de linfonodos pélvicos a sobrevida em 5 anos cai para 50%, e se o envolvimento linfonodal for paraaórtico diminui ainda mais para 20%. (Tsai *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). O acometimento linfonodal está associado, além de piora da sobrevida global, a maiores taxas de recidiva. Pacientes sem linfonodos comprometidos apresentam taxa de recidiva de 14%, enquanto que o envolvimento linfonodal esta taxa sobe para 44% de chance de recidiva (Sartori *et al.*, 2007).

O paramétrio é um tecido que se conecta diretamente ao colo do útero, rico em vasos venosos, arteriais e linfáticos. Acredita-se que seja através dele que ocorre a primeira disseminação do câncer do colo do útero, seja por invasão local ou embolização linfática. O principal preditor para o acometimento do paramétrio é a presença de metástase linfonodal, sendo observado o acometimento neoplásico parametrial em todos os pacientes com metástase linfonodal (Benedetti-Panici *et al.*, 2000; Stegeman *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2007). Pacientes com tumores com diâmetro menor que 2,0 cm e ausência de invasão angiolinfática, apresentam risco menor de 1% para envolvimento parametrial, sendo, portanto, candidatas para cirurgias menos radicais (Schmeler *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2015).

A presença de células tumorais na rede linfática dos espécimes cirúrgicos tratados com cirurgia radical mostrou ter implicação prognóstica, a sobrevida em 5 anos foi de 88% em pacientes sem invasão neoplásica angiolinfática em contraste com 58% naquelas com invasão neoplásica angiolinfática (Friedell *et al.*, 1967). A invasão neoplásica angiolinfática também está relacionada à recidiva, a sobrevida livre de doença neste grupo de mulheres foi de 77% em contraste com 89,2% nas pacientes com ausência de invasão neoplásica angiolinfática (Delgado *et al.*, 1990; Rutledge *et al.*, 2004).

O tamanho tumoral é um fator prognóstico independente para o câncer de colo de útero no estágio I, com associação positiva com metástase linfonodal, infiltração de paramétrio e diminuição de sobrevida (Delgado *et al.*, 1989). Pacientes com EC IB apresentam sobrevida

global em cinco anos de 90%, mas quando se avalia o subgrupo das pacientes com tumores maiores que 4,0 cm (EC IB2), esta sobrevida em 5 anos diminui para 65-80%, e tumor maior de 6,0 cm está associado a maior taxa de recidiva (Rutledge *et al.*, 2004).

A presença de margem cirúrgica positiva ou exígua (até 0,5 cm) é uma variável de prognóstico reservado. Um estudo que avaliou 1.233 pacientes submetidas à histerectomia radical, avaliando a presença de margem positiva ou exígua (até 0,5 cm), demonstrou que as pacientes que não realizaram radioterapia tiveram pior sobrevida em 5 anos (28,6% versus 81,3%) e maior taxa de recorrência (85,5 contra 12,5 %) (Estep *et al.*, 1998).

2.13 Tratamento do Câncer de Colo do Útero por estágio clínico

- Estágio IA1

Esses tumores apresentam invasão estromal menor ou igual a 3 mm e disseminação horizontal não maior que 7 mm e estão associados a baixo risco de envolvimento linfonodal. Quando não há invasão vascular linfática (IVL), o risco de metástase linfonodal é de 1,5%, e como opção de tratamento pode-se utilizar de procedimentos como conização cervical (prole incompleta) ou histerectomia simples (prole completa) (Ueki *et al.*, 1994; Al-Kalbani *et al.*, 2012). A presença de invasão vascular linfática em tumores estágio IA1, aumenta o risco de metástase linfonodal para 5%. Assim, nesses casos recomenda-se conização com amostragem linfonodal pélvica ou histerectomia radical modificada mais linfadenectomia pélvica (Lee *et al.*, 2006).

- Estágio IA2

Lesões cervicais com 3 a 5 mm de invasão estromal e disseminação horizontal não maior que 7 mm, tem risco de 7% de metástase linfonodal e mais de 4% de risco de recidiva tumoral (Elliott *et al.*, 2000). Recomenda-se a histerectomia radical mais linfadenectomia pélvica (Kokka *et al.*, 2014). Pacientes não candidatas a procedimento cirúrgico, podem ser tratadas com Radioterapia externa e Braquiterapia (Small *et al.*, 2012).

- Estágio IB e IIA

O câncer de colo de útero estágio IB e IIA pode ser tratado com histerectomia radical mais linfadenectomia pélvica bem como com radioterapia externa e intracavitária associada ou não à Quimioterapia. Em ambos os casos apresentam semelhantes sobrevida global em 5 anos (83%) como sobrevida livre de doença (74%), porém quando a cirurgia é realizada associa-se maior taxa de morbidade. A cirurgia radical costuma ser a escolha para pacientes jovens, com baixo índice de massa corporal. (Landoni *et al.*, 2017).

Enquanto para pacientes com EC IB1 e IIA1 o tratamento com Radioterapia e Quimioterapia ainda não esteja bem esclarecido. Para EC IB2 e IIA2, a Quimioterapia concomitante contendo cisplatina mostrou aumento na sobrevida dessas pacientes (Keys *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999).

- Estágio IIB até IVA

Trata-se de doença avançada, com tumores se estendendo para órgãos adjacentes e linfonodos pélvicos. Representam a maioria dos cânceres cervicais tratados em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. A taxa de sobrevida em 5 anos costuma ser menor que 50%. O tratamento consiste de Radioterapia pélvica associada à quimioterapia com cisplatina mais Braquiterapia (Monk *et al.*, 2007; Gaffney *et al.*, 2011; Rose, 2011).

- Estágio IVB

São tumores com prognóstico reservado. A radioterapia pélvica pode ser utilizada para alívio de sintomas locais como dor e sangramento. Enquanto que a quimioterapia pode ser utilizada caso haja sintomatologia sistêmica.

2.14 Cirurgia no Câncer de Colo do Útero

- Conização

Objetiva a remoção em bloco da ectocérvice e do canal endocervical com margens livres. Caso a margem seja positiva, pode ser feita nova ressecção. A forma do cone retirado pode variar de acordo com o tamanho, tipo e localização da lesão. Após o procedimento, o tecido removido é analisado em microscópio, caso a margem seja positiva, deve-se repetir o procedimento (Andikyan *et al.*, 2014; Tierney *et al.*, 2014; Yoneda *et al.*, 2015).

- Histerectomia

Em 1912, Ernst Wertheim descreveu a histerectomia radical para o tratamento do câncer de colo de útero. Em 1951, Vincent Meigs definiu as bases da linfadenectomia (Meigs, 1951; Swailes *et al.*, 2017). Em 1974, Piver, Rutledge e Smith definiram 5 tipos de histerectomia, sendo as classes II e III as opções para o tratamento do câncer de colo de útero (Piver *et al.*, 1974). Em 2008, Denis Querleu e Paul Morrow propuseram uma nova classificação das histerectomias, descrevendo o grau de ressecção e preservação de nervo para histerectomia radical em três planos. Abordagens de histerectomia incluem histerectomia simples (tipo A), histerectomia radical modificada (tipo B) e histerectomia radical (tipo C), esta última sendo a recomendada para o tratamento do câncer de colo de útero (Querleu e Morrow, 2008). É um procedimento tipicamente utilizado em tumores iniciais como EC IA, IB1 e IIA1 (American College Of e Gynecologists, 2002).

- Exenteração pélvica

Para tumores recorrentes ou persistentes, confinados à pequena pelve (sem metástase à distância), pode-se considerar a exenteração pélvica como modalidade potencialmente curativa. É realizada uma histerectomia radical e disseção linfonodal pélvica adicionada à retirada da bexiga, reto, vagina e parte do cólon (Chiantera *et al.*, 2014; Sardain *et al.*, 2015).

2.15 Quimioterapia e Radioterapia no Câncer de Colo do Útero

A Radioterapia associada à Quimioterapia costuma ser o tratamento de escolha para EC IB2 até IVA (Monk *et al.*, 2007; Gaffney *et al.*, 2011). A Quimioirradiação também pode ser utilizada em pacientes não candidatas à histerectomia. A Radioterapia associada à Quimioterapia usando cisplatina demonstrou uma redução de 30-50% no risco de morte, uma melhora na sobrevida geral e na sobrevida livre de doença, quando comparada com a Radioterapia isolada (Keys *et al.*, 1999). A Quimioterapia com Cisplatina endovenosa em seis ciclos semanais, deve ser fornecida com dose de 40 mg/m² semanal, não devendo exceder 70 mg/m². A carboplatina concomitante à radioterapia pode ser uma opção para as pacientes que não tolerem a Cisplatina (Dubay *et al.*, 2004; Cetina *et al.*, 2008). Convém observar que a Quimioterapia deve ser concomitante à Radioterapia externa, não sendo utilizada junto à Braquiterapia (Monk *et al.*, 2007). Deve-se ter cuidado para que o tratamento com Quimioterapia e Radioterapia não seja realizado na vigência de anemia, o que pode resultar em piores resultados de tratamento (Harrison *et al.*, 2000). Não há diferença na modalidade caso se trate de um carcinoma de células escamosas ou um adenocarcinoma (Gien *et al.*, 2010).

A Radioterapia é costumeiramente realizada em duas etapas: a Radioterapia externa (Teleterapia) e a Radioterapia interna (Braquiterapia). O Planejamento da Radioterapia externa pode ser feito usando várias modalidades. O planejamento convencional, usando radiografias e estruturas ósseas como pontos de referência, que é o autorizado pelo SUS. O planejamento conformacional, que utiliza tomografia computadorizada, que permite o uso de colimações individualizadas de acordo com a geometria do tumor e variedade anatômica dos pacientes, o que permite campos de irradiação mais precisos, quando são utilizados os conceitos de volume de tumor grosseiro, volume de tumor clínico e órgãos normais irradiados (Jadon *et al.*, 2014).

O planejamento radioterápico deve levar em consideração o potencial impacto em estruturas ao redor do colo do útero e sítios de drenagem, como reto, bexiga, intestino delgado, sigmoide e cabeça de fêmur. Os efeitos agudos mais comuns são diarreia, cistite e astenia. Esses efeitos são menores com o planejamento conformacional. O volume de tratamento deve englobar o tumor grosseiro, paramétrios, ligamentos úteros-sacrais, margem vaginal, linfonodos ilíacos internos, ilíacos externos, obturatórios e pré-sacrais. Caso os linfonodos paraaórticos estejam comprometidos, estes também devem ser irradiados. A Radioterapia externa costuma fornecer uma dose de 45-50,4 Gy para toda a pelve, com fracionamento diário de 1,8 Gy, dose considerada necessária para promover a redução tumoral e permitir o tratamento

com Braquiterapia. Um reforço parametrial pode ser necessário em casos selecionados que demonstrem infiltração em paramétrios após a 1ª fase de tratamento (Koh *et al.*, 2018).

A Braquiterapia é um componente crítico do tratamento pela sua capacidade de fornecer uma alta dose de radiação ao tumor, poupando estruturas próximas. Para pacientes com útero intacto a Braquiterapia utiliza acessórios como sonda intrauterina e ovoides ou anel que fornecerão dose para a ectocérvice e porção superior da vagina. Utilizam-se as orientações do “*International Commission on Radiation Units*” (ICRU) 38, para a normatização da dose prescrita (Potter *et al.*, 2000). O ponto A representa um ponto de referência paracervical mais utilizado para definir a dose de Radioterapia fornecida à paciente. A dose no ponto B e em reto e bexiga também são documentados e podem restringir a dose realizada devido à tolerância desses órgãos. A Braquiterapia no Brasil costuma ser realizada usando equipamentos de alta taxa de dose (HDR – High Dose Rate), que é definida como um tratamento que permite entregar uma grande quantidade de radiação em um pequeno período, com uma taxa superior a 0,2 Gy/min (12 Gy/h) (Da Silva *et al.*, 2014). A dose prescrita costuma ser de 6-7,5 Gy no ponto A. Nas pacientes que após a Teleterapia externa ainda apresentam volume tumoral maior de 4,0 cm, não é possível a realização da Braquiterapia, devendo-se utilizar reforço com campos reduzidos de Teleterapia, mas que apresenta pior resultado de tratamento. (Koh *et al.*, 2018)

Vários estudos sugerem que uma duração prolongada da Radioterapia seja deletéria para as pacientes, com piora nos resultados do tratamento. Calcula-se que um tratamento que se prolongue além de 8 semanas (56 dias), ocorrerá em decréscimo de 0,5-1,0% em controle pélvico para cada dia extra de tratamento radioterápico, com consequente piora na sobrevida dessas pacientes (Fyles *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2003). Apesar da falta de estudos prospectivos randomizados avaliando a duração do curso radioterápico, recomenda-se que a Teleterapia e Braquiterapia sejam completados em oito semanas, devendo-se evitar pausas ou atrasos, sempre que possível.

2.16 Seguimento após tratamento primário do Câncer de Colo do Útero

O conceito de vigilância após o tratamento do câncer é definido como a observação e seguimento das pacientes assintomáticas, livres de doença. É baseado na premissa que a detecção precoce da recidiva, levaria a um melhor prognóstico, uma vez que o tratamento seria iniciado de modo mais precoce e com a necessidade de procedimentos menos radicais aumentando a sobrevida e diminuindo a mortalidade. Cerca de 50% das recidivas ocorrem no primeiro ano, e 85% das recidivas são diagnosticadas em até dois anos. A média de sobrevida para a maioria das pacientes variou de 7 a 17 meses após detecção da recidiva (Bodurka-Bevers *et al.*, 2000; Elit *et al.*, 2009).

Apenas 5% das pacientes que evoluem com recidiva costumam estar vivas após 5 anos (Petignat e Roy, 2007). O local da recidiva tem papel na sobrevida das pacientes, as recidivas em cúpula vaginal apresentam sobrevida maior que as que tiveram recidiva em outros locais (Zola *et al.*, 2007). De cada 100 pacientes com a doença em estágio inicial, cerca de 20 pacientes recidivam; dessas, cerca de cinco tem uma recidiva central, e cerca de duas podem ser curadas por tratamento futuro (Elit *et al.*, 2009).

A vigilância das pacientes é baseada no risco de recidiva de cada paciente. A maior parte das pacientes (80-90%) vai apresentar sintomas e ter sinais que levarão a investigar a suspeita de recidiva (Larson *et al.*, 1988; Ansink *et al.*, 1996). Os sintomas mais frequentes são secreção vaginal, sangramento vaginal, dor pélvica, edema de membros inferiores, fadiga e perda ponderal (Dreyer *et al.*, 2005). A anamnese e exame físico são recomendados a serem feitos a cada 3 meses no primeiro ano; a cada 4 meses no segundo ano; depois a cada 6 por 3 a 5 anos. Depois anualmente (Salani *et al.*, 2011).

A citologia pode ser feita anualmente. Embora tenha sido demonstrado que é uma ferramenta pouco efetiva para detectar a recidiva precoce do câncer de colo de útero (Elit *et al.*, 2009). A Tomografia computadorizada pode ser realizada 3-6 meses após o término do tratamento (Salani *et al.*, 2011). Seu papel em pacientes assintomáticos é controverso, sendo mais efetiva quando houver sintomatologia (Jeong *et al.*, 2003). A Ressonância nuclear magnética é um procedimento opcional, e excelente para avaliar extensão local (Balleyguier *et al.*, 2011; Sala *et al.*, 2013). Apesar do relativo alto custo, seu uso criterioso poderia culminar sendo custo-afetivo, ao substituir procedimentos como cistoscopia, retossigmoidoscopia e urografia excretora (Hricak *et al.*, 1996). Além de ser superior à tomografia, na capacidade de detectar tumor residual (Schwartz *et al.*, 1994). A Radiografia torácica apresenta baixa

capacidade de detectar recorrência pulmonar assintomática, deve ser solicitada caso ocorram sintomas pulmonares.

2.17 Tratamento da recidiva após tratamento primário

Deve-se diferenciar persistência de recidiva. Doença persistente é aquela que não regrediu completamente após 3 meses da Radioterapia, enquanto que recidiva é aquela que surge após o término do tratamento primário. Em ambas as situações o tratamento vai depender da localização e extensão. As pacientes que realizaram tratamento primário com cirurgia e que não houve indicação de radioterapia, caso ocorra recidiva local podem ser tratadas com intenção curativa. Essas pacientes costumam ter sobrevida em 5 anos de 30 a 70% (Potter *et al.*, 1990; Dreyer *et al.*, 2005).

As pacientes que realizaram tratamento primário com Radioterapia e que cursaram com persistência ou recidiva podem ser tratadas com histerectomia radical, caso tenham doença limitada (Coleman *et al.*, 1994). Em tumores mais extensos pode ser necessário um procedimento mais agressivo, com a retirada da massa tumoral, reto e bexiga. A radioterapia prévia aumenta o risco de complicações devido vascularização e cicatrização prejudicadas (Peiretti *et al.*, 2012). A Quimioterapia também pode ser utilizada em tumores persistentes ou recorrentes. Geralmente com intenção paliativa. A duração da resposta é de apenas 4 a 6 meses, e a sobrevida nessas mulheres costuma ser apenas 7 meses (Park e Thigpen, 1993; Boussios *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

No Maranhão, o câncer de colo de útero é o mais frequente entre as mulheres, e quando diagnosticado a maioria das pacientes já apresenta tumor em estágio avançado, quando as chances de cura são menores.

Os estudos que avaliam o papel do HPV no câncer do colo do útero se concentram em estudar os tipos de HPV, poucos trabalhos contemplam o impacto das variantes intratipo no câncer cervical. O HPV 16 é responsável por mais da metade dos casos de câncer cervical. Espera-se que o estudo genotípico do HPV possa fornecer novas informações sobre a etiopatogênese dessa neoplasia e que possa ser utilizado como um marcador para avaliar resposta ao tratamento e prognóstico. As variantes do HPV 16 já são conhecidas por apresentarem diferença na capacidade de infectividade e no processo oncogênico, que se reflete na imortalização celular; foi formulada a hipótese que a resposta ao tratamento com Quimioterapia e Radioterapia poderia ser diferente de acordo com a variante do HPV.

O objetivo deste estudo visa reportar a detecção do HPV oncogênicos de alto e baixo risco em amostras de câncer cervical e avaliar a relação das variantes do HPV 16 com a resposta ao tratamento realizado com Quimioterapia e Radioterapia. Identificar as subpopulações responsáveis pela forma mais agressiva do tumor de colo do útero, com vistas a estabelecer estratégias diferenciadas para se conseguir uma maior taxa de controle da doença

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Estabelecer a relação das linhagens do Papilomavírus Humano (HPV) 16 com a resposta ao tratamento com Quimioterapia, Radioterapia e Braquiterapia em pacientes com câncer de colo do útero.

4.2 Objetivos Específicos

- Descrever os dados sociodemográficos e epidemiológicos da população em estudo;
- Avaliar aspectos patológicos tumorais dessas pacientes;
- Identificar os tipos de Papilomavírus Humano (HPV) mais frequentes e estudar sua associação com parâmetros patológicos tumorais.
- Estimar a frequência das linhagens do HPV 16 e relacionar com parâmetros patológicos tumorais.

5 METODOLOGIA

5.1 População do estudo

Este é um estudo descritivo, prospectivo e transversal, realizado entre abril de 2016 e abril de 2018, no Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) do Hospital do Câncer Aldenora Bello e na Unidade de Assistência de Alta Complexidade (UNACON) do Hospital do Câncer Tarquínio Lopes Filho, localizados em São Luís – Maranhão, ambas habilitadas na Rede SUS. Foram coletadas fragmentos de neoplasia do colo de útero de 125 mulheres, sendo realizado o seguimento dessas mulheres, registrando o tratamento oncológico, conforme o protocolo dos hospitais, até o momento em que as mesmas retornassem para consulta de avaliação do tratamento realizado.

5.2 Coleta de dados epidemiológicos

As pacientes encaminhadas para atendimento ambulatorial no Serviço de Ginecologia Oncológica nesses hospitais eram convidadas a participar desse estudo, sendo explicados os objetivos do estudo, caso aceitassem, registravam assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) e foram submetidas a um formulário para coleta dos dados sociodemográficos (Anexo B), elaborado previamente com base nas informações de interesse ao projeto de pesquisa. As informações foram coletadas pelos pesquisadores e colaboradores da pesquisa em ambos os serviços.

As pacientes em que foi demonstrada a presença de tumor na biópsia do colo uterino e que se enquadrassem nos critérios de inclusão, foram acompanhadas após o diagnóstico, e coletados os dados do tratamento em Formulário Clínico (Apêndice A) registrando procedimentos oncológicos realizados (Cirurgia, Radioterapia, Quimioterapia ou sua não realização), até o seu primeiro retorno de seguimento com exames para avaliação de resposta ao tratamento executado. Foi realizada a digitação dupla, com a construção de um banco de dados usado para análise estatística.

5.3 Critérios de inclusão

Mulheres maiores de 18 anos com diagnóstico de câncer do colo do útero que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura de TCLE (Anexo A).

5.4 Critérios de exclusão

Mulheres com lesões pequenas, nas quais a realização da biópsia pudesse interferir no estadiamento. Também foram excluídas mulheres em tratamento psiquiátrico.

5.5 Cálculo da amostra

Este projeto utilizou os dados da Estimativa-2014, publicada bianualmente pelo INCA, então a última disponível, que calculava uma incidência de 200 novos casos/ano de câncer de colo de útero para São Luís-MA. Sendo uma amostra finita, menor de 100.000 indivíduos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = \frac{n_0}{1 + \frac{n_0 - 1}{N}}$$

Legenda:

n_0 = intensidade da amostragem;

N = tamanho da amostra na população.

Sendo, n_0 igual a:

$$n_0 = \frac{z(k)^2}{4d^2}$$

Legenda:

$z(K)^2$ = valor na tabela do teste t-student com (n-1)

graus de liberdade para o intervalo de confiança;

d= erro

Foi aceita como população a estimativa de incidência de novos casos do INCA para a população de São Luís, com índice de confiança de 95% e erro amostral de 5%, temos os seguintes valores:

$$n_0 = \frac{1,96^2}{4(0,05)^2} = 384,16$$

Substituindo n_0 na equação, teremos:

$$n = \frac{384,16}{1 + \frac{(384,16 - 1)}{200}} = 132,01$$

Logo, baseado nos valores de nossa população, seriam indicadas 132 amostras.

5.6 Coleta das amostras

As amostras coletadas contendo fragmentos tumorais foram acondicionadas em microtubos, contendo um ml de RNA Later e transportadas em caixas térmicas a 4°C e enviadas ao Laboratório Multiusuário localizado no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão seguindo protocolos de cadastro e armazenamento. Após 24 horas, a amostra foi retirada do RNA later e armazenada em freezer a -80°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

5.7 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA genômico das amostras congeladas foi realizada conforme protocolo descrito pelo manual de uso do kit Dneasy Blood and Tissue. O DNA foi eluído em tampão TE e armazenado a -20°C até sua quantificação. A pureza e a concentração do DNA foram determinadas através do espectrofotômetro Nanovue. As amostras que tiveram a absorbância no comprimento de onda 260/280 nm entre 1,8-2,0 foram eluídas em tampão TE e diluídas a uma concentração de ~5 ng/μl.

