



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM LESÕES DE COLO DE ÚTERO DE MULHERES SUBMETIDAS AO
TRATAMENTO CIRÚRGICO NO SERVIÇO DE ALTA COMPLEXIDADE DO
ESTADO DO AMAZONAS**

HEIDY HALANNA DE MELO FARAH

MANAUS

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



HEIDY HALANNA DE MELO FARAH

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM LESÕES DE COLO DE ÚTERO DE MULHERES SUBMETIDAS AO
TRATAMENTO CIRÚRGICO NO SERVIÇO DE ALTA COMPLEXIDADE DO
ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

ORIENTADORA: PROFA. DR^a KÁTIA LUZ TORRES SILVA
COORIENTADORA: DR^a CRISTINA MENDES DE OLIVEIRA

MANAUS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Farah, Heidy Halanna de Melo
F219c Caracterização molecular da infecção pelo Papillomavirus Humano em lesões de colo de útero de mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico no serviço de alta complexidade do Estado do Amazonas / Heidy Halanna de Melo Farah. 2017
96 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Katia Luz Torres Silva
Coorientadora: Cristina Mendes de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. hpv. 2. Genotipagem. 3. câncer cervical. 4. Rastreo Molecular. 5. Amazonas. I. Silva, Katia Luz Torres II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as mulheres com câncer do colo do útero, que mesmo acometidas pela doença, dão exemplos de fé e esperança de um dia melhor.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me deu força e perseverança para não desistir e conquistar um de meus sonhos.

À minha família linda, que esteve sempre presente em toda essa caminhada, me dando suporte e entendendo a minha ausência. Especialmente ao meu marido, **Mario Jorge Rondon** por todo apoio, por entender minha ausência e as vezes o meu humor, por todo amor, paciência e respeito. Aos meus filhos, **Enzo Gabriel** e **Bento Manoel**, que participaram assiduamente, me acompanhando nas aulas, estudos e correrias desta fase.

Aos meus pais, **Nelson Farah** e **Simone Loureiro** que sempre acreditaram em meu potencial, agradeço por todos os investimentos feitos em mim, por todos os conselhos e puxadas de orelhas que me tornaram hoje a mulher e profissional que sou.

Ao meu avô, **Arthur Cordeiro** que com sua sabedoria sempre mostrou a importância de orar, perseverar e confiar em Deus, sendo um exemplo de homem de fé para mim e toda a nossa família.

À minha sogra **Léa Cristina Rondon** e minha cunhada **Mariah Jordana Rondon** pela paciência, e especialmente a parceria que tiveram ao sempre cuidarem do Enzo quando eu precisava estar ausente, e por todas as vezes que me ajudaram em algum momento.

À minha madrastra **Darliene Félix** por toda ajuda e cuidado com meu pai e por todas as surpresas organizadas para meus filhos.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. **Kátia Luz Torres Silva**, que durante todos esses anos nunca duvidou do meu potencial, e sempre investiu no meu crescimento profissional. Um ser humano divino, que irradia sabedoria, ensinamento e exemplo por todo o lugar que passa. Obrigada pelas palavras de conforto, conselhos e todos os momentos que pudemos compartilhar. Tenho certeza que todos se sentem confortáveis e felizes ao lado dela, inclusive eu. Obrigada pela paciência, amizade e por sempre está em momentos importantes da minha vida.

A Dra. **Valquíria do Carmo** pela amizade, paciência e confiança, por todos os ensinamentos em biologia molecular, apoio nas análises. Obrigada por compartilhar momentos importantes na minha vida, por todo o incentivo e por todo o apoio em meu trabalho, especialmente nessa fase final, agradeço por todas as etapas que vivenciamos juntas.

A minha coorientadora Dra. **Cristina Oliveira Mendes** pelos ensinamentos na biologia molecular, pela atenção, que mesmo distante sempre contribuiu neste trabalho, ao apoio nas análises e todo conhecimento compartilhado.

A **Josiane Silva**, minha amiga que sempre me aconselhou e me orientou em vários momentos e que sempre tinha uma palavra de aconchego ou engraçada para não me deixar desistir.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa HPV, **Vanessa Santos, Felipe Luz, Laís Silva, Daniele, Leilson Guedes**. Obrigada pelas risadas, amizade e momentos compartilhados durante esses anos. Em especial, a **Daniel Brown e Paloma Menezes**, amigos queridos que sempre me ajudaram na parte clínica dos pacientes, que nunca me deixaram sozinha, obrigada pela ajuda nessa etapa final da dissertação.

Ao **departamento de ensino e pesquisa da FCECON**, por todo o apoio administrativo e ajuda em instalar programas no meu computador.

A todos os professores do **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA**, pelos ensinamentos, auxílio e amizade. Em especial a professora Dra. **Aya Sadahiro** que cedeu seu laboratório para que fossem realizadas as últimas análises da minha dissertação.

À **Fundação Centro de Controle em Oncologia do Estado do Amazonas**, instituição na qual desenvolvi o projeto, a toda a sua Diretoria e, aos enfermeiros responsáveis pelo Centro Cirúrgico, aos internos e médicos cirurgiões, laboratório de patologia, por me permitir traçar mais esta jornada. Especialmente aos doutores **Paulo Roberto Mendonça, Daniel Lira, Marcelo Uratani, Anderson Ferreira Gonçalves, Higino Felipe Figueiredo**, por permitirem a coleta das amostras no centro cirúrgico.

À **Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD**, especialmente aos responsáveis pelo laboratório de virologia que permitiram que utilizasse os aparelhos para a execução das análises. Especialmente a **Dra. Michele de Souza** pelo apoio na interpretação de alguns resultados e conhecimentos compartilhados.