5.8 PCR Nested

Para a identificação do DNA do HPV nas amostras de tumores do colo do útero, foi utilizada a técnica de amplificação do PCR Nested, esta técnica consiste na amplificação do DNA de interesse em duas rodadas, utilizando *primers* específicos para cada rodada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Com a realização de duas rodadas de PCR a primeira amplificação é realizada de forma mais abrangente e a segunda reação, que utiliza como produto o amplicon produzido na primeira rodada, leva à amplificação de sequências menores e mais específicas do DNA viral. A primeira rodada utiliza os *primers* PGMY 09 e 11, amplificando sequências de 450pb da região L1 do DNA viral; no segundo rodada são utilizados os primers GP+5 e GP+6, que amplificam sequências de 190pb da região L1 do DNA viral (VIDAL *et al.*, 2016). Para verificação da qualidade e existência de DNA nas amostras, foram utilizados os primers GH20 e PC04 para o gene constitutivo humano da β -globina. Como controle positivo da reação, foram utilizadas amostras conhecidamente positivas e, como controle negativo, foi utilizada água. Para minimizar a possibilidade de contaminação externa, as reações foram preparadas em capela de fluxo laminar exposta a luz ultravioleta por aproximadamente 15 minutos, juntamente com todo o material plástico a ser utilizado.

5.9 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. Uma alíquota de 5µL de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento e corante 0,1% de Gel Red sendo toda a mistura aplicada no gel. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

5.10 Purificação do produto da PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o kit Genelute PCR Clean up kit de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, USA). A cada microtubo foram adicionados 500 µL de tampão de captura a 100 µL de produto de PCR. O material foi centrifugado e 2 µL do DNA purificado foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 2 % para avaliação da amostra purificada.

5.11 Sequenciamento automático

A determinação dos genótipos do HPV foi realizada por sequenciamento automatizado do produto de PCR utilizando o sequenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare, UK). As reações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão localizado no Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC - UEMA). O sequenciamento foi realizado com o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados, em cada reação, 2 µL do produto de PCR purificado, 40 ng dos oligonucleotídeos específicos para o éxon utilizado (senso ou antisenso) e 2 µL de Big Dye.

Para a análise e alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foi utilizado o programa Chromas, obtendo-se eletroferogramas de sequências de DNA do HPV presentes nas amostras. Para a confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada a

comparação das sequências nucleotídicas das amostras sequenciadas, submetendo-as ao Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – Gene Bank, utilizando o programa BLAST (NCBI).

5.12 Identificação das variantes do HPV 16

Após a identificação dos tipos de HPV presentes, as amostras infectadas pelo tipo viral 16 foram submetidas a um novo protocolo de amplificação por PCR de regiões específicas do genoma viral, capazes de identificar a variante a qual pertence aquele tipo de HPV detectado. Foram utilizados dois pares de iniciadores, que amplificam toda a região LCR e o gene E6.

O produto da PCR foi posteriormente purificado e sequenciado de acordo com protocolo citado anteriormente. Sequências consenso foram unidas usando o software Geneious (Biomatters Ltd.) e todas as sequências geradas foram alinhadas de acordo com as linhagens específicas para o HPV 16, utilizando sequências referência propostas por Burk *et al* (2013) utilizando o software MEGA (versão 6.0, www.megasoftware.net). A análise das variantes do HPV 16 e a construção da árvore filogenética foi realizada no Instituto Nacional do Câncer (INCA), sob a supervisão do geneticista Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira.

5.13 Seguimento pós-tratamento oncológico

A avaliação de resposta local ao tratamento, preconizada para ocorrer 12 semanas após o término da Radioterapia, realizada com exame clínico ginecológico, exame citológico, tomografia computadorizadas e/ou ressonância nuclear magnética, nos casos duvidosos, realização de biópsia para comprovação de ausência/presença tumoral.

Foi utilizado o protocolo RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) que classifica em: resposta completa (100% de redução do volume tumoral inicial, sem evidência clínica ou radiológica de doença), resposta parcial (redução no volume tumoral inicial em pelo menos 50%), doença estável (definida como redução inferior a 25% do volume tumoral inicial ou progressão de até 25% do volume tumoral inicial) e progressão de doença (aumento superior a 25% do volume tumoral inicial).

5.14 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva utilizando o programa Stata (versão 14.0), sendo os dados apresentados na forma de figuras e tabelas. Para verificar associação entre o HPV e variáveis sociodemográficas e clínicas foi utilizado o teste χ^2 (Quadrado), sendo considerados estatisticamente significantes os valores de $p \leq 0,05$. Os valores referentes a **não sabe/não respondeu** foram excluídos da análise de associação.

5.15 Aspectos éticos

Foram cumpridos nesse estudo todos os princípios enunciados na Declaração de Helsinque e na Resolução 466 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, garantindo o sigilo, a confiabilidade e a dignidade dos sujeitos da pesquisa, bem como garantida sua autonomia e a defesa de sua vulnerabilidade.

O projeto de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEP-UFMA), sob Parecer Consubstanciado nº 1.289.419/2015 (ANEXO C).

6 RESULTADOS

6.1 Dados sociodemográficos

A população do estudo foi composta por 118 mulheres diagnosticadas com câncer cervical atendidas no Hospital do Câncer Aldenora Bello e no Hospital do Câncer Tarquínio Lopes Filho. A faixa etária variou entre 25 e 89 anos, com idade média ao diagnóstico de 50,6 anos. A faixa etária mais acometida ocorreu entre os 40 e 49 anos, com 35 casos (29,7%). Cerca de 82 (69,5%) mulheres se autodeclarou da cor parda. As casadas ou com união estável predominaram (51,7%) (Tabela 3).

Tabela 3: Dados Sociodemográficos das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, parte 1, (n = 118).

Variáveis Sociodemográficas (parte 1)	Pacientes incluídas	
	n = 118	(%)
Idade		
20 a 29 anos	8	6,8%
30 a 39 anos	21	17,8%
40 a 49 anos	35	29,7%
50 a 59 anos	19	16,1%
60 a 69 anos	18	15,3%
70 a 79 anos	14	11,9%
80 a 89 anos	3	2,5%
Raça/Cor de pele		
Branca	19	16,1%
Parda	82	69,5%
Preta	13	11,0%
Amarela	3	2,5%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%
Estado civil		
Solteira	39	33,0%
Casada/União Consensual	61	51,7%
Divorciada/Separada	6	5,1%
Viúva	11	9,3%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%

O tabagismo foi um hábito declarado por cerca de 50 mulheres (42,4%). O maior contingente de mulheres era formado por analfabetas (33,0%), apenas 22 mulheres (18,6%), tinham 12 anos ou mais de estudo. A renda per capita nas famílias de 76 mulheres (64,4%) era inferior a meio salário mínimo (valor correspondente de R\$ 880,00 na época). A maior parte das mulheres, 52 (44,1%) eram provenientes de municípios de baixo IDH. (Tabela 4).

Tabela 4: Dados Sociodemográficos das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, parte 2, (n = 118).

Variáveis Sociodemográficas (parte 2)	Pacientes incluídas	
	n = 118	(%)
Tabagismo		
Sim	50	42,4%
Não	67	56,8%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%
Escolaridade (anos de estudo)		
Nenhum	39	33,0%
Até 6 anos (primário)	20	16,9%
Até 9 anos (fundamental)	34	28,8%
Até 12 anos (médio)	20	16,9%
Acima 12 anos	2	1,7%
Não sabe/não respondeu	3	2,5%
Renda per capita (em salário mínimo-SM)		
até 1/4 SM	40	33,9%
Acima de 1/4 até 1/2 SM	36	30,5%
Acima de 1/2 até 1 SM	23	19,5%
Mais de 1 SM	11	9,3%
Não sabe/não respondeu	8	6,8%
IDH do município de origem		
Alto IDH	44	37,3%
Médio IDH	20	16,9%
Baixo IDH	52	44,1%
Muito Baixo IDH	1	0,8%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%
Município de origem		
Município de São Luís	39	33,0%
Outros Municípios do Maranhão	76	64,4%
Municípios de outros estados	2	1,7%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%

Os municípios de alto IDH do Maranhão foram na sua totalidade, representados por municípios da ilha de São Luís, com 43 (36,5%). Do total de mulheres, 78 (66,0%) residiam fora de São Luís-MA. (Tabela 5)

Tabela 5: Distribuição segundo IDH do Municípios de origem das pacientes com câncer de colo do útero, Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

Municípios de alto IDH			
São Luís	39	Paço do Lumiar	1
São José de Ribamar	3	Belém-PA	1
Municípios de médio IDH			
Bacabal	3	Rosário	1
Bequimão	2	Santa Inês	1
Chapadinha	2	Porto Rico do Maranhão	1
Cururupu	1	São Bento	1
Lago Rodrigues	1	São João dos Patos	1
Novo Progresso-PA	1	São Mateus	1
Pedreiras	1	Viana	2
Pinheiro	1		
Municípios de baixo IDH			
Alto Alegre do Maranhão	1	Olinda Nova do Maranhão	2
Alto Alegre do Pindaré	2	Palmeirândia	1
Arame	1	Penalva	3
Bacurituba	1	Peritoró	1
Barreirinhas	5	Pirapemas	1
Bela Vista do Maranhão	1	Poção das Pedras	1
Belagua	1	Santa Helena	1
Boa Vista do Gurupi	1	Santa Luzia	2
Buriticupu	1	Santa Quitéria	1
Codó	1	São Domingos do Maranhão	1
Coroatá	2	São João Batista	2
Gov. Eugenio Barros	1	São Vicente de Ferrer	1
Itapecuru Mirim	2	Timbiras	1
Lago da Pedra	2	Turiaçu	2
Lago do Junco	1	Urbano Santos	3
Maracaçumé	1	Vargem Grande	1
Mirador	1	Vitorino Freire	1
Monção	1	Zé Doca	1
Município de muito baixo IDH			
Marajá do Sena	1		

Observando o mapa que demonstra os municípios de origem das pacientes, percebe-se que a maioria das pacientes são oriundas da região metropolitana da ilha de São Luís e da região central do estado. Não sendo catalogados casos dos municípios de Imperatriz, Caxias e Timon, pela ordem, 2^a, 4^a e 5^a cidades mais populosas do estado, segundo o IBGE. (Figura 19).

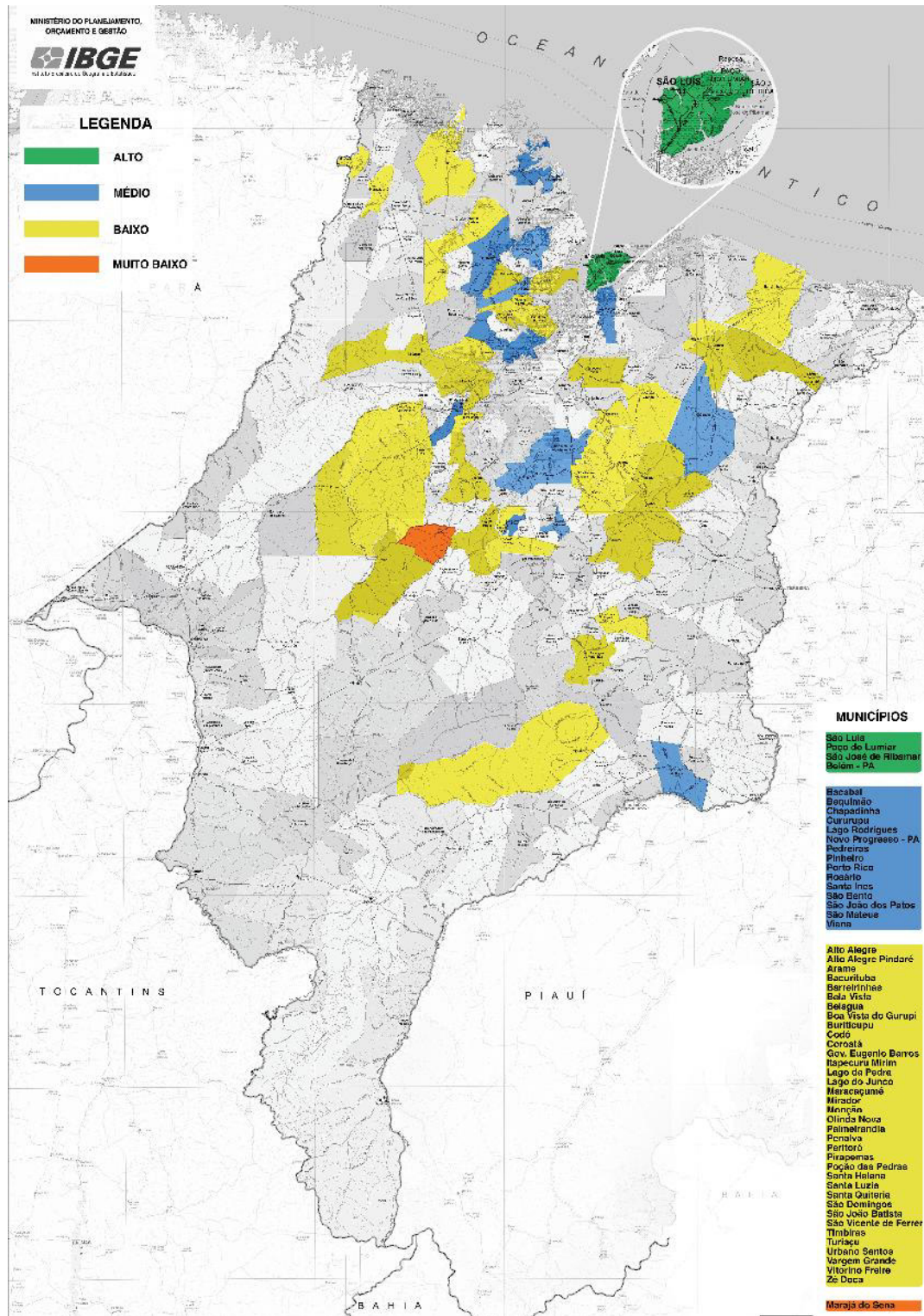


Figura 20: Mapa com os municípios de origem da população em estudo e IDH.

Avaliando a história reprodutiva, observou-se que 75 mulheres (63,6%) iniciaram atividade sexual antes dos 18 anos de idade, e 63 mulheres (53,4%) relataram ter tido até 2 parceiros sexuais ao longo da vida. Foi observada uma alta paridade, com 62 mulheres (52,6%)

tendo tido mais de 5 filhos. A maioria das mulheres, 87 (73,7%) relatou ter conhecimento da finalidade do preventivo, e cerca de 15 mulheres (12,7%) relataram não realizar preventivo e mais 48 mulheres (40,7%) o realizam com uma periodicidade superior a 3 anos ou de modo irregular (Tabela 6).

Tabela 6: História reprodutiva e conhecimento sobre preventivo das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

História reprodutiva e exame preventivo	Pacientes incluídas	
	n = 118	(%)
Idade de início da atividade sexual (anos)		
10 a 15 anos	38	32,2%
16 a 18 anos	37	31,5%
19 anos ou mais	20	16,9%
Não sabe/não respondeu	23	19,5%
Número de parceiros sexuais		
1	37	31,5%
2	26	22,0%
3	18	15,3%
4 ou mais	17	14,4%
Não sabe/não respondeu	20	16,9%
Número de partos		
Nenhum	4	3,4%
1 a 2	21	17,8%
3 a 4	29	24,6%
5 a 6	16	13,6%
7 a 8	22	18,6%
9 ou mais	24	20,3%
Não sabe/não respondeu	2	1,7%
Conhecimento sobre finalidade do preventivo		
Sim	87	73,7%
Não	29	24,6%
Não sabe/não respondeu	2	1,7%
Realização do preventivo antes do diagnóstico		
Sim	102	86,4%
Não	15	12,7%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%
Periodicidade de realização do preventivo		
Anualmente	43	36,4%
De 2 em 2 anos	9	7,6%
De 3 em 3 anos	2	1,7%
Irregular	48	40,7%
Não fazia	15	12,7%
Não sabe/não respondeu	1	0,8%

Nos antecedentes mórbidos familiares, foi observado um histórico familiar de câncer de útero em 23 das 118 mulheres (19,4%), e nestas foi verificado um menor conhecimento da finalidade do exame preventivo e uma menor realização do mesmo, demonstrando que este fato não apresenta poder de mobilizar as mulheres para sua precaução, mesmo acompanhando previamente familiar com essa neoplasia. O conhecimento sobre a finalidade do preventivo está associado à escolaridade, verifica-se que a proporção de pacientes que não sabem, é maior do que seria esperado na população com escolaridade até primário (que engloba pacientes com nenhuma escolaridade) (Tabela 7).

Tabela 7: Prática do exame preventivo das pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

Prática do exame preventivo	SIM		NÃO		p-valor
	n	(%)	n	(%)	
Finalidade do preventivo					
Antecedente familiar sem câncer de útero	71	76,3%	22	23,7%	0,5014
Antecedente familiar com câncer de útero	16	69,6%	7	30,4%	
Realização do preventivo					
Antecedente familiar sem câncer de útero	83	88,3%	11	11,7%	0,4644
Antecedente familiar com câncer de útero	19	82,6%	4	17,4%	
Finalidade do preventivo					
Escolaridade até primário	37	62,7%	22	37,3%	0,0031
Escolaridade nível fundamental	28	84,8%	5	15,2%	
Escolaridade nível médio ou superior	21	95,4%	1	4,6%	
Realização do preventivo					
Escolaridade até primário	49	83,0%	10	17,0%	0,3257
Escolaridade nível fundamental	30	88,2%	4	11,8%	
Escolaridade nível médio ou superior	21	95,4%	1	4,6%	

Foi verificada uma alta frequência de estádios avançados ao diagnóstico, o EC IIB foi registrado em 30 mulheres (25,4%) e o EC IIIB em 50 mulheres (42,4%). O carcinoma de células escamosas foi o mais frequente, com 94 casos (79,7%), enquanto o adenocarcinoma foi observado 11 vezes (9,3%). Cerca de 67 pacientes (56,8%) apresentam tumor com diâmetro maior de 4, 0 cm. A presença de metástase linfonodal foi observada em 12,7% dos casos. (Tabela 8).

Tabela 8: Fatores patológicos avaliados nas pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

Fatores patológicos	Pacientes incluídas	
	n = 118	(%)
Estadiamento		
EC 0	2	1,7%
EC IA1	1	0,8%
EC IB1	18	15,3%
EC IB2	1	0,8%
EC IIA	10	8,5%
EC IIB	30	25,4%
EC IIIB	50	42,4%
EC IVA	4	3,4%
EC IVB	2	1,7%
Tipo histológico		
Carcinoma de células escamosas	94	79,7%
Adenocarcinoma	11	9,3%
Carcinoma	8	6,8%
Neoplasia maligna	5	4,2%
Grau de diferenciação		
Grau I	12	10,2%
Grau II	41	34,7%
Grau III	36	30,5%
Grau IV	7	5,9%
Grau não avaliado	22	18,6%
Diâmetro tumoral		
Até 4,0 cm	49	41,5%
Maior de 4,0 cm	67	56,8%
Não avaliado	2	1,7%
Metástase linfonodal		
Sim	15	12,7%
Não	60	50,8%
Não avaliado	43	36,4%

Em relação ao tratamento realizado, observa-se que a Cirurgia (seguida ou não por adjuvância com Radioterapia e/ou Quimioterapia) foi o procedimento realizado por 25 mulheres (21,1%), em sua maioria eram portadoras de estágio clínicos iniciais. O tratamento com Radioterapia e Quimioterapia usadas isoladamente ou associadas, foi usado por 64 mulheres (54,2%), em sua maioria portadoras de estágios clínicos avançados. Um total de 06 pacientes (5,0%) realizou tratamento em outra cidade e cerca de 20 mulheres (16,9%) não realizou tratamento (Tabela 9).

Tabela 9: Estadiamento clínico e tratamento realizado nas pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

Tratamento realizado	EC 0	EC I	EC II	EC III	EC IV	n = 118	(%)
Cirurgia	1	11	1	0	1	14	11,8%
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	0	6	2	0	0	8	6,7%
Cirurgia + Radioterapia	0	1	2	0	0	3	2,5%
Radioterapia + Quimioterapia	0	1	27	30	1	58	49,1%
Radioterapia	0	0	0	7	0	7	5,9%
Quimioterapia	0	0	0	1	0	1	0,8%
Realizou tratamento em outra cidade	0	0	2	3	1	6	5,0%
Não realizou tratamento	1	1	6	9	3	20	16,9%

6.2 Análise dos tipos de HPV

A pesquisa do HPV foi positiva em 104 amostras (88,1%). Cerca de 98 amostras eram de HPV de alto risco oncogênico (HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 45, HPV 52, HPV 58 e HPV 59), 04 amostras eram de HPV de baixo risco (HPV 09 e HPV 53) e em 02 amostras foi observada coinfeção. O HPV 16 com 63 amostras (53,3%) foi o mais frequente, seguido do HPV 18 com 12 amostras (10,2%), HPV 35 com 06 amostras (5,1%), HPV 45 com 05 amostras (4,2%), HPV 52 com 04 amostras (3,4%), HPV 9 com 03 amostras (2,5%), HPV 33 com 03 amostras (2,5%), HPV 31 com 02 amostras (1,7%), HPV 58 com 02 amostras (1,7%), HPV 53 e HPV 59 com 1 amostra (0,8%) cada (Figura 21).

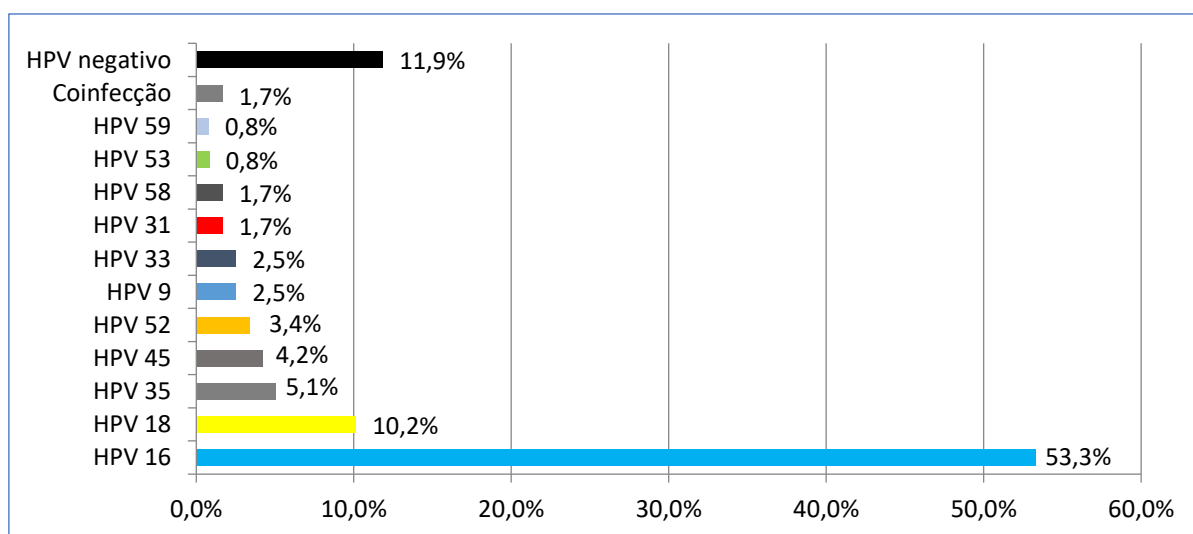


Figura 21: Frequência dos tipos de HPV encontrados na população estudada (n = 118).

A distribuição dos tipos de HPV por faixa etária, mostra que os tipos mais prevalentes, HPV 16 e HPV 18, tiveram sua maior frequência na 5ª década de vida (Figura 22).

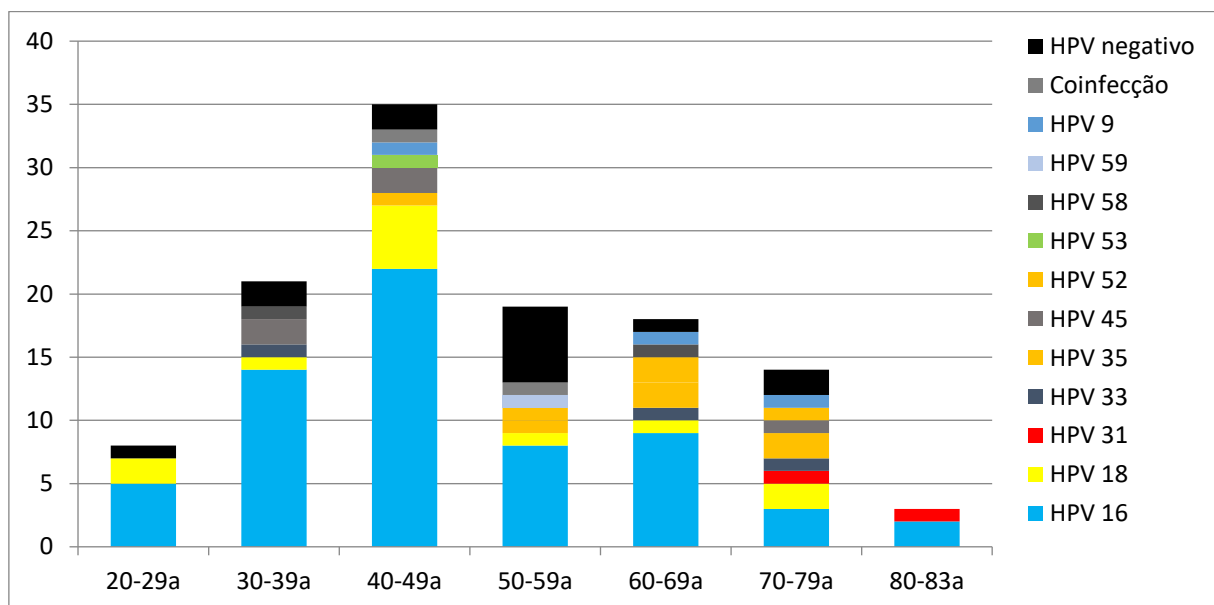


Figura 22: Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a faixa etária (n = 118).

O carcinoma de células escamosas foi observado em 53 amostras (84,1%) do HPV 16 e em 8 amostras (66,7%) do HPV 18. Proporcionalmente, o adenocarcinoma foi mais frequente no HPV 18, onde ocorreu em 03 amostras (25%), do que no HPV 16, onde se registrou em 4 amostras (6,3%) (Tabela 10).

Tabela 10: Frequência dos tipos de HPV de acordo com o tipo histológico do câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

Tipo	Carcinoma de células escamosas				Neoplasia maligna				p-valor
	Adenocarcinoma	Carcinoma			Adenocarcinoma	Carcinoma			
HPV 16	53	84,1%	4	6,3%	3	4,8%	3	4,8%	0,4912
HPV 18	8	66,7%	3	25,0%	0	0,0%	1	8,3%	
HPV 31	2	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
HPV 33	2	66,7%	0	0,0%	1	33,3%	0	0,0%	
HPV 35	6	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
HPV 45	4	80,0%	1	20,0%	0	0,0%	0	0,0%	
HPV 52	3	75,0%	0	0,0%	1	25,0%	0	0,0%	
HPV 53	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
HPV 58	1	50,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,0%	
HPV 59	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
HPV 9	3	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Coinfecção	2	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
HPV Negativo	8	57,1%	3	21,4%	3	21,4%	0	0,0%	

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o grau histopatológico e o estadiamento clínico com os tipos de HPV encontrados (Tabela 11).

Tabela 11: Frequência dos tipos de HPV de acordo com o grau histológico e estadiamento clínico do câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 118).

Tipo	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV	Grau IV	p-valor
HPV 16	5	21	20	3	14	0,4544
HPV 18	2	4	3	2	1	
HPV 31	0	0	2	0	0	
HPV 33	0	1	1	1	0	
HPV 35	1	3	1	0	1	
HPV 45	1	2	2	0	0	
HPV 52	0	2	0	0	2	
HPV 53	0	1	0	0	0	
HPV 58	0	0	1	1	0	
HPV 59	1	0	0	0	0	
HPV 9	0	2	1	0	0	
Coinfecção	0	2	0	0	0	
HPV Negativo	2	3	5	0	4	
Tipo	EC 0	EC I	EC II	EC III	EC IV	p-valor
HPV 16	2	8	18	31	4	0,1929
HPV 18	0	3	7	1	1	
HPV 31	0	0	2	0	0	
HPV 33	0	1	1	1	0	
HPV 35	0	2	0	4	0	
HPV 45	0	3	2	0	0	
HPV 52	0	0	2	2	0	
HPV 53	0	0	0	1	0	
HPV 58	0	0	0	2	0	
HPV 59	0	0	0	0	1	
HPV 9	0	0	1	2	0	
Coinfecção	0	0	2	0	0	
HPV Negativo	0	3	5	6	0	

6.3 Análise das variantes do HPV 16

Do total de 63 amostras de HPV 16, em seis amostras não foi possível a identificação de variante intratipo, restando então 57 amostras que puderam ter a variante identificada, sendo 33 amostras (57,8%) da linhagem A, 02 amostras (3,5%) da linhagem B, 02 amostras (3,5%) da linhagem C e 20 amostras (35,0%) da linhagem D (Figura 23).

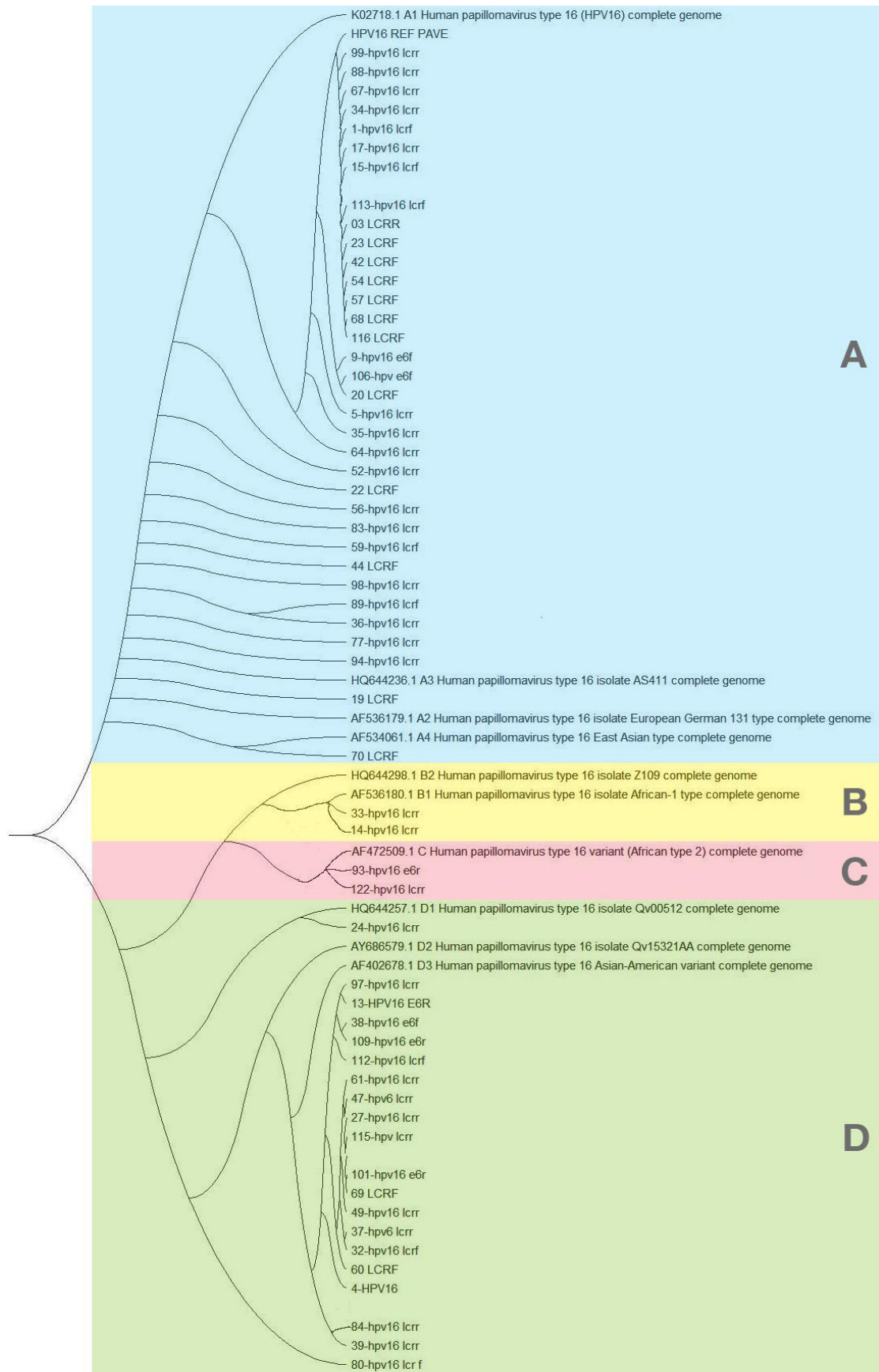


Figura 23: Árvore filogenética com identificação das linhagens do HPV 16.

Em relação à idade, a média foi de 48,3 anos para linhagem A, 58,5 para linhagem B, 58,5 para linhagem C e 46,4 para a linhagem D. O tipo histológico de maior prevalência foi o carcinoma de células escamosas, com 48 amostras (84,2%); seguido do adenocarcinoma, com 4 amostras (7,0%), destas, três eram pertencentes à linhagem D. As lesões maiores de 4,0 cm foram maioria, com 37 amostras (64,9%). O estágio clínico III, foi o mais observado, com 28 casos (49,1%) (Tabela 12).

Tabela 12: Fatores patológicos e linhagens do HPV 16 nas pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 57).

Fatores patológicos	Linhagens do HPV 16				n = 57	(%)
	16 A	16 B	16 C	16 D		
Idade						
20-29 anos	4	0	0	1	5	8,7%
30-39 anos	7	0	0	5	12	21,0%
40-49 anos	9	0	1	8	18	31,5%
50-59 anos	4	1	0	3	8	14,0%
60-69 anos	6	1	0	2	9	15,7%
70-79 anos	2	0	1	0	3	5,2%
80-83 anos	1	0	0	1	2	3,5%
Tipo histológico						
Carcinoma células escamosas	30	2	1	15	48	84,2%
Adenocarcinoma	1	0	0	3	4	7,0%
Carcinoma	1	0	0	1	2	3,5%
Neoplasia maligna	1	0	1	1	3	5,2%
Diâmetro tumoral						
Até 4,0 cm	9	0	1	9	19	33,3%
Maior de 4,0 cm	23	2	1	11	37	64,9%
Não avaliado	1	0	0	0	1	1,7%
Estadiamento						
EC 0	1	0	0	0	1	1,7%
EC I	4	0	0	3	7	12,2%
EC II	11	0	1	5	17	29,8%
EC III	16	1	1	10	28	49,1%
EC IV	1	1	0	2	4	7,0%

6.4 Tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia

Do total de 118 pacientes, cerca de 24 mulheres (20,3%) realizaram o tratamento com Quimioterapia, Teleterapia e Braquiterapia e puderam ser avaliadas quanto à resposta na primeira consulta de seguimento. O tratamento realizado consistiu de Quimioterapia, à base de cisplatina, na dose de 40 mg/m², com 6 ciclos semanais, associado à Radioterapia externa (Teleterapia) convencional, cuja dose variou entre 45 Gy e 50,4 Gy, em 25 à 28 frações e Braquiterapia de alta taxa de dose, com dose de 28 à 30 Gy no ponto A. O tratamento foi de um modo geral bem tolerado, a maior toxicidade relatada foi a gastrointestinal grau II, em 12 pacientes (50,0%), houveram poucas reações grau III, quando é necessário interromper o tratamento (Tabela 13).

Tabela 13: Toxicidade ao tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia, em pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 24).

	Toxicidade cutânea		Toxicidade gastrointestinal		Toxicidade hematológica	
Grau 0	16	66,6%	3	12,5%	19	79,2%
Grau I	5	20,8%	8	33,3%	0	0,0%
Grau II	2	8,3%	12	50,0%	3	12,5%
Grau III	1	4,2%	1	4,2%	2	8,3%

Quanto à avaliação do tipo de HPV, 12 mulheres eram portadoras do HPV 16, 2 mulheres eram portadoras de HPV 18, 4 eram HPV negativo, e o restante com 1 amostra cada tivemos HPV 9, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 58 e uma coinfeção.

O retorno para avaliação da resposta ao tratamento ocorreu 110,3 dias, em média. Devido ao número reduzido de pacientes as categorias: resposta parcial, doença estável e progressão de doença foram unificadas para serem consideradas “tumor presente”, enquanto que a categoria resposta completa, foi considerada “tumor ausente”.

Neste grupo de 24 pacientes, observou-se que 17 pacientes (70,8%) obtiveram resposta completa ao tratamento no seu primeiro retorno. A idade variou entre 25 e 79 anos, com idade média de 52,5 anos. Um total de sete mulheres (29,28%), apresentavam anemia, com valor de hemoglobina inferior a 10,0 g/dL, necessitando transfusão sanguínea. Cerca de 20 amostras (83,3%) eram carcinoma de células escamosas. Os tumores maiores de 4,0 cm foram a maioria, com 13 casos (54,1%) e apresentaram pior resposta ao tratamento que o grupo de pacientes com tumores de até 4,0 cm. A análise do grau histológico mostrou que quanto maior o grau, maior

é a presença de tumor residual ou recidivado (Tabela 14). Das 12 pacientes portadoras de HPV 16, a resposta completa foi observada em 10 pacientes (83,3%).

Tabela 14: Avaliação de resposta ao tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia, em pacientes com câncer de colo do útero, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 24).

	Tumor ausente		Tumor presente		Total	p-valor
	n	(%)	n	(%)	n = 24	
Idade						
20-29 anos	1	50,0%	1	50,0%	2	0.8571
30-39 anos	1	100,0%	0	0,0%	1	
40-49 anos	6	85,7%	1	14,3%	7	
50-59 anos	3	60,0%	2	40,0%	5	
60-69 anos	4	66,7%	2	33,3%	6	
70-79 anos	2	66,7%	1	33,3%	3	
Hemoglobina						
Menor que 10,0 g/dL	5	71,4%	2	28,6%	7	0.8576
Igual ou maior de 10,0 g/dL	12	70,6%	5	29,4,%	17	
Tipo histológico						
Carcinoma células escamosas	15	75,0%	5	25,0%	20	0.604
Adenocarcinoma	1	50,0%	1	50,0%	2	
Neoplasia maligna	1	50,0%	1	50,0%	2	
Dimensão tumoral						
Até 4,0 cm	9	81,8%	2	18,2%	11	0.2761
Maior de 4,0 cm	8	61,5%	5	38,5%	13	
Grau histológico						
Grau I	2	100,0%	0	0,0%	2	0.3788
Grau II	5	62,5%	3	37,5%	8	
Grau III	4	57,1%	3	42,9%	7	
Grau IV	1	50,0%	1	50,0%	2	
Grau não avaliado	5	100,0%	0	0,0%	5	

6.5 Avaliação de resposta ao tratamento nas linhagens do HPV 16

Das 57 mulheres que tiveram variante de HPV 16 identificadas, um total de 11 pacientes realizou tratamento com Quimioterapia, Radioterapia externa e Braquiterapia; sendo sete do grupo europeu, portadoras da linhagem A, e quatro do grupo não europeu, sendo duas portadoras da linhagem C e duas portadoras da linhagem D. A faixa etária variou entre 25 e 76 anos, com idade média de 46,5 anos. O carcinoma de células escamosas foi o tipo histológico

mais frequente, sendo observado em 10 mulheres (90,9%). Os tumores eram bem avançados, em nove mulheres (81,8%), mediam mais de 4,0 cm. O estágio clínico IIIB foi o mais frequente, com 07 pacientes (63,6%). A avaliação de resposta ao tratamento ocorreu três meses após seu término. A resposta completa ocorreu em nove pacientes (81,8%), sendo cinco da linhagem A, nas duas da linhagem C e nas duas da linhagem D. Os casos de resposta parcial e progressão de doença ocorreram, uma vez com pacientes portadoras da linhagem A (Tabela 15).

Tabela 15: Avaliação de resposta ao tratamento com Quimioterapia + Teleterapia + Braquiterapia, em pacientes com câncer de colo do útero e portadoras de variantes do HPV 16, São Luís – Maranhão, 2016-2018, (n = 11).

Linhagens do HPV 16					
				n = 11	(%)
Idade	16 A	16 C	16 D		
Idade média (anos)	44,4	58,5	42,0		
Tipo histológico	16 A	16 C	16 D		
Carcinoma células escamosas	7	1	2	10	90,9%
Neoplasia maligna	0	1	0	1	9,1%
Grau histológico	16 A	16 C	16 D		
Grau II	2	0	2	4	36,4%
Grau III	1	1	0	2	18,2%
Grau IV	0	1	0	1	9,1%
Grau não avaliado	4	0	0	4	36,4%
Diâmetro tumoral	16 A	16 C	16 D		
Até 4,0 cm	1	1	0	2	18,2%
Maior de 4,0 cm	6	1	2	9	81,8%
Estadiamento	16 A	16 C	16 D		
EC IIA	2	0	0	2	18,2%
EC IIB	1	1	0	2	18,2%
EC IIIB	4	1	2	7	63,6%
Avaliação de resposta	16 A	16 C	16 D		
Resposta completa	5	2	2	9	81,8%
Resposta parcial	1	0	0	1	9,1%
Progressão de doença	1	0	0	1	9,1%

7 DISCUSSÃO

A presente pesquisa faz parte de um projeto guarda chuva, que teve como objetivo principal estimar a frequência dos tipos de HPV e das variantes do HPV 16, em tumores de colo do útero, em mulheres atendidas nos dois principais hospitais de referência de atenção oncológica do estado do Maranhão, abrangendo o período de abril de 2016 até abril de 2018. Além de descrever o perfil sociodemográfico e epidemiológico desta população, buscou-se avaliar a associação dos fatores patológicos dos tumores com os tipos de HPV e variantes do HPV 16 encontrados. Finalmente, estudou-se a resposta ao tratamento realizado com Quimioterapia, Radioterapia e Braquiterapia com especial atenção nas portadoras de variantes do HPV 16. O projeto foi um estudo descritivo, prospectivo e transversal, com as coletas sendo realizadas de forma contínua e consecutiva, em mulheres atendidas no setor de Ginecologia Oncológica destes dois hospitais.

A análise do perfil sociodemográfico da população em estudo ratifica os estudos que associam o câncer de colo de útero com mulheres de meia idade, de baixa escolaridade, de baixa renda, múltiparas e provenientes de regiões de baixo IDH. Em relação à idade, é descrito na literatura que a maior incidência de câncer cervical ocorre em mulheres de meia idade, com pico na média de 50,9 anos (Munoz *et al.*, 2003; Castellsague, 2008; De Sanjose *et al.*, 2010). O INCA recomenda a realização de preventivo em mulheres entre os 25 e 64 que já tiveram relação sexual. No presente estudo a idade média foi de 50,6 anos, sendo que a menor idade observada foi 25 anos. Vale ressaltar que 25 mulheres (21,2% do total) tinham idade superior a 64 anos que poderiam representar uma clientela que não frequentava serviços de saúde ou que frequentavam devido outras patologias comuns nessa faixa etária como hipertensão arterial, mas eram resistentes a realização do exame preventivo.

O Brasil é um país com padrão elevado de miscigenação racial, principalmente de pessoas com origem europeia, africana e indígena; neste estudo, cerca de 69,5% das mulheres se autodeclararam pardas. A maioria das mulheres (51,7%%) era casada ou em união consensual. Chama a atenção o baixo nível de instrução, com 33,0% de mulheres sendo iletradas e 16,9% com apenas o ensino primário. A renda familiar registrada também foi baixa, com 64,4% das famílias recebendo renda per capita inferior a meio salário mínimo. Esses dados ratificam as associações já descritas em outros estudos (Eluf-Neto *et al.*, 1994; Castellsague, 2008; Berraho *et al.*, 2017) que associam maior risco de câncer cervical a um baixo nível de instrução e baixa

renda. A pesquisa mostrou que a maioria das pacientes era oriunda de cidades de baixo IDH (44,1%) que está associado a um menor acesso aos serviços de saúde, o que pode levar a um retardo para busca por auxílio médico. Os dados socioeconômicos influenciam no conhecimento da importância da prevenção das doenças e tem impacto em identificar doenças em estágios mais iniciais (Musselwhite *et al.*, 2016). Além do IDH, a distância geográfica pode influenciar no acesso ao tratamento oncológico. Neste estudo, cerca de 33,0% informaram ser provenientes da capital, enquanto que 64,5% informaram ser de outras cidades do estado. Ao se avaliar o mapa com a localização das cidades das pacientes, percebe-se que a maioria são da ilha de São Luís e do centro do estado. Pode se aventar que as regiões dos extremos leste, oeste e sul do estado estejam drenando pacientes para cidades mais próximas que São Luís e que também disponham de centros de referência em oncologia, como Imperatriz-MA, Teresina-PI e Palmas-TO.

O tabagismo é um fator de risco costumeiramente relacionado com o câncer de colo do útero (Eluf-Neto *et al.*, 1994; Munoz *et al.*, 2003; Schiffman *et al.*, 2010), nesta pesquisa foi um hábito descrito por 42,4% das pacientes. A coitarca precoce, multiplicidade de parceiros e multiparidade são considerados fatores de risco para a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de câncer cervical (Almonte *et al.*, 2008; Berraho *et al.*, 2017). No presente estudo, 32,2% iniciaram vida sexual até os 15 anos e 31,5% iniciaram entre os 16 e 18 anos. Essa precocidade sexual está associada a uma maior persistência de infecção pelo HPV, devido o epitélio cervical ainda não estar maduro (Hwang *et al.*, 2009). Em relação a quantidade de parceiros sexuais, a maioria (53,5%) relatou até dois parceiros, e apenas 14,4% relataram quatro ou mais parceiros ao longo da vida sexual. A multiparidade foi um evento bastante frequente neste estudo, com cerca de 52,5% das mulheres tendo cinco ou mais partos. O risco de desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas aumenta de acordo com o aumento das gestações, o risco aumenta 3,8 vezes se a mulher tiver sete ou mais partos; e o menor número de partos mundialmente, já tem sido inquirida como fator contribuinte para a diminuição do câncer de colo do útero (Munoz *et al.*, 2002).

Sobre o preventivo ginecológico, houve um distanciamento entre o conhecimento de sua importância e sua realização adequada. A maioria (73,7%) relatou conhecimento sobre a finalidade do preventivo e 86,4% relataram ter feito preventivo antes do diagnóstico de neoplasia cervical, mas ao avaliarmos a periodicidade de sua realização, apenas 44,0% realizavam regularmente com intervalo de até dois anos. A elevação dos anos de estudo está associada a uma maior procura dos serviços de saúde para realização do preventivo ginecológico (Jain *et al.*, 2017). Na população em estudo, cerca de 19,4% relataram histórico

de familiar próximo com câncer de colo de útero, que foi separado em um grupo e comparado com o restante que não tinha antecedente familiar de câncer cervical. No grupo com antecedente de câncer cervical na família foi observado um menor conhecimento da finalidade do preventivo, uma menor realização do mesmo. Também foi avaliado o papel da escolaridade no conhecimento da finalidade do preventivo, e foi estatisticamente significativo ($p = 0,0031$), em especial quando comparadas as mulheres com escolaridade até primário (que engloba as sem escolaridade).