Ao **Instituto de Pesquisa Leônidas & Maria Deane (ILDm)**, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus – Amazonas, por cederem a utilização de equipamentos.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que contribuíram para a melhoria e desenvolvimento deste trabalho.

“Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus para vocês em
Cristo Jesus”.

1 Tessalonicenses 5:18

RESUMO

O câncer cervical apresenta taxas de incidência alarmantes na região Norte do Brasil, tendo o Amazonas uma taxa de 53/100.000 mulheres. A persistência e presença do Papillomavírus humano (HPV) de alto risco está relacionada com o desenvolvimento desta neoplasia. Cerca de 70% dos casos de câncer cervical são pelos genótipos HPV 16 e 18, sendo os mais frequentes em todas as regiões geográficas, contudo, estudos no Brasil mostram uma variabilidade genotípica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar os genótipos do HPV mais prevalentes em mulheres com câncer cervical ou neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III), tratadas em um centro de referência em oncologia do estado do Amazonas. Tratou-se de um estudo observacional, transversal, descritivo, realizado na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), em mulheres submetidas a cirurgia de histerectomia total. Para detecção do HPV foram utilizados os métodos de PCR em Tempo Real para HPV 16 e 18, PCR genérica (PGMY09/11) e o kit comercial PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany). Das 42 mulheres incluídas no estudo, 30,95% possuíam diagnóstico de NIC III e 69,05% de carcinoma invasor, tendo frequência do HPV de 86,2%. A prevalência do HPV em lesões de NIC III foi de 92,3% e em carcinomas invasores foi de 86,2%. Os genótipos mais frequentes foram HPV 16 (70,27%), seguido do HPV 18 (21,62%). Foi encontrado o HPV 06 em uma paciente, que tinha coinfeção por HIV e EBV, apresentando diagnóstico de NIC III. Foram encontrados 5,4% de genótipos indeterminados do HPV. Houve significância estatística quanto a idade das mulheres e a presença do HPV ($p=0,020$). Quanto ao estadiamento FIGO as pacientes apresentaram estágio mais frequente em 1BI (23,8%). Três pacientes apresentaram estadiamento IIB, IIIB e IVB. O tipo histológico mais frequente nas pacientes com carcinomas invasores foi o carcinoma de células escamosas (52,4%), seguido do ADC com 14,3% e um caso de adenoescamoso. A distribuição média da idade em relação aos genótipos do HPV e o status patológico da paciente, mostrou que as mulheres com genótipos HPV 16 e 18 eram mais velhas ($p=0,350$), assim como as mulheres com carcinoma invasor ($p=0,096$). O HPV 06 encontrado em uma das pacientes, é um genótipo de baixo risco e foi relatado o seu envolvimento na patogênese de lesão de alto grau, estando associado a outros vírus. O estadiamento encontrado nas pacientes é um fator de prognóstico para o tratamento da doença, porém, são necessários outros estudos, como análises de sobrevida dessas pacientes. A prevalência do tipo histológico adenocarcinoma apresentou-se alta e sua associação com genótipos do HPV de maior oncogenicidade, pode torná-lo mais agressivo como visto em outros estudos. Sendo o HPV 16 o mais prevalente nas lesões de alto grau ou no carcinoma invasor, são necessários novos estudos sobre as mutações no DNA do HPV 16 para entender a sua patogenicidade nos diferentes tipos histológicos.

Palavras chaves: HPV; genotipagem; câncer cervical; rastreamento molecular; Amazonas.

ABSTRACT

Cervical cancer presents alarming rates in the northern region of Brazil, and in Amazonas this incidence is 53/100,000 women. The persistence and presence of high-risk human papillomavirus (HPV) is related to the development of this neoplasia. About 70% of cervical cancer cases involves HPV 16 and 18 genotypes, being the most frequent in all geographic regions and studies in Brazil shows a genotypic variability. The objective of this study was to characterize the most prevalent HPV genotypes in women with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III (CIN III), attended at referral center in the state of Amazonas. This is an observational, cross-sectional, descriptive study carried out at the Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas - FCECON (Oncology Control Center of Amazonas), in women undergoing total hysterectomy, diagnosed with CIN III and invasive cervical cancer. For HPV detection, Real-Time PCR methods for HPV 16 and 18, generic PCR (PGMY09 / 11) and PapilloCheck® commercial kit. From 42 women included in the study, 30.9% were diagnosed with CIN III and 69.1% with invasive carcinoma, with HPV frequency of 86,2%. The most frequent genotypes were HPV 16 (70.3%), followed by HPV 18 (21.6%). HPV 06 was found in a patient who had co-infection with HIV and EBV, presenting a diagnosis of CIN III. There was statistical significance regarding the age of women and the presence of HPV ($p = 0.020$). FIGO staging the patients presented a more frequent stage in 1BI (23.8%). Three patients presented staging IIB, IIIB and IVB. The most frequent histological type in patients with invasive carcinomas was squamous cell carcinomas (52.4%), followed by ADC with 14.3% and one case of adenosquamous. The mean age distribution in relation to HPV genotypes and patient pathological status showed that women with HPV 16 and 18 genotypes were older ($p = 0.350$), as were women with invasive carcinoma ($p = 0.096$). HPV 06 found in one of the patients is a low-risk genotype and has been reported to be involved in the pathogenesis of high-grade lesions and is associated with other viruses. Clinical stage is a prognostic factor for the treatment of the disease, but other studies, such as survival analyses are necessary. The prevalence of the adenocarcinoma was high in this population and its association with HPV genotypes with a higher oncogenicity, can make it more aggressive as seen in other studies. Because HPV 16 is the most prevalent genotype in high grade lesions or cervical cancer it is necessary to carry out new studies on the mutations in HPV 16 DNA to understand its pathogenicity in the different histological types.