O carcinoma de células escamosas foi o tipo histológico mais frequente, com 79,7% dos casos, seguido do adenocarcinoma, com 9,3%. A literatura descreve que além de ser mais frequente, o carcinoma de células escamosas também apresenta melhor prognóstico que o adenocarcinoma (Bray, Carstensen, *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010). Os tumores eram avançados em sua maioria, com 56,8%, medindo mais de 4,0 cm. O estágio clínico ao diagnóstico pode representar um indicador do acesso ao sistema de saúde e nível de educação das pacientes. Nesta pesquisa observou-se que a maior parte das pacientes foi diagnosticada em estágios avançados, 25,4% eram EC IIB, 42,4% eram EC IIIB, e 5,1% já eram EC IV; todos estágios em que a cirurgia não é considerada como tratamento com finalidade curativa e realizam tratamento com Radioterapia e Quimioterapia como única opção. Este grande percentual de casos avançados está de acordo com o observado no Brasil, em que o EC II e EC III são observados em 29,8% e 39,5% dos casos, respectivamente (Thuler *et al.*, 2014); porém deve-se atentar que ocorre uma tendência destes tumores serem diagnosticados em fases mais iniciais, quanto melhor o nível instrucional e melhor acesso ao sistema de saúde, fato observado em países mais avançados (Bray e Moller, 2006). Ao analisar o tratamento realizado, observa-se que a cirurgia foi um procedimento realizado, sozinho ou associado a outra modalidade, em 21,0% dos casos, e em sua maioria eram tumores em estágios iniciais. Os tumores mais avançados fizeram tratamento com as modalidades de Radioterapia e Quimioterapia. Cerca de 5,0% das pacientes relataram ter feito tratamento oncológico em outra cidade e 16,9% não realizaram tratamento, incluindo-se neste percentual pacientes com estágio clínico inicial, o que se pode inferir que distância ao centro de tratamento, nível educacional e estigmas relacionados ao diagnóstico do câncer possam influenciar na realização do tratamento (Zeferino, 2008).

A relação do HPV com lesões pré-neoplásicas e câncer de colo de útero está bem documentada (Zur Hausen, 1976; Bosch *et al.*, 1995). A prevalência do HPV em amostras de câncer cervical costuma variar entre 70% e valores próximos de 100%, principalmente de acordo com a técnica utilizada (Eluf-Neto *et al.*, 1994; Coutlee *et al.*, 2002; De Sanjose *et al.*, 2010; Schiffman *et al.*, 2010). Em nossa casuística a pesquisa do HPV foi positiva em 88,1%

dos casos. O HPV 16 é mais prevalente, sendo encontrado em metade das amostras de câncer cervical, seguido do HPV 18, juntos são responsáveis por 70% dos tumores de colo de útero, estudos mundiais relatam prevalência de 54-57% do HPV 16, e de 16% para o HPV 18 (Crow, 2012; Guan *et al.*, 2012). A frequência dos demais tipos de HPV costuma variar de acordo com a região geográfica, o terceiro tipo mais comum de HPV já foi registrado como o HPV 31, em São Paulo (Eluf-Neto *et al.*, 1994), HPV 58, no Nordeste (Fernandes *et al.*, 2010). Em nossos resultados, os cinco tipos de HPV mais frequentes foram HPV 16 (53,3%), HPV 18 (10,2%), HPV 35 (5,1%), HPV 45 (4,2%) e HPV 52 (3,4%). O HPV 31 e o HPV 38, foram o oitavo e o nono tipos mais frequentes, com 1,7%, cada. Os dados encontrados ratificam a variação na prevalência dos tipos de HPV. Foi avaliada a relação dos tipos de HPV com aspectos sociodemográficos e fatores de risco para o câncer cervical, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Os dados da literatura costumam indicar que as pacientes com HPV 16 e HPV 18 são diagnosticadas em idade menor que a dos demais tipos (De Sanjose *et al.*, 2010; Saraiya *et al.*, 2014). Em nossa pesquisa, as pacientes com HPV 16 e HPV 18, tiveram idade média ao diagnóstico, de 47,5 e 48,5 anos, enquanto todo o grupo teve idade média de 50,6 anos. Os estudos que avaliaram a relação dos tipos histológicos com os tipos de HPV, mostram que o carcinoma de células escamosas é o tipo histológico mais encontrado entre todos os tipos de HPV, e o adenocarcinoma é o segundo tipo histológico mais frequente, porém sua incidência aumenta no HPV 18 (Altekruse *et al.*, 2003; Burk *et al.*, 2009; Nogueira Dias Genta *et al.*, 2017). Em nossa pesquisa o carcinoma de células escamosas foi presente em 84,1% dos casos com HPV 16, e em 66,7% dos casos com HPV 18; já o adenocarcinoma foi observado em 6,3% dos casos com HPV 16, e em 25,0% dos casos com HPV 18, confirmando os relatos da literatura. Não foi observada relação entre grau histológico ou estadiamento clínico com os tipos de HPV encontrados na pesquisa.

Os estudos que comparam o DNA humano com o DNA do HPV, sugerem que a divergência evolucionária que levou ao surgimento de diferentes tipos e variantes intratipo acompanharam os padrões da migração humana, o que pode ser comprovado pela variação na distribuição de tipos e linhagens de acordo com aspectos geográficos e étnicos (Chan *et al.*, 1992; Burk *et al.*, 2003). Essas divergências do padrão genômico dentro de um mesmo tipo de HPV propiciam variação na persistência da infecção pelo vírus, no risco de desenvolvimento de lesões precursoras e câncer cervical (Bernard *et al.*, 2006; Burk *et al.*, 2013), o que seria em parte responsável pelas diferentes taxas de câncer cervical no mundo. Estudos que avaliaram mundialmente a prevalência das linhagens do HPV 16, demonstraram que a linhagem A é mais

frequente em populações com ascendência europeia, as linhagens B e C são mais comuns no continente africano, e a linhagem D é mais prevalente em populações ameríndias (Ho *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1997). O trabalho de Yamada *et al.* (1997) que analisou amostras por continente mostrou a seguinte prevalência de linhagens do HPV 16: Europa (A = 86,0%, B = 0%, C = 0%, D = 14,0%), América do Norte (A = 96,6%, B = 0%, C = 3,3%, D = 0%), América Latina (A = 85,7%, B = 2,2%, C = 1,3%, D = 19,7%), Ásia (A = 85,7%, B = 0%, C = 8,6%, D = 5,7%) e África (A = 9,4%, B = 60,9, C = 29,7%, D = 0%).

Dentre os trabalhos realizados no Brasil, destaca-se pesquisa realizada em Belém-PA, que numa população de 63 casos de câncer cervical invasivo, infectadas por HPV 16, após a exclusão de seis casos de coinfeção, foram obtidas foram obtidas 57 amostras com a seguinte prevalência de linhagens (A = 45,6%, B = 1,7%, C = 1,7%, D = 50,8%) e o estudo de coorte realizado no Rio de Janeiro-RJ, que em 334 amostras de câncer cervical com presença de HPV 16, observou-se a frequência de linhagens (A = 64,9%, B = 2,9%, C = 2,9%, D = 29,0%) (Junes-Gill *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2016). Neste estudo, realizado em São Luís-MA, foi registrado um total de 57 amostras de HPV 16 que tiveram a linhagem identificada, sendo 33 amostras (57,8%) da linhagem A, 02 amostras (3,5%) da linhagem B, 02 amostras (3,5%) da linhagem C e 20 amostras (35,0%) da linhagem D. O percentual das variantes A e D, ficou em níveis intermediários em relação aos estudos realizados no Pará e Rio de Janeiro, o que pode ser resultado de miscigenação da população desses estados, onde sabidamente o sudeste brasileiro apresenta um maior percentual de indivíduos de origem europeia, onde foi observado maior índice da variante A, e o norte do Brasil, onde há uma maior porcentagem de população de origem ameríndia teve o maior percentual de variante D. Chama a atenção que de todos os estudos comentados em nível nacional ou mundial, apenas na África, as variantes B e C apresentem percentual significativo, quando seria esperado uma maior participação dessas variantes em uma população com forte ancestralidade africana, como no caso do Brasil.

A variabilidade no material genético das variantes do HPV 16 pode propiciar diferença na prevalência dos tipos histológicos tumorais, a exemplo do que ocorre nos diferentes tipos de HPV, onde a frequência do adenocarcinoma é maior no HPV 18 que no HPV 16 (Altekruse *et al.*, 2003). Um estudo que avaliou a prevalência de variantes do HPV 16 em amostras de tumor cervical de regiões da Europa, América Latina e Ásia, mostrou que nos carcinomas de células escamosas o percentual da linhagem A variou entre 83,7% e 97% e da linhagem D variou entre 3,0% e 16,3%, já quando avaliamos os adenocarcinomas, a linhagem A variou de 36,6% a 67,9% e a linhagem D variou entre 28,6 e 63,3% (Nicolas-Parraga *et al.*, 2017). Em nossas amostras, na linhagem A, o percentual de carcinoma de células escamosas foi de 90,1% e de

adenocarcinoma foi de 3,0%, já quando avaliamos a linhagem D, foi observado uma prevalência de 75,0% de carcinoma de células escamosas e de 25,0% de adenocarcinoma. Uma limitação em nosso estudo foi a não classificação em sublinhagens, várias amostras tiveram dúvida quanto a que sublinhagem pertenceriam, diminuindo a casuística, além de que o aumento das categorias dificultaria a análise estatística. O maior estudo já realizado com variantes do HPV 16, avaliou 3.215 mulheres com lesões precursoras e lesões malignas invasivas de colo uterino, demonstrou que mesmo dentro das linhagens ocorrem diferenças. Quando comparada com as sublinhagens A1/A2, a sublinhagem A4 foi associada a um risco 3,16 vezes maior de desenvolver câncer e a um risco 9,8 vezes maior de adenocarcinoma. Enquanto que as sublinhagens D2 e D3, tiveram respectivamente riscos de 137,3 e 59,4 vezes maior de desenvolverem adenocarcinoma que as sublinhagens A1/A2. Aparentemente as sublinhagens A4, D2 e D3 apresentam maior habilidade para infeccionar células epiteliais glandulares (Mirabello *et al.*, 2016)

O tratamento com Quimioterapia, baseada em Cisplatina, associada a Radioterapia tem sido o tratamento recomendado para pacientes com tumores com estadiamento IB2-IVA nos últimos 20 anos. A publicação quase simultânea de estudos randomizados demonstraram uma melhora tanto na sobrevida livre de doença quanto na sobrevida geral, quando comparada com o então tratamento standard de Radioterapia com Quimioterapia com Hidroxiuréia (Morris *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1999; Whitney *et al.*, 1999); bem como metanálises demonstraram significativa melhora na sobrevida da Quimioterapia concomitante a Radioterapia, quando comparada a Radioterapia isolada (Green *et al.*, 2005). Diversas drogas como Cisplatina, 5-Fluoracil e mais recentemente o Paclitaxel tem sido usadas como radiosensibilizadoras, com objetivo de agir sinergicamente, inibindo reparo do dano subletal, diminuindo a hipóxia e promovendo a sincronização de células tumorais em fases mais sensíveis à Radioterapia (Chen *et al.*, 1997; Pignata *et al.*, 2000). O regime mais comumente utilizado é a Quimioterapia semanal, com 40mg/m² de cisplatina (Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis, 2008). A Radioterapia é administrada com campos pélvicos, com dose de 50,4 Gy, seguida de reforço preferencialmente com Braquiterapia (Klopp e Eifel, 2011). Apesar da alta dose aplicada, em virtude da maioria dos tumores tratados com essa modalidade já serem estágios avançados, as falhas não são comuns. O uso da Radioterapia isolada fornece um controle locoregional de 60% para o estágio III (Perez *et al.*, 1983). A resposta completa após a Radioterapia representa um fator preditivo de sobrevida, visto que a taxa de sobrevida em cinco anos é de 76%, quando é conseguida a resposta completa, e é de 41%, quando não é alcançada a resposta completa (Jacobs *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 2016).

Em nossa pesquisa, 24 pacientes realizaram o tratamento com Quimioterapia, Teleterapia e Braquiterapia. A Teleterapia, realizada com técnica convencional de quatro campos, mostrou-se bem tolerável. A maior toxicidade observada, ainda que moderada foi a gastrointestinal, grau I (33,3%) e grau II (50,0%), ainda que nesses níveis não seja necessário interromper o tratamento. As toxicidades grau III, quando é necessária pausa no tratamento e uso de sintomáticos, foram registradas pequena quantidade (cutânea grau III em 4,2%, gastrointestinal grau III em 4,2%, hematológica grau III em 8,3%). Não foram observadas toxicidades grau IV. O uso de técnicas de planejamento mais avançadas, como a conformacional e a de intensidade modulada, permitiria aumentar a dose no tumor e diminuir o volume de órgãos sadios irradiados (Forrest *et al.*, 2012). A resposta completa foi alcançada em 17 (70,8%). Os tumores maiores que 4,0 cm tiveram pior resposta completa (61,5%) quando comparados aos tumores menores (81,8%). Em relação ao grau, quanto maior o grau, pior o nível de resposta completa (Grau I = 100%, Grau II = 62,5%, Grau III = 57,1%, Grau IV = 50,0%). O valor de hemoglobina prévio ao início do tratamento não mostrou diferença em termos de resposta completa ($Hg < 10 = 71,4\%$ e $Hg > 10 = 70,6\%$).

A diferença no potencial oncogênico entre os tipos de HPV sugeria que estes poderiam ser usados como marcadores prognósticos no tratamento do câncer cervical. A utilização do tipo de HPV como fator prognóstico no câncer cervical permanece controverso. Inicialmente foi feita a hipótese que o tipo de HPV não tinha impacto prognóstico no câncer cervical (Kristensen *et al.*, 1996); enquanto alguns trabalhos demonstraram pior prognóstico para tumores com HPV 18 (Lai *et al.*, 2007), outros trabalhos demonstraram um pior prognóstico para os tumores com HPV 16 (Ferdousi *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2015). Nesse grupo de pacientes, doze eram portadoras de HPV 16, duas eram portadoras de HPV 18 e a seguir amostras únicas de HPVs de alto risco variados e uma coinfeção. Foi observada resposta completa em 83,3% nas pacientes com HPV 16; das duas amostras de HPV 18, uma obteve resposta completa e a outra alcançou resposta parcial.

O conhecimento que a persistência do HPV após o tratamento para o câncer cervical está associada a uma maior taxa de recidiva (Bachtiary *et al.*, 2002; Badaracco *et al.*, 2010) associado ao fato de metade dos tumores cervicais serem induzidos pelo HPV 16, o qual possui variantes que apresentam diferença no potencial de infecção e de imortalizar a célula, levaram a pensar que estas variantes poderiam ser usadas como marcador de resposta ao tratamento oncológico. Foi feita a hipótese que essa variabilidade genética entre as variantes do HPV 16 poderiam proporcionar variação na resposta ao tratamento oncológico com Radioterapia e Quimioterapia (Hang *et al.*, 2014).

Existem pouquíssimos trabalhos que avaliam o papel que as variantes do HPV 16 desempenham como fator prognóstico e resposta ao tratamento. O único trabalho, até o momento, semelhante ao nosso, foi realizado na Colômbia e avaliada a resposta após 3 meses: 13 pacientes da linhagem A realizaram Radioterapia exclusiva (resposta completa em 07 e persistência tumoral em 06 pacientes), 02 pacientes da linhagem D também realizaram Radioterapia sem quimioterapia (uma obteve resposta completa e a outra observada persistência tumoral), 04 pacientes da linhagem A realizaram Radioterapia e Quimioterapia (todas tiveram resposta completa). Não houveram outras linhagens que realizaram tratamento com Radioterapia e Quimioterapia (Moreno-Acosta *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, obtivemos 11 pacientes que tiveram linhagem do HPV 16 identificadas e que fizeram o tratamento com Quimioirradiação, sendo sete pacientes da linhagem A, duas pacientes da linhagem C e duas pacientes da linhagem D. A resposta completa foi observada em 9 das 11 pacientes. Apesar da literatura registrar uma pior evolução nas linhagens não europeias do HPV 16, em nosso estudo foi o grupo europeu que registrou pior resposta, sendo registrado um caso de resposta parcial e outro caso de progressão de doença. O número limitado de pacientes não permitiu que seja definido com precisão o grau de influência da variante intratipo na resposta ao tratamento com Quimioterapia e Radioterapia. A realização de estudos com maior número de pacientes poderia responder melhor essa questão. Um grande desafio para mais estudos esbarra ainda na própria situação do estado, um dos mais pobres do país, com baixo IDH, poucos serviços especializados em tratamento de câncer que atendem majoritariamente uma população pobre, o que proporciona atraso e dificuldade no acesso aos serviços de saúde, com consequente piores resultados no tratamento do câncer.

8 CONCLUSÃO

- Na população estudada foi registrada idade média de 50,6 anos, a maioria das mulheres se declarava parda, com baixos níveis de escolaridade e renda, precoces no início da atividade sexual, com alta paridade e provenientes de cidades de baixo IDH do interior do estado do Maranhão. O conhecimento sobre o preventivo e sua realiação estavam fortemente associados ao nível de escolaridade.

- Os tumores foram diagnosticados em sua maioria em estágios clínicos avançados. O carcinoma de células escamosas observado em 79,7% dos casos e o adenocarcinoma em 9,3% dos casos.

- A presença do HPV foi confirmada em 88,1% das mulheres com câncer de colo de útero. O HPV 16 foi o tipo mais prevalente, observado em 53,3% das amostras, seguido do HPV 18, presente em 10,2% dos casos.

- O carcinoma de células escamosas foi observado em 84,1% dos casos do HPV 16. O adenocarcinoma esteve mais associado ao HPV 18, sendo observado em 25,0% das amostras deste tipo. Não foram registradas demais associações entre os tipos de fatores patológicos como grau e estadiamento clínico.

- Em relação as variantes do HPV 16, predominou a linhagem A (57,8%), seguida da linhagem D (35,0%), linhagem B (3,5%) e linhagem C (3,5%). O carcinoma de células escamosas foi o mais frequente nas quatro linhagens. Dos 4 casos de adenocarcinoma, 3 ocorreram em pacientes da linhagem D.

- Dentre as pacientes com variantes do HPV 16 que fizeram tratamento com Quimioterapia, Radioterapia e Braquiterapia, foi observada que 81,8% obtiveram resposta completa, sendo que os casos de resposta parcial e progressão de doença ocorreram apenas em pacientes portadoras da linhagem A.

REFERENCIAS

AL-KALBANI, M. et al. Do FIGO stage IA and small (≤ 2 cm) IB1 cervical adenocarcinomas have a good prognosis and warrant less radical surgery? **Int J Gynecol Cancer**, v. 22, n. 2, p. 291-5, 2012.

ALMONTE, M. et al. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. **Vaccine**, v. 26 Suppl 11, p. L16-36, 2008.

ALTEKRUSE, S. F. et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, n. 3, p. 657-63, 2003.

AMERICAN COLLEGE OF, O.; GYNECOLOGISTS. ACOG practice bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 78, n. 1, p. 79-91, 2002

ANDIKYAN, V. et al. Cervical conization and sentinel lymph node mapping in the treatment of stage I cervical cancer: is less enough? **Int J Gynecol Cancer**, v. 24, n. 1, p. 113-7, 2014.

ANSINK, A. et al. Recurrent stage IB cervical carcinoma: evaluation of the effectiveness of routine follow up surveillance. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 103, n. 11, p. 1156-8, 1996.

ANTONSSON, A. et al. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 2509-14, J2003.

ARIAS-PULIDO, H. et al. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 22-34, 2005.

AYRES, A. R.; SILVA, G. A. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 5, p. 963-74, 2010.

BACHTIARY, B. et al. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 102, n. 3, p. 237-43, 2002.

BADARACCO, G. et al. Persistence of HPV after radio-chemotherapy in locally advanced cervical cancer. **Oncol Rep**, v. 23, n. 4, p. 1093-9, 2010.

BAKER, T. S. et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophys J**, v. 60, n. 6, p. 1445-56, 1991

BALLEYGUIER, C. et al. Staging of uterine cervical cancer with MRI: guidelines of the European Society of Urogenital Radiology. **Eur Radiol**, v. 21, n. 5, p. 1102-10, 2011.

BARNHOLTZ-SLOAN, J. et al. Incidence trends of invasive cervical cancer in the United States by combined race and ethnicity. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 7, p. 1129-38, 2009.

BARTOLI, J. M. et al. The normal uterus on magnetic resonance imaging and variations associated with the hormonal state. **Surg Radiol Anat**, v. 13, n. 3, p. 213-20, 1991.

BENEDET, J. L.; PECORELLI, S. Why Cancer Staging? **Int J Gynaecol Obstet**, v. 95 Suppl 1, p. S3, 2006.

BENEDETTI-PANICI, P. et al. Early cervical carcinoma: the natural history of lymph node involvement redefined on the basis of thorough parametrectomy and giant section study. **Cancer**, v. 88, n. 10, p. 2267-74, 2000.

BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 35-56, 2013.

BERNARD, B. A. et al. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. **J Virol**, v. 63, n. 10, p. 4317-24, 1989.

BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **Int J Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-6, 2006.

BERNARD, H. U. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, v. 170, n. 5, p. 1077-85, 1994.

BERRAHO, M. et al. HPV and cofactors for invasive cervical cancer in Morocco: a multicentre case-control study. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 435, 2017.

BERUMEN, J. et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 17, p. 1325-30, 2001.

BODURKA-BEVERS, D. et al. Posttherapy surveillance of women with cervical cancer: an outcomes analysis. **Gynecol Oncol**, v. 78, n. 2, p. 187-93, 2000.

BOOY, F. P. et al. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. **J Mol Biol**, v. 281, n. 1, p. 95-106, 1998.

BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.

BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **EMBO J**, v. 3, n. 5, p. 1151-7, 1984.

BOUSSIOS, S. et al. Management of patients with recurrent/advanced cervical cancer beyond first line platinum regimens: Where do we stand? A literature review. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 108, p. 164-174, 2016.

BRAY, F. et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 9, p. 2191-9, 2005.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 2018.

BRAY, F. et al. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 3, p. 677-86, 2005.

BRAY, F.; MOLLER, B. Predicting the future burden of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2006.

BURK, R. D. et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. **Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat**, v. 20, n. 3, p. 113-23, 2011.

BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v. 12, n. 5-6, p. 281-90, 2009.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 232-43, 2013.

BURK, R. D. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. **Cancer Res**, v. 63, n. 21, p. 7215-20, 2003.

BZHALAVA, D.; EKLUND, C.; DILLNER, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, v. 476, p. 341-344, 2015.

CASTELLSAGUE, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 110, n. 3 Suppl 2, p. S4-7, 2008.

CETINA, L. et al. Concurrent chemoradiation with carboplatin for elderly, diabetic and hypertensive patients with locally advanced cervical cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 29, n. 6, p. 608-12, 2008.

CHAN, S. Y. et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. **J Virol**, v. 66, n. 4, p. 2057-66, 1992.

CHEMORADIOTHERAPY FOR CERVICAL CANCER META-ANALYSIS, C. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 35, p. 5802-12, 2008.