Keywords: HPV; genotyping; cervical câncer; Molecular screening; Amazon

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

µg – Micrograma

ADC – Adenocarcinoma

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Carcinoma adenoescamoso

CC – Câncer cervical

CCU – Câncer do colo do útero

CEC – Carcinoma de células escamosas

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeo Trifosfato

EBV - vírus Epstein-Barr

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

FCECON – Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FMT-HDV - Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

HPV – Papilomavírus humano

HTA – Histerectomia Total Ampliada

IARC – Agência Internacional de Controle do Câncer

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus

ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane

IMT-SP – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

INCT – Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia

LCR – Região longa de controle (*Long Control Region*)

LSIL – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

mg – miligramas

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL - Mililitro

mm – milímetros

mM - Milimolar

MS – Ministério da saúde

NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical

NIC III – Neoplasia intra-epitelial de grau III

nm – Nanômetro

nM – Nanomolar

ORF – Regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame*)

p53 – Proteína 53

pb- Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pRB – Proteína do Retinoblastoma

Ta - Temperatura de anelamento

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

Td - Temperatura de desnaturação

Te - Temperatura de extensão

Tm - Temperatura de desnaturação

Tris – HCL – Tris-hidroximetil-aminometano Ácido Clorídrico

USP – Universidade de São Paulo

UV – ultravioleta

VLP – Partículas semelhantes às partículas virais

WHO – *World Health Organization*

μL - Microlitro

μM – Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do colo do útero	3
Figura 2 –Relação entre incidência da infecção cervical pelo HPV, pré-câncer e câncer com a idade	7
Figura 3 - Tipos de Papillomavírus encontrados em seres humanos se divididos em cinco gêneros	10
Figura 4 - Representação esquemática do genoma do HPV 16	11
Figura 5 - Ciclo de Infecção pelo HPV	13
Figura 6 - Respostas imunológicas ao HPV DC, células dendriticas, CTL, linfócitos citotóxicos, APC célula apresentadora de antígenos e M monócito e B linfócito B	14
Figura 7 - Replicação viral em célula hospedeira	15
Figura 8 - Estratégia de seleção das pacientes e coleta dos dados e dados socioeconômicos, epidemiológicos, clínicos e de risco para infecção pelo HPV e coleta das amostras de câncer do colo do útero	24
Figura 9 – Estratégia molecular para determinação do genótipo do HPV	26
Figura 10 - Etapas da genotipagem pelo Papillocheck®	31

Figura 11 – Genótipos detectados pelo Papillocheck ®32

Figura 12 - Diagrama das amostras coletadas e selecionadas para o estudo37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação TNM/FIGO	5
Quadro 2 - Cálculo das amostras do estudo	21
Quadro 3 - Variáveis analisadas no questionário	22
Quadro 4 - Sequência do primer PGMY09/11	27
Quadro 5 - Protocolo da PCR para detecção do HPV	28
Quadro 6 - Protocolo para detecção do HPV 16	29
Quadro 7 - Protocolo para detecção do HPV 18	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição segundo a frequência das variáveis socioeconômicas das mulheres com câncer do colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.....	37
Tabela 2 - Distribuição das variáveis referente ao comportamento sexual das mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM	39
Tabela 3 - Distribuição segundo o número de filhos, tipo de parto, aborto e medicamento sistêmico utilizado por mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.....	40
Tabela 04 - Distribuição segundo agravos sexualmente transmissíveis, sintomas de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM	41
Tabela 5 - Distribuição segundo preventivo, sinais e câncer na família de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM	42
Tabela 6 - Distribuição segundo o status patológico, tipo histológico e FIGO de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM	43
Tabela 07 – Distribuição segundo o resultado da frequência da Infecção pelo HPV e genótipos encontrados nas mulheres com NIC III e câncer do colo do útero atendidas na FCECON, Manaus-AM	44
Tabela 08 - Distribuição segundo o resultado dos exames de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM	45
Tabela 09 - Distribuição segundo o resultado do HPV em relação ao resultado patológico, histológico e idade de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição segundo a faixa etária e média de idade das mulheres com câncer do colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM 39
- Gráfico 2** - Distribuição segundo os genótipos do HPV em relação ao status patológico de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM46
- Gráfico 3** - Distribuição do genótipo do HPV e os tipos histológicos encontrados em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM47
- Gráfico 4** - Distribuição da média de idade em relação aos genótipos do HPV em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM49
- Gráfico 5** - Distribuição da média de idade em relação ao resultado do HPV e status em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM 50

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Referencial Teórico	3
2.1	Câncer cervical.....	3
2.2	Tipos Histológicos.....	4
2.3	Estadiamento	5
2.4	História Natural do Câncer Cervical	6
2.5	Epidemiologia do Câncer Cervical.....	7
2.6	Epidemiologia da infecção pelo HPV	8
2.7	Taxonomia e nomenclatura do HPV	9
2.8	Genoma do HPV	11
2.9	Ciclo da infecção Viral.....	12
2.10	Resposta Imune contra a infecção do HPV	13
2.11	Processo Carcinogênico	14
2.12	Diagnóstico da infecção por HPV	15
3	Objetivos	18
3.1	Objetivos Geral	18
3.2	Objetivos Específicos.....	18
4	Material e métodos	19
4.1	Tipo de Estudo	19
4.2	Local do Estudo.....	19
4.3	População do Estudo	19
4.4	Pergunta científica.....	19
4.5	Critérios de Elegibilidade.....	20
4.6	Tamanho da Amostra	20
4.7	Estratégia de abordagem das pacientes e obtenção dos dados socioeconômicos, epidemiológicos, clínicos e de risco para infecção pelo HPV.....	21
4.8	Estratégia para coleta dos dados histológicos	23
4.9	Estratégia de coleta e conservação da amostra biológica.....	23
4.10	Estratégia molecular para detecção do HPV	24
4.11	Estratégia para detecção do EBV e HIV	26
4.12	Extração do ácido nucléico	26
4.13	Quantificação do DNA extraído.....	26
4.14	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para Beta – globina humana.....	26
4.15	Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PGMY09/11 genéricos).....	27

4.16	Eletroforese	28
4.17	Detecção do DNA do HPV 16 por PCR em tempo Real (qPCR)	29
4.18	Detecção do DNA do HPV 18 por PCR em tempo Real (qPCR)	30
4.19	Genotipagem pelo PapilloCheck®	30
4.20	Detecção do DNA do Epstein - Barr (EBV) por PCR multiplex	32
4.21	Análises Estatísticas	33
4.22	Aspectos éticos	34
4.23	Limitações do Estudo	34
4.24	Fontes de Financiamento	34
5	Resultados	35
5.1	Perfil socioeconômico e demográfico	35
5.2	Características clínicas e comportamentais	37
5.3	Status patológico, tipo histológico e FIGO	41
5.4	Infeção pelo HPV	42
5.5	Coinfecção	43
5.6	Genótipo HPV x resultado histopatológico (NIC III e carcinoma invasor)	44
5.7	Resultado histopatológico x Genótipo HPV x Idade	45
6	Discussão	49
7	Conclusão	59
8	Perspectivas e desdobramentos do estudo	60
9	Referências Bibliográficas	61
10	Apêndices	71

1 Introdução

O câncer cervical ou câncer do colo do útero (CCU) é o quarto tipo de neoplasia mais comum em mulheres em todo mundo. No Brasil de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), este tipo de câncer está em terceiro lugar das neoplasias mais frequentes entre as mulheres. No entanto, a epidemiologia da Região Norte do Brasil não reflete a realidade nacional, de tal modo que câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente com taxa bruta de incidência de 53 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2016).

O desenvolvimento do câncer do colo do útero está relacionado a diversos fatores, como precocidade da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso de contraceptivos orais, tabagismo entre outros. Entretanto, o principal fator para este desenvolvimento é relacionado a infecção persistente pelo Papillomavírus humano (HPV). (SIMONATO et al., 2008; SILVA et al., 2011; ZHEN; HU; BIAN, 2013).

Estima-se em todo o mundo que o número de mulheres portadoras do HPV chega a 291 milhões e cerca de 105 milhões de mulheres no mundo inteiro terá a infecção pelo HPV 16 ou 18 pelo menos uma vez na vida. (ZUR HAUSEN, 2002; BURCHELL et al., 2006; WHO, 2014)

Existem mais de 200 tipos de HPV identificados por meio de análises das sequências de DNA, e são classificados em alto e baixo risco conforme a sua capacidade de gerar neoplasias, ou seja, a capacidade oncogênica de cada tipo de HPV. Dentre os tipos de alto risco estão: 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 58, e nos de baixo risco são: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 (MUÑOZ et al., 2003; BURK; HARARI; CHEN, 2013; WHO, 2014) .

Uma vez que 99% dos casos de câncer cervical se dá pela presença do HPV, atualmente existem duas vacinas profiláticas para impedir a infecção pelo HPV: a bivalente e a quadrivalente, ambas são compostas por proteínas L1 do HPV que espontaneamente se unem formando partículas semelhantes as partículas virais, “particles” (VLPs). A Cervarix™ vacina bivalente, previne as infecções pelos HPV 16 e 18, enquanto a Gardasil® previne infecções dos HPVs 6,11,16 e 18. (WHO, 2007; DE SANJOSE et al., 2010; KREIMER et al., 2011; HARPER; DEMARS, 2017).

Cerca de 70% dos casos de câncer cervical são pelos tipos HPV 16 e 18, sendo o mais frequentes em todas as regiões geográficas. Os demais tipos de HPV de alto risco oncogênico apresentam diferenças geográficas na sua frequência (SCHILLER et al., 2008; DE SANJOSE et al., 2010). Estudos realizados no Brasil, mostram uma variabilidade genotípica, (FIGUEIREDO ALVES et al., 2013) avaliaram a prevalência e o perfil genotípico do HPV e

encontram os tipos mais frequentes: 16, 51, 31, 52 e 18. Um estudo realizado na cidade de Recife, encontrou como os genótipos 16 e 31 como sendo os mais prevalentes na população estudada (MENDONÇA et al., 2010).

Devido à alta incidência do câncer do colo do útero, no Estado do Amazonas, desde 2013 a vacinação contra o HPV vem sendo realizada nas escolhas públicas e privadas do estado em adolescentes na faixa-etária de 11 a 13 anos. A vacina utilizada é a quadrivalente que confere proteção contra quatro subtipos do HPV, os de baixo risco 6 e 11 e os de alto risco 16 e 18.

Estudos realizados no Norte do Brasil, encontraram uma grande variabilidade genotípica. Um estudo que observou mulheres sexualmente ativas com alterações citológicas e mulheres com lesões pré-malignas e malignas detectou os seguintes HPVs: 16, 33, 58, 66 e 68 (CASTRO et al., 2011). Outro incluiu pacientes que apresentaram carcinomas invasores, e encontraram os seguintes genótipos: 16, 18, 31, 33, 56, 58, 66, 2 e 6 (CORRÊA, 2005; FERREIRA, 2007).