- CHEN, A. A. et al. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. **J Virol**, v. 89, n. 20, p. 10680-7, 2015.
- CHEN, M. D. et al. Phase I trial of taxol as a radiation sensitizer with cisplatin in advanced cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 67, n. 2, p. 131-6, 1997.
- CHEN, S. W. et al. The adverse effect of treatment prolongation in cervical cancer by high-dose-rate intracavitary brachytherapy. **Radiother Oncol**, v. 67, n. 1, p. 69-76, 2003.
- CHIANTERA, V. et al. Morbidity after pelvic exenteration for gynecological malignancies: a retrospective multicentric study of 230 patients. **Int J Gynecol Cancer**, v. 24, n. 1, p. 156-64, 2014.
- CLIFFORD, G. M. et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 991-8, 17-23 2005.
- COLEMAN, R. L. et al. Radical hysterectomy for recurrent carcinoma of the uterine cervix after radiotherapy. **Gynecol Oncol**, v. 55, n. 1, p. 29-35, 1994.
- COLLABORATORS, G. B. D. R. F. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659-1724, 2016.
- COUTLEE, F. et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 902-7, 2002.
- CRAWFORD, L. V. A study of human papilloma virus DNA. **J Mol Biol**, v. 13, n. 2, p. 362-72, 1965.
- CROW, J. M. HPV: The global burden. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. S2-3, 30 2012.
- DA SILVA, R. M. et al. Current situation of high-dose-rate brachytherapy for cervical cancer in Brazil. **Radiol Bras**, v. 47, n. 3, p. 159-64, 2014.
- DATTA, G. D. et al. Individual-, neighborhood-, and state-level socioeconomic predictors of cervical carcinoma screening among U.S. black women: a multilevel analysis. **Cancer**, v. 106, n. 3, p. 664-9, 2006.
- DAY, P. M. et al. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. **J Virol**, v. 72, n. 1, p. 142-50, 1998.
- DE SANJOSE, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 7, p. 453-9, 2007.
- DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 11, p. 1048-56, 2010.

DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 2-10, 2013.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DELGADO, G. et al. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol**, v. 38, n. 3, p. 352-7, 1990.

DELGADO, G. et al. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecol Oncol**, v. 35, n. 3, p. 314-20, 1989.

DESFORGES, J. F. Current concepts in cancer. **N Engl J Med**, v. 299, n. 17, p. 950, 26 1978.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 99-114, 2013.

DONALDSON, I. M. Celsus: De medicina, Florence 1478. Part 2. **J R Coll Physicians Edinb**, v. 44, n. 4, p. 344-6, 2014.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**, v. 110, n. 5, p. 525-41, 2006.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 80-98, 2013.

DOORBAR, J. et al. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. **EMBO J**, v. 5, n. 2, p. 355-62, 1986.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev Med Virol**, v. 25 Suppl 1, p. 2-23, 2015.

DOORBAR, J. et al. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. **Virology**, v. 178, n. 1, p. 254-62, 1990.

DREYER, G. et al. Management of recurrent cervical cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 19, n. 4, p. 631-44, 2005.

DUBAY, R. A. et al. Evaluation of concurrent and adjuvant carboplatin with radiation therapy for locally advanced cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 94, n. 1, p. 121-4, 2004.

DUGUE, P. A. et al. Immunosuppression and risk of cervical cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 13, n. 1, p. 29-42, 2013.

DUN, A. E.; OGILVIE, M. M. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. **J Ultrastruct Res**, v. 22, n. 3, p. 282-95, 1968.

- DYSON, N. et al. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. **J Virol**, v. 66, n. 12, p. 6893-902, 1992.
- EGAWA, N. et al. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863-90, 2015.
- ELIT, L. et al. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. **Gynecol Oncol**, v. 114, n. 3, p. 528-35, 2009.
- ELLIOTT, P. et al. Early invasive (FIGO stage IA) carcinoma of the cervix: a clinico-pathologic study of 476 cases. **Int J Gynecol Cancer**, v. 10, n. 1, p. 42-52, 2000.
- ELUF-NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **Br J Cancer**, v. 69, n. 1, p. 114-9, 1994.
- ESTAPE, R. E. et al. Close vaginal margins as a prognostic factor after radical hysterectomy. **Gynecol Oncol**, v. 68, n. 3, p. 229-32, 1998.
- EVANDER, M. et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **J Virol**, v. 71, n. 3, p. 2449-56, 1997.
- FAVRE, M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. **J Virol**, v. 15, n. 5, p. 1239-47, 1975.
- FELLER, L. et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infect Agent Cancer**, v. 4, p. 16-25 2009.
- FERDOUSI, J. et al. Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. **Exp Ther Med**, v. 1, n. 3, p. 525-530, 2010.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.
- FERNANDES, J. V. et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Res Notes**, v. 3, n. 1, p. 96, 2010.
- FLORES, E. R. et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. **J Virol**, v. 74, n. 14, p. 6622-31, 2000.
- FORREST, J. et al. A dosimetric planning study comparing intensity-modulated radiotherapy with four-field conformal pelvic radiotherapy for the definitive treatment of cervical carcinoma. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 24, n. 4, p. e63-70, 2012.
- FRANCESCHI, S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. **Recent Results Cancer Res**, v. 166, p. 277-97, 2005.

FRIEDEL, G. H.; STEINER, G.; KISTNER, R. W. Prognostic value of blood-vessel invasion in cervical cancer. **Obstet Gynecol**, v. 29, n. 6, p. 855-7, 1967.

FYLES, A. et al. The effect of treatment duration in the local control of cervix cancer. **Radiother Oncol**, v. 25, n. 4, p. 273-9, 1992.

GAFFNEY, D. K. et al. ACR Appropriateness Criteria(R) on Advanced Cervical Cancer Expert Panel on Radiation Oncology-Gynecology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 81, n. 3, p. 609-14, 2011.

GHEIT, T. et al. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 7, p. 1315-21, 2011.

GIEN, L. T.; BEAUCHEMIN, M. C.; THOMAS, G. Adenocarcinoma: a unique cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 116, n. 1, p. 140-6, 2010.

GREEN, J. et al. Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD002225, 2005.

GUAN, P. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. **Int J Cancer**, v. 131, n. 10, p. 2349-59, 15 2012.

HAGENSEE, M. E.; YAEGASHI, N.; GALLOWAY, D. A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. **J Virol**, v. 67, n. 1, p. 315-22, 1993.

HANG, D. et al. Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of human papillomavirus 16 European and Asian variants. **J Med Virol**, v. 86, n. 4, p. 618-26, 2014.

HARRISON, L. B. et al. Radiotherapy-associated anemia: the scope of the problem. **Oncologist**, v. 5 Suppl 2, p. 1-7, 2000.

HERFS, M. et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 26, p. 10516-21, 2012.

HILDESHEIM, A. et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **J Infect Dis**, v. 169, n. 2, p. 235-40, 1994.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **J Virol**, v. 67, n. 11, p. 6413-23, 1993.

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Res**, v. 231, p. 34-40, 2017.

HORN, L. C. et al. [Current TNM/FIGO classification for cervical and endometrial cancer as well as malignant mixed mullerian tumors. Facts and background]. **Pathologe**, v. 32, n. 3, p. 239-43, 2011.

HRICAK, H. et al. Early invasive cervical cancer: CT and MR imaging in preoperative evaluation - ACRIN/GOG comparative study of diagnostic performance and interobserver variability. **Radiology**, v. 245, n. 2, p. 491-8, 2007.

HRICAK, H. et al. Invasive cervical carcinoma: role of MR imaging in pretreatment work-up-cost minimization and diagnostic efficacy analysis. **Radiology**, v. 198, n. 2, p. 403-9, 1996.

HUANG, K. et al. Optimal pathological response indicated better long-term outcome among patients with stage IB2 to IIB cervical cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. **Sci Rep**, v. 6, p. 28278, 2016.

HWANG, L. Y. et al. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women. **J Adolesc Health**, v. 44, n. 2, p. 103-110, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 P.

JACKSON, S. et al. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. **Genes Dev**, v. 14, n. 23, p. 3065-73, 2000.

JACOBS, A. J. et al. Short-term persistence of carcinoma of the uterine cervix after radiation. An indicator of long-term prognosis. **Cancer**, v. 57, n. 5, p. 944-50, 1986.

JADON, R. et al. A systematic review of organ motion and image-guided strategies in external beam radiotherapy for cervical cancer. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 26, n. 4, p. 185-96, 2014.

JAIN, A. et al. Sociodemographic and Clinical Profile of Cervical Cancer Patients Visiting in a Tertiary Care Hospital in India. **Indian J Med Paediatr Oncol**, v. 38, n. 3, p. 291-295, Jul-2017.

JEONG, Y. Y. et al. Uterine cervical carcinoma after therapy: CT and MR imaging findings. **Radiographics**, v. 23, n. 4, p. 969-81; discussion 981, 2003.

JUNES-GILL, K. et al. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. **J Med Virol**, v. 80, n. 9, p. 1639-45, 2008.

KATO, T. et al. Clinical tumor diameter and prognosis of patients with FIGO stage IB1 cervical cancer (JCOG0806-A). **Gynecol Oncol**, v. 137, n. 1, p. 34-9, 2015.

KEYS, H. M. et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. **N Engl J Med**, v. 340, n. 15, p. 1154-61, 1999.

KIM, S. M.; CHOI, H. S.; BYUN, J. S. Overall 5-year survival rate and prognostic factors in patients with stage IB and IIA cervical cancer treated by radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection. **Int J Gynecol Cancer**, v. 10, n. 4, p. 305-312, 2000.

KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, p. 12180-4, 1992.

KLOPP, A. H.; EIFEL, P. J. Chemoradiotherapy for cervical cancer in 2010. **Curr Oncol Rep**, v. 13, n. 1, p. 77-85, 2011.

KLUG, A.; FINCH, J. T. Structure of Viruses of the Papilloma-Polyoma Type. I. Human Wart Virus. **J Mol Biol**, v. 11, p. 403-23, 1965.

KOH, W. J. et al. Uterine Neoplasms, Version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 16, n. 2, p. 170-199, 2018.

KOKKA, F. et al. Surgical treatment of stage IA2 cervical cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 5, p. CD010870, 29 2014.

KOSS, L. G.; DURFEE, G. R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 63, n. 6, p. 1245-61, 30 1956.

KRISTENSEN, G. B. et al. Human papillomavirus has prognostic significance in cervical carcinoma. **Eur J Cancer**, v. 32, p. 1349-1353.

KUKIMOTO, I.; MURAMATSU, M. Genetic variations of human papillomavirus type 16: implications for cervical carcinogenesis. **Jpn J Infect Dis**, v. 68, n. 3, p. 169-75, 2015.

LAI, C. H. et al. Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 24, p. 3628-34, 2007.

LANDONI, F. et al. Randomized study between radical surgery and radiotherapy for the treatment of stage IB-IIA cervical cancer: 20-year update. **J Gynecol Oncol**, v. 28, n. 3, p. e34, 2017.

LARSON, D. M. et al. Diagnosis of recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy. **Obstet Gynecol**, v. 71, n. 1, p. 6-9, 1988.

LAU, Y. M. et al. Prognostic implication of human papillomavirus types and species in cervical cancer patients undergoing primary treatment. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122557, 2015.

LEA, J. S.; LIN, K. Y. Cervical cancer. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 39, n. 2, p. 233-53, 2012.

LEE, K. B. et al. Lymph node metastasis and lymph vascular space invasion in microinvasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, n. 3, p. 1184-7, 2006.

MARSH, M. Original site of cervical carcinoma; topographical relationship of carcinoma of the cervix to the external os and to the squamocolumnar junction. **Obstet Gynecol**, v. 7, n. 4, p. 444-52, 1956.

- MAUCORT-BOULCH, D. et al. International correlation between human papillomavirus prevalence and cervical cancer incidence. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 3, p. 717-20, 2008.
- MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 57-79, 2013.
- MCMILLAN, N. A. et al. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. **Virology**, v. 261, n. 2, p. 271-9, 1999.
- MEIGS, J. V. Radical hysterectomy with bilateral pelvic lymph node dissections; a report of 100 patients operated on five or more years ago. **Am J Obstet Gynecol**, v. 62, n. 4, p. 854-70, 1951.
- MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. **Acta Cytol**, v. 20, n. 6, p. 505-9, 1976.
- MELNICK, J. L. Papova virus group. **Science**, v. 135, n. 3509, p. 1128-30, 1962.
- MIRABELLO, L. et al. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. **J Natl Cancer Inst**, v. 108, n. 9, 2016.
- MITCHELL, D. G. et al. Early invasive cervical cancer: tumor delineation by magnetic resonance imaging, computed tomography, and clinical examination, verified by pathologic results, in the ACRIN 6651/GOG 183 Intergroup Study. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 36, p. 5687-94, 2006.
- MONK, B. J.; TEWARI, K. S.; KOH, W. J. Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinoma: state of the art and future directions. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 20, p. 2952-65, 2007.
- MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1085-92, 2002.
- MORENO-ACOSTA, P. et al. HPV-16 variants' impact on uterine cervical cancer response to radiotherapy: A descriptive pilot study. **Cancer Radiotherapie**, **21**, 104-8, 2017.
- MORRIS, M. et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 340, n. 15, p. 1137-43, 1999.
- MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 518-27, 2003.
- MUNOZ, N. et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1093-101, 2002.
- MUSSELWHITE, L. W. et al. Racial/Ethnic Disparities in Cervical Cancer Screening and Outcomes. **Acta Cytol**, v. 60, n. 6, p. 518-526, 2016.

- MYERS, E. R. et al. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 12, p. 1158-71, 2000.
- NICOLAS-PARRAGA, S. et al. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 140, n. 9, p. 2092-2100, 1 2017.
- NOGUEIRA DIAS GENTA, M. L. et al. Multiple HPV genotype infection impact on invasive cervical cancer presentation and survival. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182854, 2017.
- ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **Br J Vener Dis**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 1971.
- PARK, R. C.; THIGPEN, J. T. Chemotherapy in advanced and recurrent cervical cancer. A review. **Cancer**, v. 71, n. 4 Suppl, p. 1446-50, 1993.
- PARKIN, D. M.; STJERNSWARD, J.; MUIR, C. S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. **Bull World Health Organ**, v. 62, n. 2, p. 163-82, 1984.
- PECORELLI, S.; ODICINO, F. Cervical cancer staging. **Cancer J**, v. 9, n. 5, p. 390-4, Sep-2003.
- PEIRETTI, M. et al. Management of recurrent cervical cancer: a review of the literature. **Surg Oncol**, v. 21, n. 2, p. e59-66, 2012.
- PEREZ, C. A. et al. Radiation therapy alone in the treatment of carcinoma of uterine cervix. I. Analysis of tumor recurrence. **Cancer**, v. 51, n. 8, p. 1393-402, 1983.
- PETIGNAT, P.; ROY, M. Diagnosis and management of cervical cancer. **BMJ**, v. 335, n. 7623, p. 765-8, 2007.
- PIGNATA, S. et al. Phase I study with weekly cisplatin-paclitaxel and concurrent radiotherapy in patients with carcinoma of the cervix uteri. **Ann Oncol**, v. 11, n. 4, p. 455-9, 2000.
- PIVER, M. S.; RUTLEDGE, F.; SMITH, J. P. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer. **Obstet Gynecol**, v. 44, n. 2, p. 265-72, 1974.
- PLUMMER, M. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob Health**, v. 4, n. 9, p. e609-16, 2016.
- POTTER, M. E. et al. Optimal therapy for pelvic recurrence after radical hysterectomy for early-stage cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 37, n. 1, p. 74-7, 1990.
- POTTER, R. et al. Definitive radiotherapy based on HDR brachytherapy with iridium 192 in uterine cervix carcinoma: report on the Vienna University Hospital findings (1993-1997) compared to the preceding period in the context of ICRU 38 recommendations. **Cancer Radiother**, v. 4, n. 2, p. 159-72, 2000.
- QUERLEU, D.; MORROW, C. P. Classification of radical hysterectomy. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 3, p. 297-303, 2008.

RICHARD, S. D. et al. Survival for stage IB cervical cancer with positive lymph node involvement: a comparison of completed vs. abandoned radical hysterectomy. **Gynecol Oncol**, v. 109, n. 1, p. 43-8, 2008.

RODRIGUEZ, A. C. et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 7, p. 513-7, 2008.

ROHLFS, M. et al. Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type-16. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 331-42, 1991.

ROSE, P. G. Combination therapy: New treatment paradigm for locally advanced cervical cancer? **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 7, p. 388-90, 2011.

ROSE, P. G. et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 340, n. 15, p. 1144-53, 1999.

ROUS, P.; BEARD, J. W. The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). **J Exp Med**, v. 62, n. 4, p. 523-48, 1935.

RUTLEDGE, T. L. et al. A comparison of stages IB1 and IB2 cervical cancers treated with radical hysterectomy. Is size the real difference? **Gynecol Oncol**, v. 95, n. 1, p. 70-6, 2004.

SAKURAGI, N. Up-to-date management of lymph node metastasis and the role of tailored lymphadenectomy in cervical cancer. **Int J Clin Oncol**, v. 12, n. 3, p. 165-75, 2007.

SALA, E. et al. The added role of MR imaging in treatment stratification of patients with gynecologic malignancies: what the radiologist needs to know. **Radiology**, v. 266, n. 3, p. 717-40, 2013.

SALANI, R. et al. Posttreatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncologists recommendations. **Am J Obstet Gynecol**, v. 204, n. 6, p. 466-78, 2011.

SAPP, M. et al. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. **J Gen Virol**, v. 76 (Pt 9), p. 2407-12, 1995.

SARAIYA, M. et al. Type-specific HPV and Pap test results among low-income, underserved women: providing insights into management strategies. **Am J Obstet Gynecol**, v. 211, n. 4, p. 354 e1-6, 2014.

SARDAIN, H. et al. Curative pelvic exenteration for recurrent cervical carcinoma in the era of concurrent chemotherapy and radiation therapy. A systematic review. **Eur J Surg Oncol**, v. 41, n. 8, p. 975-85, 2015.

SARTORI, E. et al. Early stage cervical cancer: adjuvant treatment in negative lymph node cases. **Gynecol Oncol**, v. 107, n. 1 Suppl 1, p. S170-4, 2007.

SASIENI, P.; CASTANON, A.; CUZICK, J. Screening and adenocarcinoma of the cervix. **Int J Cancer**, v. 125, n. 3, p. 525-9, 2009.

SCHIFFMAN, M. et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer Res**, v. 70, n. 8, p. 3159-69, 2010.

SCHMELER, K. M.; FRUMOVITZ, M.; RAMIREZ, P. T. Conservative management of early stage cervical cancer: is there a role for less radical surgery? **Gynecol Oncol**, v. 120, n. 3, p. 321-5, 2011.

SCHOTTENFELD, D. et al. Current perspective on the global and United States cancer burden attributable to lifestyle and environmental risk factors. **Annu Rev Public Health**, v. 34, p. 97-117, 2013.

SCHWARTZ, L. B. et al. Female pelvis: impact of MR imaging on treatment decisions and net cost analysis. **Radiology**, v. 192, n. 1, p. 55-60, 1994.

SHERMAN, M. E. et al. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. Relation to incidence and survival. **Cancer**, v. 103, n. 6, p. 1258-64, 2005.

SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **Int J Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763-8, 15 2007.

SIEGEL, C. L. et al. ACR Appropriateness Criteria(R) pretreatment planning of invasive cancer of the cervix. **J Am Coll Radiol**, v. 9, n. 6, p. 395-402, 2012.

SMALL, W., JR. et al. ACR Appropriateness Criteria(R) definitive therapy for early-stage cervical cancer. **Am J Clin Oncol**, v. 35, n. 4, p. 399-405, 2012.

STEGEMAN, M. et al. The incidence of parametrial tumor involvement in select patients with early cervix cancer is too low to justify parametrectomy. **Gynecol Oncol**, v. 105, n. 2, p. 475-80, 2007.

STOREY, A. et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 229-34, 21 1998.

STRAUSS, M. J.; SHAW, E. W.; ET AL. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 72, n. 1, p. 46-50, 1949.

SWAILES, A. L. et al. The Wertheim hysterectomy: Development, modifications, and impact in the present day. **Gynecol Oncol**, v. 145, n. 1, p. 3-8, 2017.

SYRJANEN, S. et al. Colposcopy, punch biopsy, in situ DNA hybridization, and the polymerase chain reaction in searching for genital human papillomavirus (HPV) infections in women with normal PAP smears. **J Med Virol**, v. 31, n. 4, p. 259-66, 1990.

TAMEGAO-LOPES, B. P. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. **Infect Agent Cancer**, v. 9, p. 25, 2014.

THOMEER, M. G. et al. Clinical examination versus magnetic resonance imaging in the pretreatment staging of cervical carcinoma: systematic review and meta-analysis. **Eur Radiol**, v. 23, n. 7, p. 2005-18, 2013.

THULER, L. C.; DE AGUIAR, S. S.; BERGMANN, A. [Determinants of late stage diagnosis of cervical cancer in Brazil]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 36, n. 6, p. 237-43, Jun 2014.

TIERNEY, K. E. et al. Cervical conization of adenocarcinoma in situ: a predicting model of residual disease. **Am J Obstet Gynecol**, v. 210, n. 4, p. 366 e1-366 e5, 2014.

TRIMBLE, C. L. et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. **Obstet Gynecol**, v. 105, n. 1, p. 174-81, 2005.

TSAI, C. S. et al. The prognostic factors for patients with early cervical cancer treated by radical hysterectomy and postoperative radiotherapy. **Gynecol Oncol**, v. 75, n. 3, p. 328-33, 1999.

UEKI, M. et al. Conservative therapy for microinvasive carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, v. 53, n. 1, p. 109-13, 1994.

VALE, D. B. et al. Disparities in time trends of cervical cancer mortality rates in Brazil. **Cancer Causes Control**, v. 27, n. 7, p. 889-96, 2016.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 11-20, 2013.

VAN DOORSLAER, K. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **J Gen Virol**, Jun 21 2018.

VELDMAN, T. et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **J Virol**, v. 75, n. 9, p. 4467-72, 2001.

VIDAL, J. P. et al. Genetic diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian patients with invasive cervical cancer. **J Med Virol**, v. 88, n. 7, p. 1279-87, 2016.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res**, v. 71, p. 321-41, 1997.

VILLA, L. L. et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 12, p. 2959-68, 2000.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v. 189, n. 1, p. 12-9, 1999.

WALHART, T. Human Papillomavirus Biology, Pathogenesis, and Potential for Drug Discovery: A Literature Review for HIV Nurse Clinical Scientists. **J Assoc Nurses AIDS Care**, v. 26, n. 6, p. 693-702, 2015.

WANG, S. S. et al. Cervical cancer incidence among 6 asian ethnic groups in the United States, 1996 through 2004. **Cancer**, v. 116, n. 4, p. 949-56, 2010.

WERNES, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 76-9, 1990.

WHITNEY, C. W. et al. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 5, p. 1339-48, 1999.

WOO, S. et al. Early stage cervical cancer: role of magnetic resonance imaging after conization in determining residual tumor. **Acta Radiol**, v. 57, n. 10, p. 1268-76, 2016.

WRIGHT, J. D. et al. Utility of parametrectomy for early stage cervical cancer treated with radical hysterectomy. **Cancer**, v. 110, n. 6, p. 1281-6, 15 2007.

YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **J Virol**, v. 71, n. 3, p. 2463-72, 1997.

YANG, L. et al. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 11, p. 5086-90, 1993.

YONEDA, J. Y. et al. Surgical treatment of microinvasive cervical cancer: analysis of pathologic features with implications on radicality. **Int J Gynecol Cancer**, v. 25, n. 4, p. 694-8, 2015.

ZEFERINO, L. C. [The challenge of reducing mortality due to cervical cancer]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 5, p. 213-5, 2008.

ZHANG, B.; SPANDAU, D. F.; ROMAN, A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. **J Virol**, v. 76, n. 1, p. 220-31, 2002.

ZOLA, P. et al. Could follow-up different modalities play a role in asymptomatic cervical cancer relapses diagnosis? An Italian multicenter retrospective analysis. **Gynecol Oncol**, v. 107, n. 1 Suppl 1, p. S150-4, 2007.