Baseado nessas evidências, o estudo propôs descrever os genótipos de HPVs responsáveis pelas neoplasias intraepiteliais cervicais de grau III (NIC III) e câncer invasor cervical em mulheres atendidas da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas, permitindo descrever uma casuística importante, sobre a representatividade local dos HPVs encontrados. Além disso, com os resultados encontrados será possível discutir/repensar sobre as medidas de rastreio (através de diagnóstico precoce de lesões precursoras ou de detecção da presença do DNA do vírus) e de profilaxia vacinal. Assim como a composição das vacinas para HPV que devem ser aplicadas em mulheres da região Norte, contribuindo e viabilizando novas estratégias de "Ver e tratar" as mulheres da região Norte do País, visto o aumento de câncer do colo do útero nesta região.

2 Referencial Teórico

2.1 Câncer cervical

O câncer cervical é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou a distância. É uma doença de desenvolvimento lento, que pode cursar sem sintomas na fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados (INCA, 2010).

O útero é um órgão oco, impar e mediano, em forma de uma pera invertida, achatada na sentido antero-posterior, que emerge do centro do períneo, para o interior da cavidade pélvica. O útero apresenta um estrangulamento denominado Istmo do Útero. A parte superior ao istmo recebe o nome de Corpo do Útero e a inferior constitui a Cérvix (colo do útero).

O colo do útero é a porção inferior do útero onde se encontra a abertura do órgão, localizando-se no fundo da vagina, separa os órgãos internos e externos da genitália feminina estando mais exposto ao risco de doenças e alterações relacionadas ao ato sexual. Ele apresenta formato cilíndrico e possui uma abertura central, que liga o interior do útero à cavidade vaginal (Figura 1). O colo do útero apresenta uma área de tecido metaplásico entre o epitélio escamoso da vagina e o tecido glandular do canal endocervical chamada zona de transformação (WHO, 2014).

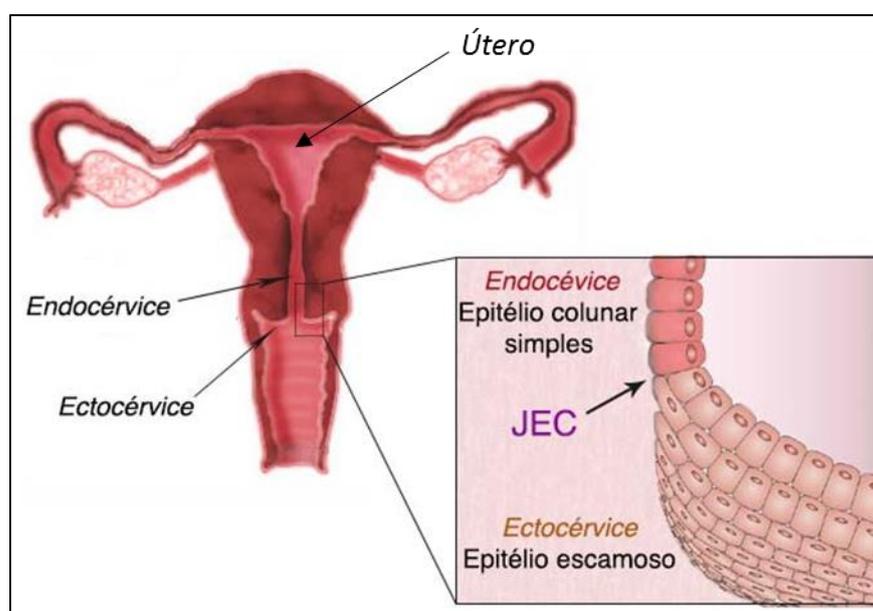


Figura 1 – Anatomia do colo do útero. Fonte: Modificado, Mdsau.de.

Quando se trata da evolução do câncer cervical, sabe-se que a mesma é lenta, na maioria das vezes de 10 a 30 anos até o surgimento da forma invasiva do câncer. Porém durante este período podem aparecer lesões conhecidas como neoplasias intra-epiteliais de grau I,II e III (NICs), que ao serem diagnosticadas no início podem evitar o desenvolvimento da forma invasiva (VINK et al., 2013; STEENBERGEN et al., 2014).

Alguns fatores contribuem para o desenvolvimento do câncer cervical dentre o principal está o Papilomavírus humano (HPV), a persistência por genótipos oncogênicos, especialmente o tipo HPV-16 e HPV-18 são responsáveis por cerca de 70% dos cânceres do colo do útero (DE SANJOSE et al., 2010; WHO, 2014).

Outros fatores também podem contribuir sobretudo, a precocidade da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso de contraceptivos orais, higiene precária, tabagismo, entre outros (SIMONATO et al., 2008; SILVA et al., 2011 ; AGGARWAL, 2014; RIBEIRO et al., 2015).

2.2 Tipos Histológicos

O câncer cervical tem sua origem principal na junção escamo colunar, tanto do epitélio escamoso como do epitélio colunar. Histologicamente está dividido em três principais categorias de carcinomas invasores do colo do útero, dependendo da origem do epitélio comprometido: o carcinoma de células escamosas (CEC) representando cerca de 80% dos casos de câncer do colo do útero, acometendo o epitélio escamoso, o adenocarcinoma cervical (ADC) representando cerca de 10% dos casos de câncer do colo do útero, demonstrando aumento crescente da incidência em mulheres mais jovens, talvez pelo uso indiscriminado de contraceptivo hormonal e outros tipos de tumores epiteliais (WHO, 2014; INCA, 2016).

O ADC compreende um grupo heterogêneo de subtipos histológicos, com variantes endocervicais, intestinais, célula em formato de anel de sinete, além de apresentar tipos mais raros incluindo o de células claras, mesotéricas, serosas, endometrióide e de tipo gástrico. Outros carcinomas invasores se apresentam como tumores mistos, contendo células malignas com diferenciação escamosa e glandular, denominado adenoescamoso (ASC) (HOLL et al., 2015).

2.3 Estadiamento

O estadiamento de qualquer tipo de câncer é importante para avaliar o prognóstico, pois as taxas de sobrevivência são diferentes quando a neoplasia está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros. Sendo assim, estadiar uma neoplasia maligna significa avaliar seu grau de disseminação (INCA, 2016).

O estadiamento do câncer cervical é o mais antigo descrito na literatura desde 1928, e até hoje já passou por sete revisões em suas classificações (Oliveira et al., 2010). O estadiamento mais amplamente utilizado foi estabelecido pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e *International Union Cancer (IUCC)*, denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010; INCA, 2016).

O sistema TNM baseia-se na extensão anatômica, considerando-se as características do tumor primário (T), o comprometimento linfonodal da região do órgão afetado (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Esses parâmetros recebem graduações numéricas: T0 a T4, N0 a N3 e M0 e M1. Quando as categorias T, M e N são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estágios que variam de I a IV e que podem ser subdivididos em A e B, para expressar o nível de evolução da neoplasia no estadiamento FIGO (Quadro 1) (INCA, 2016).

Quadro 1: Classificação TNM/FIGO

TNM/ Categorias	FIGO/ Estádios	
TX	-	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	-	Sem Evidência de tumor primário.
Tis	0	Carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma pré-invasor).
T1	I	Carcinoma da cérvix confinado ao útero (extensão ao corpo deve ser desprezada).
T1a	IA	Carcinoma invasor, diagnosticado somente pela microscopia.
T1a1	IA1	Invasão estromal maior que 3mm em profundidade e 7 mm ou menos de extensão horizontal.

T1a2	IA2	Invasão estromal maior que 3 mm e até 5 mm em profundidade com extensão horizontal de 7mm ou menos.
T1b	IB	Lesão clinicamente visível, limitada ao colo, ou lesão microscópica maior que T1a2/IA2.
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível com 4cm ou menos em sua maior dimensão.
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível com 4cm ou menos em sua maior dimensão.
T2	II	Tumor que invade além do útero, mas não atinge a parede pélvica ou o terço inferior da vagina.
T2a	IIA	Sem invasão do paramétrio.
T2b	IIB	Sem invasão do paramétrio.
T3	III	Tumor que se estende à parede pélvica, compromete o terço inferior da vagina, ou causa hidronefrose ou exclusão renal.
T3a	IIIA	Tumor que compromete o terço inferior da vagina, sem extensão à parede pélvica.
T3b	IIIB	Tumor que se estende a parede pélvica, ou causa hidronefrose ou exclusão renal.
T4	IVA	Tumor que invade a mucosa vesical ou retal, ou que se estende além da pélvis verdadeira.
M1	IVB	Metástase à distância.

Fonte: (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010)

2.4 História Natural do Câncer Cervical

A história natural do câncer de colo de útero inicia-se com a infecção do epitélio metaplásico na zona de transformação cervical por um ou mais tipos de HPVs de alto risco (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Devido a susceptibilidade desta área a infecção, as células escamocelulares podem abrigar o vírus por longos períodos, desta forma permitindo que ocorra o processo de malignidade das células, ou seja, as células ocupam a zona de transformação e a endocérvice do colo do útero, e a replicação viral pode ou não iniciar, progredindo assim a malignidade (BANKS; PIM; THOMAS, 2012).

A persistência viral faz com que ocorra a progressão clonal do epitélio infectado, ou seja, ocorre uma proliferação desordenada, em que as células normais perdem suas funções

celulares (divisão e diferenciação) e perdem o controle, dessa forma surgem as lesões precursoras do câncer, essas lesões podem ser denominadas lesões precursoras, ou lesões pré-cancerosas, classificadas como neoplasias intra-epitelial (NIC) de diferentes graus (I, II e III) (STEENBERGEN et al., 2014; EGAWA et al., 2015). A gravidade da neoplasia reflete a extensão em que as células basais se estendem na direção da superfície epitelial e a extensão da divisão de células suprabasais (DOORBAR et al., 2015)

A taxa das lesões que progridem para câncer é baixa quando comparada a prevalência da infecção. Aproximadamente 90% das infecções por HPV regredem espontaneamente em um período de 24 meses, enquanto uma minoria irá progredir para o câncer de colo do útero. Em relação as neoplasias intra-epiteliais de grau III, estima-se que de um a dois terços das mulheres com NIC III irão desenvolver câncer (SCHIFFMAN; KJAER, 2003). Essa regressão da infecção pode estar relacionada ao genótipo viral e a idade da mulher (Figura 2), estudos mostram que mulheres com idades mais avançadas, acima de 40 anos e que são infectadas por HPV, apresentam um risco maior de desenvolver o câncer, diferente das mulheres mais novas (POWELL et al., 2011).