ZUNA, R. E. et al. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. **Int J Cancer**, v. 125, n. 11, p. 2609-13, 2009.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Res**, v. 36, n. 2 pt 2, p. 794, 1976.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Human papillomaviruses. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 427-47, 1994.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BIOBANCO DE TUMORES E DNA DO MARANHÃO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DETECÇÃO DE VARIANTES DO HPV 16 E 18 EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM USUÁRIAS DA REDE SUS EM SÃO LUÍS, MARANHÃO**

Nome do Voluntário: _____

Você está sendo convidada a participar de um estudo que tem por objetivo descrever as características biológicas do câncer do colo do útero. O Câncer do colo do útero é o segundo tipo de tumor mais comum em mulheres. Sabe-se que sua origem está associada ao um vírus. Conhecer as características desse vírus e do tumor que ele originou é importante para compreender melhor a doença, o tratamento e as maneiras de prevenir o aparecimento desse tumor, assim como o desenvolvimento de vacinas. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo identificar os diferentes tipos de HPV presentes nos tumores do colo do útero de pacientes atendidas no Hospital do Câncer da Secretaria do Estado de Saúde do Estado do Maranhão e Hospital do Câncer Aldenora Bello e associar as características do tumor com as características do tipo de vírus presente.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra do tumor para a realização da biópsia (exame que diagnostica o tipo de tumor) ou uma amostra do mesmo no caso de você ser submetida a uma cirurgia, como parte do tratamento. A coleta de material para

a biópsia será feita por uma médica (o) pesquisadora (or) participante desse estudo. As amostras serão armazenadas no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão. O tumor será levado ao laboratório onde será isolado o DNA para ser submetido a procedimentos que permitirão identificar o vírus associado ao seu desenvolvimento. Você também responderá a um questionário com perguntas sobre hábitos de vida, atividade sexual e uso de hormônios ao longo de sua vida. Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa os pesquisadores participantes também consultarão seus registros médicos para obter dados que podem ser importantes para compreender o câncer do colo do útero.

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Caso você decida interromper sua participação no estudo, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta e o uso das amostras para os fins relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você pela sua participação nesse estudo.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento no telefone (98) 3272-8535.

Li as informações acima e por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

_____ / ____ / ____
(Assinatura da Paciente) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo à paciente indicada acima e/ou pessoa autorizada para consentir pela paciente.

_____ ____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMA

Avenida dos Portugueses s/n, Campus Universitário do Bacanga, Prédio do CEB Velho, PPPG,
Bloco C Sala 07. E-mail para correspondência cepufma@ufma.br; Tel: 3272-8708

Coordenador: Prof. Dr. Francisco Navarro

ANEXO B

Número do Formulário:

PROJETO: DETECÇÃO DE VARIANTES DO HPV 16 E 18 EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM USUÁRIAS DA REDE SUS EM SÃO LUÍS, MARANHÃO.

FORMULÁRIO

Nome da unidade de saúde: Nº do prontuário/registro na unidade de saúde:

IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE

Nome da entrevistada: Endereço: Bairro: cep: Tel. Residencial: Celular: Tel. Comercial: CPF: Cidade onde nasceu: UF: Nome da mãe:

TIPO DE ENTREVISTA

1. ☐ Realizada Totalmente 2. ☐ Realizada Parcialmente3. ☐ Não Realizada1. ☐ Recusa2. ☐ Outro

especificar o outro motivo de não realização da entrevista:

Data de realização da entrevista: / /

EQUIPE

ENTREVISTADORA: SUPERVISOR DIGITADOR

As informações prestadas nesta pesquisa terão caráter confidencial e serão utilizadas exclusivamente para fins estatísticos

Quadro 1 - Nossa pesquisa tem como objetivo investigar os fatores de risco que estão associados com o desenvolvimento do câncer do colo do útero em nosso país.

1. Qual a data do seu nascimento?

1|_|_|/|_|_|/|_|_||_|_||(passe para a pergunta 3)

99|_| NS/NR (siga para a pergunta 2)

2.Quantos anos a senhora tem?

1|_|_| anos

3.Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça?

Entrevistador: Leia as alternativas.

1 |_| Branca

2 |_| Preta

3 |_| Amarela

4 |_| Parda

5 |_| Indígena

6 |_| Outra

4. Qual é a sua situação conjugal?

Entrevistador: Leia as alternativas.

1|_| Solteira

2|_| Casada/união consensual

3|_| Divorciada/desquitada/separada

4|_| Viúva

5. Qual a série (ou período) e qual o grau de escolaridade que Sra. concluiu?

Série ou Período	Grau de Escolaridade
(00) (07)	(00) Nenhum
(01) (08)	(01) Alfabetização de adultos
(02) (09)	(02) Antigo primário/elementar
(03) (10)	(03) Antigo ginásio
(04) (11)	(04) 1º grau/ensino fundamental
(05) (12)	(05) Antigo clássico/normal/científico/2º grau/ensino médio
(06) (99) NS/NR	(06) Superior (3º grau) - incompleto
	(07) Superior (3º grau) - completo
	(08) Educação infantil
	(99) NS/NR

|_|_| Série OU |_|_| Período

|_|_| Grau

6. Qual a sua religião?

1|_|_| Eu não tenho religião

2|_|_| Católica

3|_|_| Evangélica/Metodista/Batista/Presbiteriana/Protestante/Cristã

4|_|_| Espiritismo de Candomblé/Umbanda/Africana

5|_|_| Espiritismo Kardecista

6|_|_| Budista

7|_|_| Judaica

8|_|_| Muçumana

9|_|_| Outra, qual? _____ (especifique)

7. Quantos cômodos existem na sua casa?

|_|_|_| cômodos

8. Quantos cômodos da casa são usados permanentemente para dormir?

|_|_|_| cômodos

9. Quantas pessoas moram na sua casa?

|_|_|_| pessoas

10. Atualmente a Sra. /você tem um trabalho ou atividade remunerada?1 |_|_| Sim 2 |_|_| Não (*passse 12*)**11. Qual é a sua principal ocupação? Por exemplo: Empregada doméstica, recepcionista, professora, auxiliar de pesquisa, contadora etc.**

_____|_|_|_|

12. Contando com salário, pensão, aluguel, bico, etc., qual é a renda total de sua família, por mês?

R\$ |_|_|_|_|.|_|_|_|_|,|_|_|_|_|

99999,99 |_|_| NS/NR (*passse 14*)00000,00 |_|_| Não tem renda (*passse quadro 2*)**13. No total, quantas pessoas dependem economicamente desta renda familiar?**

|_|_|_| pessoas

14. Agora, por favor, responda-me, qual é a sua renda mensal?

R\$ |_|_|_|_|.|_|_|_|_|,|_|_|_|_|

99999,99 |_|_| NS/NR

00000,00 |_|_| Não tem renda

Quadro 2 - A pergunta que farei agora é sobre a percepção do seu estado de saúde.

15. De um modo geral, em comparação a pessoas da sua idade, como Sra. considera o seu próprio estado de saúde?

Entrevistador: Leia as alternativas.

1|_|_| Excelente

2|_|_| Muito bom

3|_|_| Bom

4|_|_| Regular

5|_|_| Ruim

Quadro 3 - As perguntas que farei agora são sobre o exame preventivo para o câncer do colo do útero.

16. Você sabe para que serve o exame preventivo?

1|_|_| Sim

2|_|_| Não (*passa e leia o Quadro 4*)

17. Você poderia me dizer, quais os problemas que o exame preventivo é capaz de identificar?

1 Câncer do colo do útero

1|_|_| sim

2|_|_| não

2 Inflamações

1|_|_| sim

2|_|_| não

3 Infecções

1|_|_| sim

2|_|_| não

4 Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs)

1|_|_| sim

2|_|_| não

5 Outros _____

1|_|_| sim

2|_|_| não

especifique

18. Antes do problema de saúde atual, você fazia exames preventivos para o câncer do colo do útero?

1|_|_| Sim

2|_|_| Não

19. Com que idade você começou a fazer exames preventivos?

|_|_| anos 99|_|_| NS/NR

20. De quanto em quanto tempo você costumava fazer o exame preventivo?

1|_|_| Mais de uma vez por ano

2|_|_| Todo ano

3|_|_| De 2 em 2 anos

4|_|_| De 3 em 3 anos

5|_|_| Com intervalo de mais de 3 anos

6|_|_| Sem regularidade

9|_|_| Não sabe/Não respondeu

21. Dê um modo geral, quando você precisava ir ao Posto de Saúde:

Entrevistador: Leia as alternativas.

1|__| Consequia logo marcar a consulta

2|__| Não precisava marcar consulta: era só ir e ser atendida

3|__| Tinha muita dificuldade em marcar a consulta. Por que? _____

4|__| Outra situação, qual? _____

ENTREVISTADORA: LEIA O QUADRO ABAIXO

Quadro 9 - Agora farei perguntas sobre menstruação, o número de filhos que a Sra. tem ou teve. Também farei perguntas sobre uso de métodos anticoncepcionais.

22. Com que idade você ficou menstruada pela primeira vez?

|__|__| anos

99 |__| NS/NR

23. Você tem ou já teve atividade sexual?

1|__| Sim

2|__| Não (*passa quadro 10, pág. 13*)

24. Com que idade você teve a sua primeira relação sexual?

|__|__| anos

99 |__| NS/NR

25. Desde que você teve a sua primeira relação sexual, quantos parceiros você teve?

|__|__| parceiros

99 |__| NS/NR

26. Atualmente, você tem atividade sexual?

1|__| Sim (*passa 57*) 2|__| Não

27. Há quanto tempo você não tem atividade sexual?

1|__|__| dias

2|__|__| semanas

3|__|__| meses

4|__|__| anos

99|__| NS/NR

28. Você usou algum método para evitar a gravidez em algum período da sua vida?

1 |__| Sim, uso

2 |__| Sim, já usei

3 |__| Não. Por quê? _____ (*passa 60*)

especifique

29. Qual (is)?

Entrevistador: Leia as alternativas.

TEMPO DE USO

- | | | |
|------------------------------|--------------------------------|---|
| 1. Pílulas Anticoncepcionais | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não <input type="text"/> Anos <input type="text"/> Meses |
| 2. Injeções | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não <input type="text"/> Anos <input type="text"/> Meses |
| 3. Diu (com progesterona) | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não <input type="text"/> Anos <input type="text"/> Meses |
| 4. Camisinha/ preservativo | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 5. Camisinha feminina | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 6. Diafragma | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 7. DIU de cobre | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 8. Ligadura de trompas | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 9. Anel | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 10. implantes | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
| 11. Coito interrompido | 1 ☐ Sim | 2 ☐ Não |
- (passe 60)

30. Você já ficou grávida alguma vez, incluindo gravidez tubária, possíveis abortos ou gravidez atual?1 ☐ Sim2 ☐ Não (*quadro 10, pág. 13*)**31. Quantas vezes você ficou grávida, incluindo gravidez tubária, possíveis abortos ou gravidez atual?** vezes99 ☐ NS/NR**32. Quantos partos você teve?** partos00 ☐ nenhum (*passe 67*)99 ☐ NS/NR**33. Você tem ou teve filhos nascidos vivos?**1 ☐ Sim2 ☐ Não (*passe 67*)**34. Quantos filhos nascidos vivos você teve?** filhos nascidos vivos**35. Qual era a sua idade quando nasceu o seu primeiro filho?** anos ou Ano da primeira gravidez ou Idade do filho mais velho99 ☐ NS/NR9999 ☐ NS/NR99 ☐ NS/NR

36. Qual era a sua idade quando nasceu o seu último filho?

|_|_|anos **ou** |_|_|_|_|Ano da última gravidez **ou** |_|_|Idade do filho mais novo

99 |_| NS/NR

9999 |_| NS/NR

99 |_| NS/NR

38. Você já abortou ou perdeu bebê?

1 |_| Sim

2 |_| Não (*passe para o quadro 10*)

39. Quantos abortos, provocados ou espontâneos, você teve?

|_|_| abortos

99 |_| NS/NR

Quadro 10 - Entrevistador: As perguntas a seguir devem ser respondidas pelas mulheres que têm 35 anos ou mais. Caso a entrevistada tenha 34 anos ou menos, agradeça e finalize a entrevista.

Agora farei algumas perguntas sobre menopausa
40. Você sabe o que é menopausa?

1 |_| Sim (*passe 70*) 2 |_| Não (*ler o texto abaixo*)

Quadro 11 - A menopausa ocorre quando os períodos de sangramento da mulher terminam e, geralmente, acontece nas mulheres que têm em torno de 48 a 52 anos, mas também pode ocorrer mais cedo. Antes de ocorrer à menopausa, a mulher começa a apresentar alguns sintomas como calores no corpo (também chamado de fogacho), alterações no sangramento menstrual, irritabilidade, insônia, queda de cabelo, falta de lubrificação vaginal, dores nos ossos e outros.

41. Você já entrou na menopausa ou algum médico lhe disse que você estava apresentando sintomas da menopausa?

1 |_| Sim

2 |_| Não (*Agradeça e finalize a entrevista*)

9 |_| NS/NR (*Agradeça e finalize a entrevista*)

42. Com que idade você entrou na menopausa?

|_|_| anos

99 |_| NS/NR

43. Você usa ou já usou medicação hormonal para a menopausa?

1 |_| Sim, usa atualmente

2 |_| Sim, já usou

3 |_| Nunca usou (*Agradeça e finalize a entrevista*)

44. Há quanto tempo você usa ou já usou medicação hormonal para a menopausa?

1 |_|_| dias

2 |_|_| semanas

3 |_|_| meses

4 |_|_| anos

99 |_|_| NS/NR

USO DE TABACO

INTRODUÇÃO: Agora eu vou fazer algumas perguntas sobre uso de tabaco. Vou fazer perguntas sobre o uso de produtos do tabaco que são fumados, isto inclui: cigarros, charutos, cigarrilhas, cachimbos, cigarros de Bali (ou kreteks), cigarros indianos (ou bidis) e narguilé (cachimbo de água). Não considere cigarros de maconha.

45. Atualmente, você fuma: diariamente, menos que diariamente ou não fuma?

DIARIAMENTE ☐ 1 → PASSE 48
 MENOS QUE DIARIAMENTE ☐ 2
 NÃO FUMA ☐ 3 → PASSE 47

46. No passado você já fumou algum produto do tabaco diariamente?

SIM..... ☐ 1 → PASSE 48
 NÃO ☐ 2 → PASSE 48

47. No passado você fumou: diariamente, menos que diariamente ou nunca fumou?

ENT: CASO O ENTREVISTADO RESPONDA QUE JÁ USOU “DIARIAMENTE” E “MENOS QUE DIARIAMENTE” NO PASSADO, ASSINALE “DIARIAMENTE”.

DIARIAMENTE ☐
 MENOS QUE DIARIAMENTE ☐
 NUNCA FUMOU ☐ 3 → Agradeça e finalize a entrevista

48. Com que idade você começou a fumar?

99 Não sabe/não respondeu

[FUMANTE DIÁRIO]

49. Em média, quantos dos seguintes produtos você fuma por dia?

ENT: PARA CADA ITEM REGISTRE A QUANTIDADE POR DIA. CASO O INFORMANTE NÃO FUME, FUME UM DOS ITENS, MAS FUME MENOS QUE 1 UNIDADE POR DIA OU NÃO SAIBA RESPONDER, DEIXE O CAMPO PARA REGISTRO EM BRANCO E ASSINALE A OPÇÃO CORRESPONDENTE: “NENHUM” (000) OU “MENOS QUE 1 VEZ POR DIA” (888) OU “NÃO SABE” (999).

SE O ENTREVISTADO RESPONDEU EM MAÇOS OU PACOTES, SE INFORME PARA SABER QUANTOS TÊM EM CADA UM E CALCULE O NÚMERO TOTAL.

LEIA CADA ITEM:	Por dia	Menos que 1 por dia, porém mais do que 0	Nenhum	Não sabe
a. Cigarros industrializados (não incluir cigarros de Bali/kreteks, cigarros indianos/bidis)		888	000	999
b. Cigarros de palha ou cigarros enrolados à mão (fumo desfiado ou de rolo)?		888	000	999
c. Cachimbos?		888	000	999
d. Charutos ou cigarrilhas?		888	000	999
h. Outros → Especifique: _____		888	000	999

[FUMANTE OCASIONAL]**50. Em média, quantos dos seguintes produtos você fuma por semana?**

ENT: PARA CADA ITEM REGISTRE A QUANTIDADE POR SEMANA. CASO O INFORMANTE NÃO FUME, FUME UM DOS ITENS, MAS FUME MENOS QUE 1 UNIDADE POR SEMANA OU NÃO SAIBA RESPONDER, DEIXE O CAMPO PARA REGISTRO EM BRANCO E ASSINALE A OPÇÃO CORRESPONDENTE: "NENHUM" (000) OU "MENOS QUE 1 VEZ POR SEMANA" (888) OU "NÃO SABE" (999).

SE O ENTREVISTADO RESPONDEU EM MAÇOS OU PACOTES, SE INFORME PARA SABER QUANTOS TÊM EM CADA UM E CALCULE O NÚMERO TOTAL.

LEIA CADA ITEM:	Por semana	Menos que 1 semana, porém mais do que 0	Nenhum	Não sabe
a. Cigarros industrializados (não incluir cigarros de Bali/kreteks, cigarros indianos/bidis)		888	000	999
b. Cigarros de palha ou cigarros enrolados à mão (fumo desfiado ou de rolo)?		888	000	999
c. Cachimbos?		888	000	999
d. Charutos ou cigarilhas?		888	000	999
e. Outros → Especifique: _____		888	000	999

51. Quanto tempo depois de acordar você fuma o primeiro cigarro?

Entrevistador: Leia as alternativas.

- 1 Dentro de 5 minutos
 2 Entre 6 minutos e 30 minutos
 3 Entre 31 minutos e 60 minutos
 4 Após 60 minutos

Agradeça e finalize a entrevista

[EX-FUMANTE ATUAL]**52. Há quanto tempo você parou de fumar?**

ENT: REGISTRE APENAS OS TEMPOS EM QUE O ENTREVISTADO PAROU DE FUMAR REGULARMENTE. NÃO INCLUA AS OCASIÕES EXCEPCIONAIS EM QUE ELE FUMOU.

MARQUE A UNIDADE E REGISTRE O NÚMERO.

ANOS	☐			
MESES	☐			
SEMANAS	☐			
DIAS	☐			

Agradeça e finalize a entrevista

Observações: _____

CARACTERIZAÇÃO

Atividade Física

(1) Sim (2) Não

Qual?

() diário

() 3-4x/semana

() 1-2x/semana

() 5-6x/semana

Antecedentes Familiares

1) Câncer

() Mama () Útero () Ovário () Cólon () Outro

Qual? _____

2) Osteoporose: (1) Sim (2) Não

3) Hipertensão: (1) Sim (2) Não

4) Doença Cardiovascular: (1) Sim (2) Não

Qual doença? _____

5) Diabetes Mellitus: (1) Sim (2) Não

Dados Clínicos da Paciente

6) Hipertensão: (1) Sim (2) Não

7) Tireiodopatia: (1) Sim (2) Não

Qual? _____

8) Doença Cardiovascular: (1) Sim (2) Não

Qual doença? _____

9) Diabetes Mellitus: (1) Sim (2) Não

10) Cirurgia: (1) Sim (2) Não

Qual(is)? _____

11) Câncer: (1) Sim (2) Não

() Mama () Útero () Outro Qual? _____

() Ovário () Cólon

12) Faz uso de alguma medicação? (1) Sim (2) Não

Qual (is)? _____

AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

Parâmetros	Valores Normais	Valores Obtidos	Observações
Altura (cm)			
Peso atual (kg)			
IMC			
Classificação			

Estadiamento

() Estadio 0	Tis		M0
() Estadio IA	T1a	N0	M0
() Estadio IA1	T1a1	N0	M0
() Estadio IA2	T1a2	N0	M0
() Estadio IB	T1b	N0	M0
() Estadio IB1	T1b1	N0	M0
() Estadio IB2	T1b2	N0	M0
() Estadio IIA	T2a	N0	M0
() Estadio IIB	T2b	N0	M0
() Estadio IIIA	T3a	N0	M0
() Estadio IIIB	T1, T2, T3a	N1	M0
	T3b	Qualquer N	M0
() Estadio IVA	T4	Qualquer N	M0
() Estadio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

Agradeça e finalize a entrevista

Observações: _____

ANEXO C

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de Variantes do HPV 16 e 18 em Câncer do Colo do Útero em Usuárias da Rede SUS em São Luís, Maranhão

Pesquisador: Maria do Destemo Soares Brandão Nascimento

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 47408215.0.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLOGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.289.419

Apresentação do Projeto:

Introdução: O câncer do colo do útero (CCU) é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo com aproximadamente 530 mil casos novos por ano, sendo responsável pelo óbito de 274 mil mulheres por ano. No Maranhão, o câncer de colo de útero é o mais prevalente, com estimativa de 880 casos em 2014. O papilomavírus humano (HPV) são vírus não envelopados, de formato icosaedro e medem aproximadamente 55nm. O genoma do HPV é constituído de um DNA dupla fita circular, contendo cerca de 7.900 pares de base. O HPV é classificado como de alto risco oncogênico e baixo risco oncogênico, sendo os tipos 16 e 18 os tipos de HPV de alto risco oncogênico mais relacionados ao câncer de colo do útero. **Objetivos:** Objetivou-se estimar a frequência dos tipos e variantes intratipo de HPV em amostras de câncer cervical uterino de mulheres encaminhadas para o Hospital do Câncer da Secretaria do Estado de Saúde do Estado do Maranhão e para o Instituto de Oncologia Aldenora Bello. **Métodos:** Será realizada avaliação clínica e sociodemográfica das mulheres com CCU atendidas no Hospital do Câncer do Estado do Maranhão e no Instituto de Oncologia Aldenora Bello. Serão coletadas amostras de peças cirúrgicas, com extração do DNA. Será realizada PCR

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.289.419

Nested e sequenciamento automático para detecção do HPV. Nas amostras positivas para HPV 16 e HPV 18 será realizada detecção das variantes.

resultados Esperados: Espera-se conhecer as variantes intratipo de HPV 16 e 18 na população maranhense, com vistas à promoção da saúde e atenção oncológica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estimar a frequência dos tipos e variantes intratipo de HPV em amostras de câncer cervical uterino de mulheres encaminhadas para o Hospital do Câncer da Secretaria do Estado de Saúde do Estado do Maranhão e para o Instituto de Oncologia Aldenora Bello.

Objetivo Secundário:

1. Descrever o perfil epidemiológico da população de estudo;
2. Estimar a frequência das variantes de HPV 16 e HPV 18;
3. Estabelecer possíveis correlações entre os dados moleculares e epidemiológicos.
4. Estudar a associação dos tipos de HPV e variantes intratipo com características dos tumores encontrados;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos decorrentes dessa pesquisa são mínimos. Se a paciente concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra do tumor para a realização da biópsia ou uma amostra da mesma ser submetida a uma cirurgia, como parte do tratamento. A coleta de material para a biópsia será feita por uma médica(o) pesquisadora(or) participante desse estudo. O tumor será levado ao laboratório onde será isolado o DNA para ser submetido a procedimentos que permitirão identificar o vírus associado ao seu desenvolvimento. Na realização da biópsia pode ocorrer sangramento, que serão manejados pelo médico que está realizando o procedimento, sendo prestada assistência integral à paciente.

Benefícios:

Ações de vigilância dos tipos de HPV circulantes podem favorecer o surgimento de vacinas contra novos tipos de HPV próprios da região, ou seja, específicas para o Estado do Maranhão. Poucos estudos foram realizados no Brasil em relação ao estudo das variantes dos HPV 16 e HPV 18. No Maranhão, este tipo de estudo nunca foi realizado. É pioneiro. O interesse neste tópico vem crescendo muito nos últimos anos, tendo em vista

possíveis variações no prognóstico dos carcinomas em diferentes estágios de evolução dependendo da variante viral encontrada. Mesmo em trabalhos realizados no mundo, muitas

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.289.419

destas questões permanecem ainda não esclarecidas e muito achados são contraditórios, tomando fundamentais novas e contínuas abordagens a cerca desse tema. Com os dados obtidos neste projeto, pretende-se adicionar informações e esclarecer questões que envolvam a patologia do câncer de colo uterino. Através da análise molecular da presença do HPV e sua genotipagem, poderemos monitorar a prevalência do HPV nos tumores de colo de útero e estabelecer possíveis correlações entre as características clínicas dos tumores e os dados moleculares dos HPVs presentes. A avaliação das variantes dos HPVs 16 e 18 presentes nas lesões nos darão informações inéditas sobre estes vírus presentes nas mulheres maranhenses além de informações valiosas sobre os fatores que levam a persistência ou a eliminação viral uma vez que estudos sugerem que as variantes intratipo podem ter grande influência nessa questão acerca da patogênese do vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa esta bem elaborada com bons objetivos, que são possíveis de serem alcançados, tem financiamento da FAPEMA o que torna a pesquisa com boa capacidade de execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórias foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Não existem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_512297.pdf	21/07/2015 09:22:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE do Projeto Universal Dra Desterro.doc	21/07/2015 09:21:49		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto Universal FAPEMA 2015 Dra. Desterro.pdf	21/07/2015 09:21:38		Aceito

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
 Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA**



Continuação do Parecer: 1.289.419

Investigador	Projeto Universal FAPEMA 2015 Dra. Desterro.pdf	21/07/2015 09:21:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Universal FAPEMA 2015 Dra. Desterro.doc	21/07/2015 09:21:17		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO - HPV.pdf	12/05/2015 00:00:38		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 21 de Outubro de 2015

Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
 Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

APENDICE A



Número do Formulário: |_|_|

Projeto: **Avaliação das linhagens do papilomavírus humano (HPV) 16 no câncer de colo do útero e seu impacto na resposta ao tratamento com radioterapia e quimioterapia**

Essa pesquisa tem como objetivo investigar avaliar correlações entre as variantes do HPV 16 e a resposta ao tratamento oncológico do câncer do colo do útero.

IDENTIFICAÇÃO

Nome da unidade de saúde: _____

Nº do prontuário/registro na unidade de saúde: _____

Nome da paciente: _____

Data de nascimento: _____

Idade: _____

Data da coleta da amostra do HPV: _____

Tipo do HPV: _____

Variante do HPV: _____

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Antecedentes pessoais:

HAS () Sim () Não

DM () Sim () Não

Outra patologia, Quais? _____

Cirurgia prévia, Quais? _____

Data biópsia (__/__/__)

Tipo Histológico: _____

Grau Histológico ()X ()I ()II ()III ()IV

Hidronefrose ao diagnóstico? _____

Meta linfonodal regional ao diagnóstico? _____

Estadiamento

() Estadio 0	Tis		M0
() Estadio IA	T1a	N0	M0
() Estadio IA1	T1a1	N0	M0
() Estadio IA2	T1a2	N0	M0
() Estadio IB	T1b	N0	M0
() Estadio IB1	T1b1	N0	M0
() Estadio IB2	T1b2	N0	M0
() Estadio IIA	T2a	N0	M0
() Estadio IIB	T2b	N0	M0
() Estadio IIIA	T3a	N0	M0
() Estadio IIIB	T1, T2, T3a	N1	M0
	T3b	Qualquer N	M0
() Estadio IVA	T4	Qualquer N	M0
() Estadio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

PREENCHER, SE TIVER SIDO REALIZADA CIRURGIA

Data cirurgia (__/__/__)

Tipo cirurgia? _____

Tipo histológico? _____

Grau histológico? _____

Invasão angiolinfática? _____

Profundidade de invasão? _____

Dimensão tumor? _____

Margens? _____

Infiltração paramétrios? _____

Linfonodos regionais infiltrados? _____

Estádio patológico? _____

PREENCHER, SE TIVER SIDO REALIZADA QUIMIOTERAPIA

Quimioterapia neoadjuvante? _____

Quimioterápico? _____

Dose? _____

Quimioterapia radiosensibilizadora? _____

Quimioterápico? _____

Dose? _____

Ciclos? _____

Intercorrências? _____

PREENCHER, SE TIVER SIDO REALIZADA RADIOTERAPIA

Data de início da Radioterapia (__/__/__)

Data de término da Radioterapia (__/__/__)

Duração da Radioterapia (dias) _____

Dose Radioterapia pélvica? _____

Dose parâmetros?_____

Dose reforço rotatório?_____

Braquiterapia completa?_____

Dose ponto A?_____

Dose ponto B?_____

Braquiterapia cilindro?_____

Dose na superfície?_____

Intercorências?_____

TOXICIDADE

Hemograma prévio Radioterapia?_____

Transfusão sanguínea?_____

Toxicidade sanguínea?_____

Toxicidade urinária?_____

Toxicidade gastrointestinal?_____

AValiação de Resposta

EXAME CLINICO?_____

EXAME DE IMAGEM?_____

_____EXAME

CITOLÓGICO?_____

OBSERVAÇÕES

APENDICE B

Number assigned to your submission (Manuscript #APJCP-1901-3953)

De: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention
Para: vidal27@uol.com.br
Cópia: apjcp.copy@gmail.com
Cópia oculta:
Assunto: Number assigned to your submission (Manuscript #APJCP-1901-3953)
Enviada em: 31/12/2018 | 22:00
Recebida em: 31/12/2018 | 22:05

Manuscript ID: APJCP-1901-3953

Manuscript Title: **Impact of HPV16 lineages infection on response to radio-chemotherapy in cervical cancer**

Authors: FABIO VIDAL FIGUEIREDO, LAILSON OLIVEIRA DE CASTRO, Liwerbeth Pereira, Rodrigo Da Silva, Gerusinete dos Santos, ZULMIRA SILVA BATISTA, Maria do Desterro Soares Nascimento

Dear Mr. FABIO VIDAL FIGUEIREDO

I would like to acknowledge receiving of your manuscript titled "**Impact of HPV16 lineages infection on response to radio-chemotherapy in cervical cancer**". Your manuscript will undergo the review process. You can learn about our review process by visiting [APJCP's peer review process](#) page.

Please be sure that the submitted manuscript has not been published previously and will not be submitted elsewhere prior to our decision.

You will be informed of our editorial decision once your manuscript has been reviewed. You can always track your manuscript by login to the [APJCP site](#).

Important Notice: Any future communications (email) about this manuscript should be done through our editorial system. All emails will be answered in 3 to 5 days unless your desired action has been taken place or acted on (you can track the action in our editorial system).

I wish to take this opportunity to thank you for sharing your work with us.

Regards,

Executive Managing Editor of Asian Pacific Journal of Cancer Prevention

Manuscript ID	APJCP-1901-3953						
Manuscript Title	Impact of HPV16 lineages infection on response to radio-chemotherapy in cervical cancer						
Manuscript Type	Research Articles						
Section	Cancer Treatment (Surgery, Chemotherapy, Radiotherapy, Hormone therapy, etc..)						
Running Title	HPV16 variants response radiotherapy						
Main Subjects	Obstetrics and gynaecology / Gynaecological oncology						
Abstract	Abstract Objective: Estimate the frequency of Human papilloma virus (HPV) 16 lineages in specimens of cervical cancer, relate the pathological factors in those variants and assess the response to treatment with radical chemoradiotherapy. Methods: Samples of cervical cancer were collected from women referred to reference cancer hospital to test the presence of Human papilloma virus types DNA. The standard protocol of the service consisted of cisplatin based chemotherapy 40 mg/m² plus conventional pelvic irradiation in the dosis of 45-50.4 Gy and high dose rate brachytherapy of 28-30 Gy to Point A The response to chemotherapy was avaliated after three months in those patients with HPV -16 lineage. Result: HPV DNA was detected in out 104 (88.1%) of the 118 patients. HPV-16 present in 63 patients (53%). Lineages of HPV 16 identified in 57 patients being: 33 (57.8%) lineage A, 2 lineage B (3.5%), 2 lineage C (3.5%) and 20 (35.0%) lineage D. The median age of the patients was 48.4 years (range 25-85 years). Squamous cell carcinoma was detected 48 times (84.2%). Adenocarcinoma were more likely to occur in lineage D, as three of the four cases occurred in this lineage. A total of 11 patientes with HPV-16 variant were treated with chemoradiotherapy. After three months, was observed that nine of the eleven patients (81.8%) achieved complete response: five of the lineage A, two of the lineage C and two of the lineage D. The cases of partial response and progression of disease, one each, occurred in the lineage A. Conclusion: We could not establish a association between HPV-16 lineages and local response to chemoradiotherapy due to small number of patients and irregular distribution of lineages, although the two cases of tumor persistence occurred in patients with lineage D.						
Keywords	Cervical cancer, HPV 16 variants, Radiotherapy, follow-up						
Suggested Reviewers	Chein, Maria Bethania Costa Oliveira, Rui Miguel Gil da Costa						
Comments							
Authors							
#	Name	Email Address	Degree	Position	Phone	Country	Affiliation
1	FIGUEIREDO, FABIO VIDAL* 	vidal27@uol.com.br	MSc Student	Other		Brazil	Postgraduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhao
2	DE CASTRO, LAILSON OLIVEIRA 	lailson.oliveira@outlook.com	BSc	Other		Brazil	Federal University of Maranhao
3	Pereira,	liwerbeth@gmail.com	BSc	Other		Brazil	Federal

	Liwerbeth						University of Maranhao
4	Da Silva, Rodrigo 	rodrigo.1979@hotmail.com	MD	Other		Brazil	Federal University of Maranhao
5	dos Santos, Gerusinete 	gerusinete@hotmail.com	MD	Other		Brazil	Federal University of Maranhao
6	BATISTA, ZULMIRA SILVA	zubatista@yahoo.com.br	PhD	Other		Brazil	Federal University of Maranhao
7	Nascimento, Maria do Desterro Soares 	m.desterro.soares@gmail.com	PhD	Associate Professor		Brazil	Universidade Federal do Maranhao Departamento de Patologia
Submit Date		2019-01-01 03:30:41					
Current Status		Submitted by Author					
Modify Date		2019-01-01 03:30:41					
Related Files							
#	File Type	File Name	Size	File Description	Upload Date		
 Files Sent by Authors							
1	Manuscript Main File	Manuscrit HPV lineages 1.docx	43.94 KB	Manuscript	2019-01-01		
2	Cover Letter	Cover_letter HPV lineages1.doc	30 KB		2019-01-01		
3	Table	Table 1.docx	25.28 KB	Table 1	2019-01-01		
4	Figure	Figure 1.docx	25.92 KB	Figure 1	2019-01-01		
5	Authorship and Conflict of Interest Disclosure Form	Disclosure - Copia.doc	28 KB	Disclosure	2019-01-01		

APENDICE C

Title :

Impact of HPV16 lineages infection on response to radio-chemotherapy in cervical cancer

Running title:

HPV16 variants response radiotherapy

Abstract

Objective: Estimate the frequency of Human papilloma virus (HPV) 16 lineages in specimens of cervical cancer, relate the pathological factors in those variants and assess the response to treatment with radical chemoradiotherapy.

Methods: Samples of cervical cancer were collected from women referred to reference cancer hospital to test the presence of Human papilloma virus types DNA. The standard protocol of the service consisted of cisplatin based chemotherapy 40 mg/m² plus conventional pelvic irradiation in the dosis of 45-50.4 Gy and high dose rate brachytherapy of 28-30 Gy to Point A The response to chemotherapy was avaliated after three months in those patients with HPV -16 lineage.

Result: HPV DNA was detected in out 104 (88.1%) of the 118 patients. HPV-16 present in 63 patients (53%). Lineages of HPV 16 identified in 57 patients being: 33 (57.8%) lineage A, 2 lineage B (3.5%), 2 lineage C (3.5%) and 20 (35.0%) lineage D. The median age of the patients was 48.4 years (range 25-85 years). Squamous cell carcinoma was detected 48 times (84.2%). Adenocarcinoma were more likely to occur in lineage D, as three of the four cases occurred in this lineage. A total of 11 patientes with HPV-16 variant were treated with chemoradiotherapy. After three months, was observed that nine of the eleven patients (81.8%) achieved complete response: five of the lineage A, two of the lineage C and two of the lineage D. The cases of partial response and progression of disease, one each, occurred in the lineage A.

Conclusion: We could not establish a association between HPV-16 lineages and local response to chemoradiotherapy due to small number of patients and irregular distribution of lineages, although the two cases of tumor persistence occurred in patients with lineage D.

Keywords: Cervical cancer, HPV 16 variants, Radiotherapy, follow-up

1 Introduction

Among women are estimated 8.6 million new cases of cancer and 4.2 million deaths for 2018. Cervical cancer occupies the fourth position in incidence and mortality, with 569,847 new cases (6.6%) and 311,365 deaths (7.5%). Its frequency relates to Human Development Index (HDI), although its frequency is declining in developed countries, we observe a burden of new cases in regions less developed. Are expected 710,249 new cases in the world so soon as 2013 (Bray et al. 2018). High-risk human papillomavirus (HPV) infection are the main cause of cervical cancer (zur Hausen, 2002). Its presence is considered necessary, but nor sufficient for the development of this type of cancer (Bosch et al., 1995). Among the high-risk types HPV with oncogenic potential, the HPV 16 is responsible for half of the cases of cervical cancer (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2002).

In addition to the classification of HPV types, we can analyze in terms of variants. A variants lineage must show a difference between 1% and 10% in the nucleotide sequences of the protein L1. Since 2013 the classification of HPV16 variants utilizes a numerical alpha pattern, they were grouped in four main strains: A, B, C and D. Lineage A includes the sublineages before known as European (A1, A2, A3) and Asian (A4). Lineage B includes the sublineages African 1a and African 1b (B1, B2). Lineage C encompasses the old African branch 2. Lineage D includes the sublineages North American (D1), Asian American (D2, D3) (Yamada et al., 1975; Burk et al., 2013). Several studies suggested that this genetic variability between the HPV16 variants could influence the potential for infection, viral persistence and development of invasive cervical cancer (Villa et al., 2000; Bernard et al., 2006; Gheit et al., 2011).

Remains controversial the role of genotyping HPV to determine better outcome in cervical cancer treatment. Some studies suggested that the determination of HPV type has no prognostic significance in cervical carcinoma (Kristensen et al., 1996) and others demonstrated poorer response to radiotherapy observed in the patients with the HPV16 genotype (Ferdousi et al., 2010). It was hypothesized that this phylogenetic single-nucleotide polymorphism among HPV 16 lineages and sublineages could provide difference in the response to cancer treatment with radiotherapy and chemotherapy depending of the detected HPV variant (Hang et al., 2014) and thus serve as a

prognostic factor in the treatment of cervical cancer. However the role of HPV variants as a modulator factor on response to treatment in carcinoma of the cervix still uncertain.

2 Materials and methods

Patients with proven cervical cancer were invited to participate in this study, conducted between April 2016 and April 2018 at the Aldenora Bello Cancer Hospital and Tarquinio Lopes Filho Cancer Hospital, located in São Luis – Maranhão (Brazil). The Institutional ethical committee approved the study. Written informed consent was obtained from all patients before trial initiation.

2.1 Patient population

The detection of HPV genome was performed in the cervical tumor before treatment. All patients were staged by the criteria of the International Federation of Gynecology and Oncology (FIGO). Contrast enhanced computadorized tomography (CT) of the abdomen and pelvis performed to access the lymph node involvement. Pathological features as tumor size, histological type, grade of differentiation, hemoglobin level and parametrial and vaginal were recorded. We included patients treated with concurrent chemotherapy radiotherapy treatment (CCRT) for the purpose of cure.

2.2 Typing of HPV DNA and variant definition

Specimens were freshly collected from tumor tissues. The collected samples were conditioned in micro tubes containing one ml of RNA Later and snap frozen at -80°C until use. The extraction of the genomic DNA was performed according to the protocol described in Dneasy Blood and Tissue kit. To identify the presence of HPV DNA, the Nested PCR amplification technique was performed using specific sequence of primers, in two rounds. The amplified DNA fragments visualized in an ultraviolet light transilluminator. The L1 PCR products purified

with the Genelupe PCR Clean Up kit according to manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, USA). HPV positive specimens were typed by automated sequencing of the PCR product using the MegaBace 1000 sequencer (GE Healthcare, UK), and the PCR sequencing was performed by the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol. The program Chromas used to analysis and alignment of the nucleotide sequences obtained. Those nucleotide sequences of the samples were compared to the World Bank of Nucleotides Database (Gene Bank) using the BLAST program (<http://www.ncbi.gov/BLAST>) to confirm the identified HPV types and variants. All generated sequences were aligned according to HPV16 specific lines using reference sequences proposed by Burk (2013) using the MEGA 6.0 software (www.megasoftware.net).

2.3 Radiotherapy and concurrent chemotherapy

Patients treated according to the department protocol. The treatment consisted of external beam radiotherapy (EBRT) with a 4-field box technique to the whole pelvis, protecting organs at risk, with a total dose of 45-50.4 Gy , five fractions applied weekly in daily fractions of 1.8 Gy. Additional parametrial boost until 54 Gy, protecting the midline, was given with dose calculated according to the stage. External beam irradiation was carried out using Cobalt-60 or 6 MV linear accelerator (Siemens). The patients treated with CCRT, received cisplatin, 40mg/m² for 6 cycles, weekly, given concurrent with external beam radiotherapy. Intracavitary brachytherapy was given using the high-dose rate (HDR) afterloading technique, delivered in four fractions, two times a week, with a dose of 7-7.5 Gy per fraction to Point "A" depending on the tumor stage and tumor volume.

2.4 Local response to treatment

The assessment of local response to treatment was programmed to occur 12 weeks after radiotherapy finish, performed with gynecological clinical examination, a cervical cytology,

appropriate imaging studies (in all cases CT, whenever appropriate ultrasound or magnetic resonance imaging) and cervical biopsies in doubtful cases to access absence or presence of the tumor. They were classified as complete response (100% reduction of the initial tumor volume without clinical or radiologic evidence of disease), partial response (reduction of the initial tumor volume by at least 50%), stable disease (reduction of less than 25% or progression up to 10% of the initial volume) and progression of disease (increase of more than 25% of the initial volume).

2.5 Statistical analysis

Only a descriptive analysis was performed.

3 Results

3.1 Patient characteristics

HPV DNA was detected in 104 of the 118 (88.1%) women recruited. The HPV 16 present in 63 patients (53.3%), in six specimens it was not possible identify the intra-type variant, hence, 57 patients were included to analyze HPV 16 lineages. The clinical information database is shown in Table 1. The European HPV-16 variants were more common, as 33 (57.8%) patients were infected by lineage A. Non-European HPV16 variants were mainly lineage D, with 20 (35.0%) patients. The lineages B and C were observed in two (3.5%) patients, each. The median age of the patients was 48.4 years (range 25-85 years). Advanced FIGO stage was commonly observed, the cases were classified as stage IB1 in 8 patients, stage IIA in 6, stage IIB in 11, stage IIIB in 28 and stage IVA in 4 patients. The tumor size of the cervix was ≤ 4.0 cm in 20 cases and > 4.0 in the remaining 37 patients. Squamous cell carcinoma was detected 48 times (84.2%). Adenocarcinoma were more likely to occur in lineage D, as three of the four cases occurred in this lineage.

3.2 Irradiation techniques, doses and efficacy assessment of treatment

Out of the 57 HPV- 16 lineage identified patients, 11 patients underwent concomitant radiochemotherapy with the intention of achieving cure. Seven of the European group with lineage A and four of the non-European group, being two of the lineage C and two of the lineage D. Chemotherapy cisplatin based with dose of 40 mg/m², the number of cycles ranged 2-6 (mean 5,5). Conventional pelvic irradiation ranged from 45-50.4 Gy (mean 4.9 Gy) in 25 to 28 fractions. High dose rate brachytherapy of 28-30 Gy (mean 29 Gy) to Point A, distributed in four fractions, two times a week.

The mean time of assessment of response to treatment was 119 days. Overall nine of the eleven patients (81.8%) achieved complete response: five of the lineage A, two of the lineage C and two of the lineage D. The cases of partial response and progression of disease, one each, occurred in the lineage A. The cases of partial response and disease progression were confirmed by physical examination, CT and MRI.

Discussion

Cisplatin based chemoradioterapy has been a cornerstone in treatment of advanced cervical cancer at the last two decades. The quasi-simultaneous publication of randomized trials demonstrated improvement in disease-free survival and overall survival (Morris et al., 1999; Rose et al., 1999; Whitney et al., 1999). Meta-analyses also observed a better survival when compared to isolated radiotherapy (Green et al., 2005). After a complete course of radiotherapy, the lower the stage, the more likely to achieve a complete response; Stage I = 94%; Stage II = 86%, Stage III = 62% (Jacobs et al, 1986). The complete response after a complete course of radiotherapy is a predictor of survival, the 5 years survival rates varies between 76% and 41% when a complete response is achieved or not (Huang et al., 2016).

Since patients with the same pathological factors do not evolve the same way applying the same therapy and the human papillomavirus is the virtually cause of all cervical cancers, it was hypothesized that its types and its variants could be used as a prognostic factor to estimate response to treatment and survival. The use of HPV type as a prognostic factor remains controversial; some studies demonstrated a worse prognosis for HPV 18 infected patients (Lai, et al., 2007), others studies have shown a poorer outcome for HPV 16 detected tumors (Ferdousi et al., 2010, Lau et al., 2015). HPV 16 is the most prevalent type of human papillomavirus worldwide, from normal cytology tests, ranging from lesions at different stages of progression to cervical cancer, it counts at least for 50% of the all cervical cancer in the world (de Sanjose, et al., 2007; Gheit et al., 2011; Crow, 2012). The study of variants and lineages of human papillomavirus is concentrated in HPV 16 variants and could be the key to understand how the difference in viral genome influence development of cancer and mediate resistance to oncological treatment.

A few studies address the association of HPV variants and response to chemoradiotherapy. The literature suggests that European human papillomavirus variants would provide the better response to chemoradiotherapy. As Moreno-Acosta (2017) reported in his previous work, out eleven of seventeen patients with European variant, treated with radiotherapy +/- chemotherapy, achieved complete response; and in the non-European variants, the complete response was observed in one of two cases. In our study, out two of the seven patients HPV 16 lineage A evolved with tumor persistence; while in the non-European HPV lineages, two patients with lineage C and two patients with lineage D, was observed complete response within three months after chemo-irradiation. The small number of patients studied and irregular distribution of lineages evaluated do not permitted establish association between HPV-16 lineages and response to treatment. A multi-institutional cohort study, with a larger

number of patients larger addressing the various HPV 16 intratype variants should answer this question.

References

1. American College of Obstreticians and Gynecologists (2002). ACOG practice bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35. *Int J Gynaecocol Obstet*, **78**, 79-91.
2. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST (2006) Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, **118**, 1071-6.
3. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 796-802.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, **68**, 394-424.
5. Burk RD, Harari A, Chen Z (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology*, **445**, 232-43.
6. Crow JM, 2012. HPV: The gobal burden. *Nature*, **488**, S2-3.
7. De Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, et al (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **7**, 453-9.