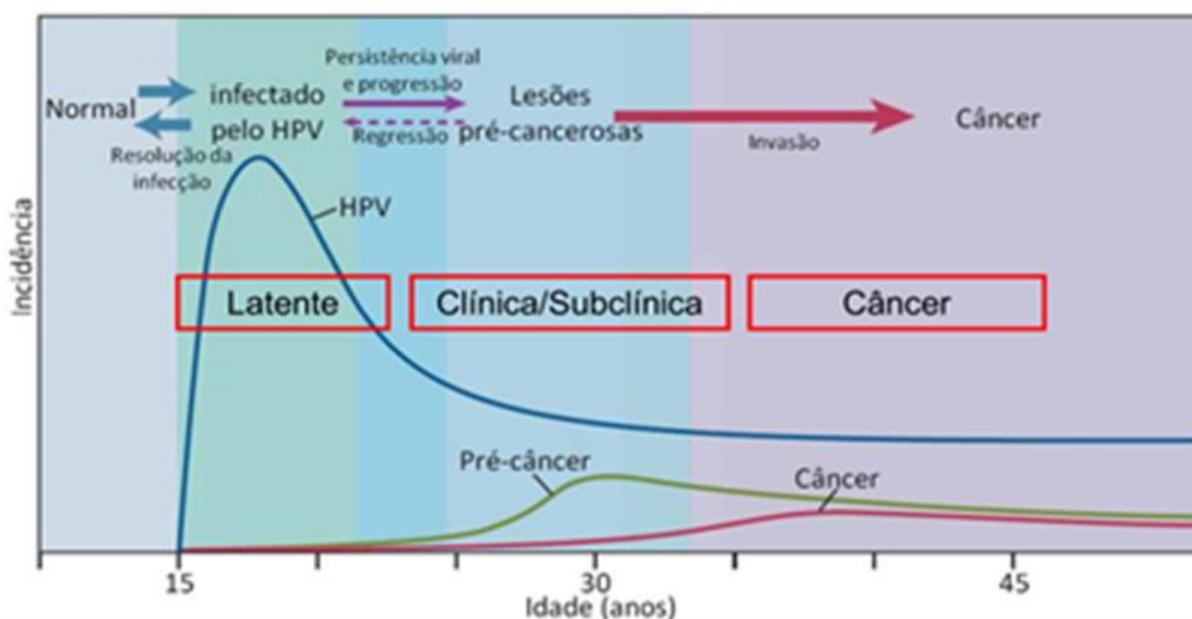


Figura 2 – Relação entre incidência da infecção cervical pelo HPV, pré-câncer e câncer com a idade. Adaptado de (SCHIFFMAN; CASTLE, 2005)

2.5 Epidemiologia do Câncer Cervical

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo e o sétimo no geral. A grande maioria (cerca de 85%) dos casos ocorre nas regiões menos

desenvolvidas, onde responde por quase 12% de todos os cânceres femininos. Regiões de alto risco, com taxa bruta de incidência estimada em mais de 30 por 100.000 mulheres, incluem a África Oriental (42,7), Malásia (33,3), África do Sul (31,5) e África Central (30,6). As taxas são mais baixas na Austrália/Nova Zelândia (5,5) e Ásia Ocidental (4,4) (IARC, 2011). Diferindo do perfil dos países desenvolvidos para o Brasil, estimou-se para o ano de 2016 uma incidência média de 16/100.000 mulheres com câncer do colo do útero. Especificamente na Região Norte, estimou-se uma incidência média de 24/100.00 mulheres, muito acima da média global e nacional (INCA, 2016).

No Brasil o câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, tendo como tipo histológico mais frequente o de carcinoma de células escamosas, representando cerca de 85% a 90% dos casos, seguido pelo adenocarcinoma. Na região Norte o câncer cervical é primeiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres (INCA, 2016).

Observa-se um panorama mais alarmante para o estado do Amazonas e sua capital (Manaus). A incidência projetada para o ano de 2014 para Manaus foi de 53/100.000 (taxa bruta) e a taxa ajustada por idade foi de 56/100.000 em 2010 (aproximando - se dos números verificados em países africanos sem programas estabelecidos de rastreio e com frequente co - infecção pelo HIV como o Malawi, a Tanzânia e a Zâmbia (BOSCH et al., 2002).

No Amazonas no ano de 2013 foram diagnosticados 148 casos de câncer do colo do útero na instituição Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FUNDAÇÃO CECON). Em um estudo realizado em 2007, com 153 pacientes atendidos no setor de ginecologia da FCECON, foram encontrados 24 casos de câncer do colo do útero num período de 6 meses de estudo, nas quais 3 (2,0%) apresentaram tipo histológico adenocarcinoma e 21 carcinomas de células escamosas (13,7%) (FERREIRA, 2007). No município de Coari, foi realizado um estudo, em que foram incluídas 412 mulheres ribeirinhas, 11,6% apresentaram alterações histopatológicas, destas 05 apresentaram neoplasia intra-epitelial cervical de grau I (NIC I), 2 neoplasia intra-epitelial cervical de grau III (NIC III) e 2 carcinoma invasor. (MARINO et al., 2014).

2.6 Epidemiologia da infecção pelo HPV

O HPV é considerado o agente infeccioso de transmissão sexual mais comum. Estima-se que o número de mulheres portadoras do DNA do vírus HPV em todo o mundo chega a 291

milhões e cerca de 105 milhões de mulheres no mundo inteiro terá infecção pelo HPV 16 ou 18 pelo menos uma vez na vida (WHO, 2014).

Um estudo envolvendo 11 países dos quatro continentes do mundo com a participação de 15.613 mulheres sem citologia alterada mostrou uma prevalência de 10,5% de infecção por HPV. Houve uma variação de até 20 vezes na taxa de prevalência entre os diferentes países investigados, sendo que a mais baixa foi encontrada na Espanha (1,4%) e mais alta na Nigéria (25,6%). A Europa foi o continente com menor taxa (5,2%). A Ásia teve uma taxa de prevalência de 8,7%, a América do Sul de 14,3% e a África de 25,6%. O tipo mais encontrado foi o HPV tipo 16 e o HPV 18 teve uma distribuição homogênea (IARC, 2007).