8. Ferdousi J, Nagai Y, Asato T, et al (2010). Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *Exp Ther Med*, **1**, 525-30.
9. Green J, Kirwan J, Tierney J, et al (2005). Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *Cochrane Database Syst Rev*, **3**, CD002225.
10. Gheit T, Cornet I, Clifford GM, et al (2011). Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **20**, 1315-21.
11. Hang D, Gao L, Sun M, et al (2014). Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of human papillomavirus 16 European and Asian variants. *J Med Virol*, **86**, 618-26.
12. Huang K, Sun H, Chen Z, et al (2016). Optimal pathological response indicated better long-term outcome among patients with stage IB2 to IIB cervical cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy, *Sci Rep*, **6**, 28278.
13. Jacobs AJ, Faris C, Perez CA, et al (1986). Short-term persistence of carcinoma of the uterine cervix after radiation. An indicator of long-term prognosis. *Cancer*, **57**, 944-50.
14. Kristensen GB, Karlsen F, Jenkins A, et al (1996). Human papilloma virus has no prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer*, **32**, 1349–53.
15. Lai CH, Chang CJ, Huang HJ, et al (2007). Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *J Clin Oncol*, **25**, 3628-3634.
16. Lau YM, Cheung TH, Yeo W, et al (2015). Prognostic implication of human papillomavirus types and species in cervical cancer patients undergoing primary treatment. *PLoS One*, **10**, e0122557.

17. Moreno-Acosta P, Vallard A, Molano M, et al (2017). HPV-16 variants'impact on uterine cervical cancer response to radiotherapy: A descriptive pilot study. *Cancer Radiotherapie*, **21**, 104-8.
18. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al (1999). Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med*, **340**, 1137-43.
19. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al (1999). Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med*, **340**, 1144-53.
20. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, **81**, 2959-68.
21. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al (1999). Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, **17**, 1339-48.
22. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al (1997). Human Papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, **71**, 2463-72.
23. zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, **2**, 342-50.

Table 1 Clinical and pathological characteristics of patients with Human papilloma virus (HPV) 16 lineages identified (n = 57).

HPV 16 LINEAGES	A	B	C	D	n = 57	(%)
N° of patients	33	2	2	20	57	100.0
Mean age (years)	48.3	58.5	58.5	46.4		
FIGO stage						
IB1	5	0	0	3	8	13.9
IIA	4	0	0	2	6	10.5
IIB	7	0	1	3	11	19.3
IIIB	16	1	1	10	28	49.1
IVA	1	1	0	2	4	7.0
Tumor size						
≤ 4.0 cm	10	0	1	9	20	35.1
> 4.0 cm	23	2	1	11	37	64.9
Histological type						
Squamous cell carcinoma	30	2	1	15	48	84.2
Adenocarcinoma	1	0	0	3	4	7.0
Carcinoma	1	0	0	1	2	3.5
Malignant neoplasm	1	0	1	1	3	5.2
Grade of differentiation						
Well	3	0	0	1	4	7.0
Moderately	10	1	0	8	19	33.3
Poor	12	1	2	6	21	36.8
Not reported	8	0	0	5	13	22.8

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics; HPV: Human papilloma virus.

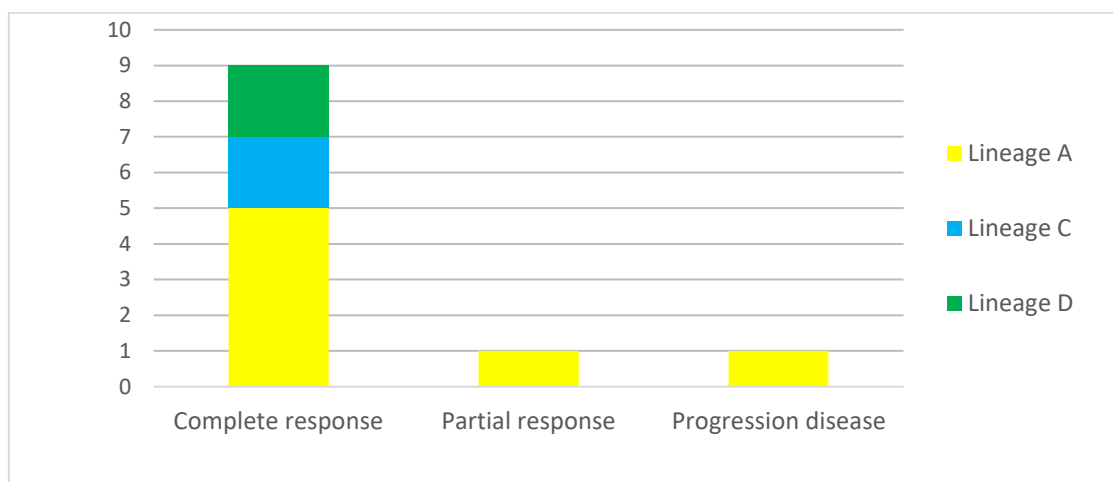


Figure 1. Local response of treatment after chemoradiotherapy in patients with human papillomavirus (HPV) 16 lineages.

APENDICE D

BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology



**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS
GENOTYPE UNDETECTED IN CERVICAL CANCER: AN
OVERVIEW OF EVIDENCE**

Journal:	<i>BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Review article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Figueiredo, Fabio; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão de Castro, Lailson; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão Pereira, Lierbeth; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão dos Santos, Gerusinete; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão Batista, Zulmira; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão Nascimento, Maria do Desterro; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão
Keywords:	CARCINOMA OF THE CERVIX: DIAGNOSIS
Clinical Category:	GYNAECOLOGICAL ONCOLOGY
Abstract:	HPV DNA virus is not detected in 10-20% of cervical cancer. Attempts to establish prognostic significance for the absence HPV generated conflicting results. To determine the impact of undetected HPV in cervical cancer was performed a literature search on PUBMED database of studies that evaluated presence of HPV DNA in cervical cancer and response to treatment, and survival. Fifteen studies included in this review. Undetected HPV patients presents a higher tax of adenocarcinomas and with worse complete response to chemo radiation, disease-free survival and overall survival. HPV-negative patients could be beneficiated of more aggressive approaches and a closer follow-up.

SCHOLARONE™
Manuscripts

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS
GENOTYPE UNDETECTED IN CERVICAL CANCER: AN
OVERVIEW OF EVIDENCE**

Authors:

Fabio V. Figueiredo¹, <http://orcid.org/0000-0002-6374-5806>
Lailson O. Castro², <https://orcid.org/0000-0002-4416-9321>
Liwerbeth A. Pereira²
Rodrigo L. Silva¹, MD <https://orcid.org/0000-0001-8489-159X>
Gerusinete R. B. Santos¹, MD <https://orcid.org/0000-0002-1602-4563>
Zulmira S. Batista¹, PHD
Maria do Desterro Nascimento¹, PHD <https://orcid.org/0000-0003-2783-362X>

Affiliations:

- 1) Postgraduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil.
- 2) School of Medicine, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil.

Corresponding Author:

Fábio Vidal de Figueiredo

Address: Postgraduate Program in Adult Health, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Federal University of Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Campus do Bacanga, 65.085-580. São Luís-MA. Brazil

Email: vidal27@uol.com.br

ABSTRACT

HPV DNA virus is not detected in 10-20% of cervical cancer. Attempts to establish prognostic significance for the absence HPV generated conflicting results. To determine the impact of undetected HPV in cervical cancer was performed a literature search on PUBMED database of studies that evaluated presence of HPV DNA in cervical cancer and response to treatment, and survival. Fifteen studies included in this review. Undetected HPV patients presents a higher tax of adenocarcinomas and with worse complete response to chemo radiation, disease-free survival and overall survival. HPV-negative patients could be beneficiated of more aggressive approaches and a closer follow-up.

Keywords: Cervical cancer, HPV, Radiotherapy, prognosis overall survival

INTRODUCTION

Cervical cancer presents a paradox situation in its incidence, while the total of new cases is increasing; its percentage among the total cancers has decreased. As recently as 1975, cervical cancer was the second most common cancer among women worldwide, with 459,000 new cases (15.8%). In 2018 ranks the fourth position in incidence and mortality, being expected 569,847 new cases (6.6%) and 311,365 deaths (7.5%). Its frequency relates to Human Development Index (HDI); although its frequency is declining in developed countries, we observe a burden of new cases in regions less developed, where we observe 63.3% of new cases and 74.5% of deaths by cervical cancer [1, 2].

Historically, cervical cancer has been suggested to be caused by sexually transmitted agent, but the nature of this agent was not known until the 1980s, when was found the association between human papillomavirus (HPV) and human cervical cancer, with nearly 100% of cervical cancer testing positive for HPV [3, 4]. Persistent HPV infection is linked to cervical cancer premalignant lesions as intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) and the progression to cervical cancer. HPV is considered necessary but not sufficient condition for the development, maintenance and progression of intraepithelial lesions [4, 5]. Factors like tabagism, use of hormonal contraceptives, early initiation of sexual intercourse, multiparity, immunosuppression and difficult access to health services are associate with higher incidence rates of cervical cancer [6-9].

HPV is a small double stranded circular DNA virus with a genome of approximately 8,000 base pairs. The non-enveloped viral capsid measures 55 nm in diameter [10-12]. The carcinogenicity of HPV is attributed to viral early expressed genes E6 and E7, whose proteins interfere with the tumor-suppression proteins p53 and pRb, stimulating the cell proliferation and immortalization of this cells [13]. The classification of HPV is based on the comparison of nucleotide sequences of the L1 gene, the most conserved genomic site [14]. There are more than 100 types of HPV. All high-risk oncogenic type HPV belong to alpha genus (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 66). Two of these high-risk type accounts for 70% of cervical cancer worldwide. HPV 16 being observed in 55-60% of all cervical cancers, and HPV 18 occurring in 10-15% with a high association with adenocarcinoma [15-17].

The main prognostic factors for cervical cancer patients with increased risk for recurrence and poorer survival are related to clinical stage, lymph node involvement, parametrial infiltration, tumor size and lymphatic vascular involvement [18-20]. The role of HPV infection as a prognostic factor in cervical cancer remains controversial. Some studies showed that nor the presence or type of HPV DNA could be use as predictor of prognosis [21, 22], others demonstrated a worse evolution to HPV 18 infected tumors [4, 23] and finally also some works suggested worse prognosis to HPV 16 detected tumors [24, 25]. The frequency of HPV DNA in cervical samples usually varies between 70% and values close to 100%, mainly according to the technique used [26, 27]. Although the HPV DNA negative corresponds to a small portion of cases of cervical cancer, it is related in every study and suggests worse prognosis than HPV DNA positive cervical cancer [28-30].

MATERIAL AND METHODS

A literature survey was carried out by consulting the PubMed (US National Library of Medicine) and MEDLINE databases. Initially, a search was made using the key terms (HPV, negative, undetected, cervical cancer, survival). After browsing the retrieved studies, Titles and abstracts were analyzed. Works that do not contemplated the objective were excluded. Studies that met the propose criteria were downloaded as full-text and compared.

RESULTS AND DISCUSSION

Although the human papillomavirus is considered the virtual etiologic agent in all cases of cervical cancer, the cases where is not possible their identification is always reported. This population of cervical cancer whose was not identified the presence of HPV DNA apparently presents an own pattern of evolution of disease, diverse of those where is detected the presence of HPV virus. The frequency of undetected HPV DNA in the studies usually varies from 5% to 20% (Table 1).

The initial studies to assess the significance of absence, presence or type of HPV DNA virus in women with cervical cancer, showed no correlation with patient age, grade tumor, nodal metastases or survival; implicating no prognostic significance of HPV DNA in cervical carcinoma [21, 22]. However, other studies in the same time demonstrated a worse evolution to HPV negative cervical cancer. The cases with negative HPV DNA had a 2.6 times higher risk of relapse and 4.5 times of risk of distant metastases than that cancer with HPV DNA positive. The two years disease free survival was higher in HPV positive cancer (77% versus 40%) [31]. The five years overall survival was worse than the survival of those with HPV +, HPV 16 and HPV 18 (52% compared to 61%, 63% and 62% respectively) but not statically significant [32]. Also has been hypothesized that only HPV 16 to be an independent prognostic factor on the survival of cervical cancer patients [33]. These studies demonstrated inconsistencies that could be explained by insufficient statistical power, selection of patients based on type of treatment or availability of tumor tissue [34].

In the 2000's the studies of patients treated with curative radiotherapy intent started to show a worse prognostic for cervical cancer HPV DNA negative and could be used as a predictive factor for radiotherapy remission. One work demonstrated poorer complete response (33% vs 67%, $p = 0.04$) for HPV negative patients [35]. Others studies that also addressed outcome of cervical cancer treated with radiation alone, in a multivariate analysis showed statistical significant poorer overall survival and disease-free survival in HPV DNA negative tumors [36, 37].

The larger study to analyze the role of HPV DNA status englobed 1,067 women with early stage cervical tumor submitted to curative surgery. Traditional factors associated with outcome like FIGO stage, lymph nodal involvement, parametrial infiltration and grade tumor were correlated to tumor relapse and risk of death. The analysis of DNA status demonstrated an intermediary risk for HPV negative tumor. The five-years relapse free survival, where the HPV negative was 89%, compared to 90% in the HPV positive tumor and 85% in the HPV18 patients. The same with the five-years overall survival in HPV negative tumors was 88%, compared to 91% in HPV positive and 85% to HPV 18 cancer [23].

This intermediary risk for HPV negative tumor was also demonstrated in a work that studied patients treated with primary radiation. The complete response

in HPV negative tumors was 66.6%, compared to 89.4% for HPV positive tumor and 66.6% for HPV 18 cancer. The 5 years overall survival in HPV negative tumor was 50%, compared to 65.2% in HPV positive tumor and 33.3% for HPV 18 cancer [24]. The cervical cancer patients treated with surgery or chemo radiotherapy in which the DNA presence could not be demonstrated seems to present a worse prognostic [38].

The role of HPV DNA status in cervical cancer persisted in doubt. While a study demonstrated that HPV negativity was correlated with better complete response in patients treated with radiotherapy, it had no significant effect on overall survival [39]. Other work showed that the 25% mortality time (number of days that it takes 25% of patients to die) was significantly shorter in the group of HPV negative, 544 days, compared to 1,307 days of the patients with HPV 16 and or 18. [40]. The HPV DNA absence and HPV 18 are included in the high risk group for cervical cancer that are independent of the established prognostic factors like clinical stage, age and lymph node infiltration [37].

The association of more than one method of diagnosis can reduce the frequency of undetected HPV DNA virus in cervical cancer patients. A cohort study whereas 136 women with invasive cervical cancer were submitted to Hybrid Capture 2 (HC2) test showed that 10.2% were not detected HPV DNA virus. A posterior assay using polymerase chain reaction (PCR) reduced the percentage of negative HPV to 5.8%. It seems that HPV negativity be more common in adenocarcinoma tumors than in squamous cell carcinoma. HPV DNA undetected shown a worse prognosis, with a disease free survival of 51.9 months, compared to 109.9 in the group where the HPV DNA was positive [30]. The frequency of HPV DNA negative can be even reduced, when it is analyzed surgery specimens. A study that analyzed cases of cervical cancer HPV negative before treatment were submitted to surgery and a new assay was performed, being demonstrated the HPV genotype in 40% of cases [28].

The frequency of undetected HPV DNA virus varies according to the course of treatment. A study that analyzed the HPV DNA clearance in patients submitted to exclusive radiation or chemoradiotherapy demonstrated HPV negativity of 18% before treatment, 34% during radiotherapy, 66% at the end of treatment and 100% of undetected HPV DNA six months after completion of

treatment. Even so, the group of undetected HPV before treatment had a worse disease free survival [41].

The frequency of adenocarcinoma is very high in populations of HPV 18 and HPV negative cervical cancer patients. It seems that those groups share the same pattern of worse disease free survival and five-years overall survival than that cases of HPV 16 or HPV positive. Although the overall survival in a multivariate analyses is no statically significant [42].

FINAL CONSIDERATIONS

HPV DNA negative is a unique subset of invasive cervical cancer, represents a desfavorable factor of prognosis, with a worse patterns of relapse and survival and high tax of adenocarcinoma association. Their frequency can be reduced with the association of different detection tests. Women with cervical tumor where the presence of HPV genotype has been detected presents high-risk for local relapse and worse overall survival. Maybe this onset of patients could require careful attention. The implementation of HPV bivalent, quadrivalent or nonavalent vaccines shall not have impact in this group of patients. The current management of cervical cancer do not consider the absence, presence or type of HPV like a factor that could imply a more aggressive approach. Larger and more comprehensive clinical trials are required to answer this question.

Statement conflict of Interest:

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Human and Animal Rights and Informed Consent:

This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

Contribution to authorship

The study was conceived by FF. LC, LP performed the literature search. RS and GS collected the data. Interpretation, analysis of data and first written draft was performed by FF and critically reviewed by ZB and MN. All co-authors approved the final version of the manuscript to be published.

Details of ethical approval

Not applicable.

Acknowledgments

The authors thanks FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) and CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

1. Parkin DM, Stjernsward J, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bulletin of the World Health Organization*. 1984;62(2):163-82.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018.
3. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research*. 1976;36(2 pt 2):794.
4. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(11):796-802.
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
6. Datta GD, Colditz GA, Kawachi I, Subramanian SV, Palmer JR, Rosenberg L. Individual-, neighborhood-, and state-level socioeconomic predictors of cervical carcinoma screening among U.S. black women: a multilevel analysis. *Cancer*. 2006;106(3):664-9.
7. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1085-92.

8. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1093-101.
9. Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Diener-West M, et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstetrics and gynecology*. 2005;105(1):174-81.
10. Crawford LV. A study of human papilloma virus DNA. *Journal of molecular biology*. 1965;13(2):362-72.
11. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *The Journal of general virology*. 2018;99(8):989-90.
12. Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *Journal of virology*. 1975;15(5):1239-47.
13. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(5):342-50.
14. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
15. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(6):518-27.
16. Crow JM. HPV: The global burden. *Nature*. 2012;488(7413):S2-3.
17. American College of O, Gynecologists. ACOG practice bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2002;78(1):79-91.
18. Tsai CS, Lai CH, Wang CC, Chang JT, Chang TC, Tseng CJ, et al. The prognostic factors for patients with early cervical cancer treated by radical hysterectomy and postoperative radiotherapy. *Gynecologic oncology*. 1999;75(3):328-33.
19. Kim SM, Choi HS, Byun JS. Overall 5-year survival rate and prognostic factors in patients with stage IB and IIA cervical cancer treated by radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection. *International journal of*

gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society. 2000;10(4):305-12.

20. Rutledge TL, Kamelle SA, Tillmanns TD, Gould NS, Wright JD, Cohn DE, et al. A comparison of stages IB1 and IB2 cervical cancers treated with radical hysterectomy. Is size the real difference? *Gynecologic oncology*. 2004;95(1):70-6.

21. Kristensen GB, Karlsen F, Jenkins A, Kaern J, Abeler VM, Trope CG. Human papilloma virus has no prognostic significance in cervical carcinoma. *European journal of cancer*. 1996;32A(8):1349-53.

22. King LA, Tase T, Twigg LB, Okagaki T, Savage JE, Adcock LL, et al. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer*. 1989;63(5):897-900.

23. Lai CH, Chang CJ, Huang HJ, Hsueh S, Chao A, Yang JE, et al. Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(24):3628-34.

24. Ferdousi J, Nagai Y, Asato T, Hirakawa M, Inamine M, Kudaka W, et al. Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *Experimental and therapeutic medicine*. 2010;1(3):525-30.

25. Lau YM, Cheung TH, Yeo W, Mo F, Yu MY, Lee KM, et al. Prognostic implication of human papillomavirus types and species in cervical cancer patients undergoing primary treatment. *PloS one*. 2015;10(4):e0122557.

26. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):902-7.

27. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*. 2010;11(11):1048-56.

28. Chong GO, Han HS, Park JY, Lee SD, Lee YH, Lee HJ, et al. Prevalence, survival outcomes, and clinicopathologic factors associated with negative high risk human papillomavirus in surgical specimens of cervical cancer with

pretreatment negative DNA genotype test. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2019;29(1):10-6.

29. Li P, Tan Y, Zhu LX, Zhou LN, Zeng P, Liu Q, et al. Prognostic value of HPV DNA status in cervical cancer before treatment: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(39):66352-9.

30. Rodriguez-Carunchio L, Soveral I, Steenbergen RD, Tome A, Martinez S, Fuste P, et al. HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2015;122(1):119-27.

31. Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet*. 1990;335(8699):1171-4.

32. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(19):1361-8.

33. Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, Tanner B, Brockerhoff P, Maeurer M, et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2001;11(1):39-48.

34. Franco EL. Prognostic value of human papillomavirus in the survival of cervical cancer patients: an overview of the evidence. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1992;1(6):499-504.

35. Lindel K, Burri P, Studer HU, Altermatt HJ, Greiner RH, Gruber G. Human papillomavirus status in advanced cervical cancer: predictive and prognostic significance for curative radiation treatment. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2005;15(2):278-84.

36. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ohnishi T. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2002;52(5):1345-51.
37. Wang CC, Lai CH, Huang HJ, Chao A, Chang CJ, Chang TC, et al. Clinical effect of human papillomavirus genotypes in patients with cervical cancer undergoing primary radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010;78(4):1111-20.
38. Chong GO, Lee YH, Han HS, Lee HJ, Park JY, Hong DG, et al. Prognostic value of pre-treatment human papilloma virus DNA status in cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2018;148(1):97-102.
39. Vosmik M, Laco J, Sirak I, Beranek M, Hovorkova E, Vosmikova H, et al. Prognostic significance of human papillomavirus (HPV) status and expression of selected markers (HER2/neu, EGFR, VEGF, CD34, p83, p53 and Ki67/MIB-1) on outcome after (chemo-) radiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Pathol Oncol Res*. 2014;20(1):131-7.
40. Cuschieri K, Brewster DH, Graham C, Nicoll S, Williams AR, Murray GI, et al. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. *International journal of cancer*. 2014;135(11):2721-6.
41. Okuma K, Yamashita H, Yokoyama T, Nakagawa K, Kawana K. Undetected human papillomavirus DNA and uterine cervical carcinoma: Association with cancer recurrence. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2016;192(1):55-62.
42. Hallowell BD, Saraiya M, Thompson TD, Unger ER, Lynch CF, Tucker T, et al. Population-Based Assessment of HPV Genotype-Specific Cervical Cancer Survival: CDC Cancer Registry Sentinel Surveillance System. *JNCI Cancer Spectr*. 2018;2(3).

Table 1: Frequency of HPV DNA not detected in the studies evaluated

Author	Year	Method of detecting HPV	Number of cases	Frequency HPV not detected	Endpoint
Laurel	1989	<i>In situ</i> hybridisation	85	55,2%	OS
Riou	1990	SBH and PCR	106	16,0%	DFS
Burger	1996	PCR	291	15,1%	OS
Kristensen	1996	PCR	223	6,7%	OS
Pfich	2001	PCR	223	23,8%	OS
Undel	2001	PCR	40	30,0%	OS, DFS
Harima	2002	PCR	84	23,8%	OS, DFS
Lai	2007	PCR	1067	4,9%	OS, DFS
Ferdousi	2010	PCR	113	15,9%	OS, CR
Vosmik	2014	PCR	72	20,8%	CR
Cushieri	2014	HPV INNO-LIPA assay	370	12,1%	OS
Rodriguez-Carunchio	2015	PCR and HC2	136	5,8%	DFS
Okuma	2016	PCR	71	18,3%	OS
Chong	2018	PCR	284	18,5%	DFS
Halowell	2018	INNO-LIPA HPV Assay	693	8,5%	OS

PCR (polymerase chain reaction), SBH (Southern Blot Hybridisation), HC2 (Hybrid Capture 2), OS (Overall survival), DFS (Disease-free survival), CR (Complete response).