No Brasil, estima-se que 9 a 10 milhões de pessoas sejam portadoras do vírus e que se registrem 700 mil novos casos a cada ano. Uma metanálise de estudos nacionais registrou um perfil de prevalência da infecção por HPV de alto risco semelhante ao dos países subdesenvolvidos: entre 11-15% na população citologicamente normal (AYRES; AZEVEDO E SILVA, 2010).

2.7 Taxonomia e nomenclatura do HPV

Todos os Papillomavírus pertencem à família *Papillomaviridae*, que inclui 49 gêneros diferentes isolados e caracterizados de reptéis, pássaros, marsupiais e mamíferos. Sua origem está ligada a alterações no epitélio do seu hospedeiro ancestral que ocorreu pelo menos há 350 milhões de anos atrás (BURK; HARARI; CHEN, 2013; ICTV, 2015).

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), para classificação dos HPVs utiliza-se a sequência completa do gene L1, que é conservada entre os diferentes tipos virais. Os gêneros apresentados na família *Papillomaviridae* apresentam entre si uma diferença maior que 40% na sequência nucleotídica do gene L1, enquanto nas demais espécies apenas 30% e 40%, sendo denominadas pelo tipo de HPV mais estudado entre os tipos que a compõem.

Os HPVs são classificados em família, gênero e espécie, também sendo classificados em tipos, subtipos e variantes. Sendo diferenciado quando apresentar pelo menos 10% de divergência com a sequência do gene L1. A classificação do subtipo quando divergem em 2% a 10% do tipo mais próximo. E as variantes diferem menos de 2% na sequência de nucleotídeos de L1, e até 5% na LCR (IARC, 2007; DE VILLIERS, 2013)

Nos seres humanos os HPVs são divididos em cinco gêneros (figura 3), dentre eles o gênero Alfa que contém os vírus associados com o desenvolvimento de tumores na mucosa oral ou anogenital, o gênero Beta contendo os vírus que estão associados com o desenvolvimento de tumores cutâneos e o gênero Gamma, Mu e Nu associados ao desenvolvimento de tumores cutâneos (PIERCE CAMPBELL et al., 2013).

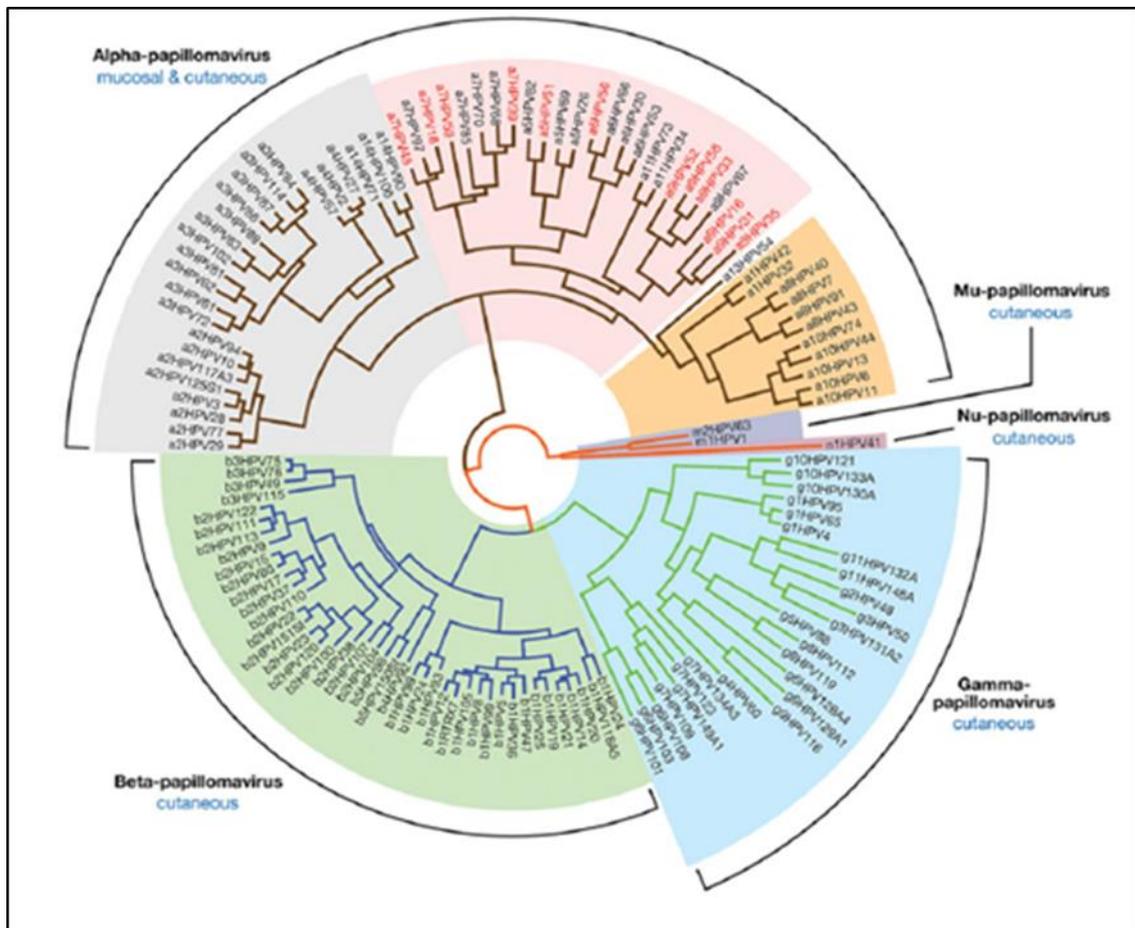


Figura 3 - Tipos de Papillomavírus encontrados em seres humanos se divididos em cinco gêneros. A árvore evolutiva é baseada no alinhamento dos genes E1, E2, L1 e L2 (DOORBAR et al., 2012).

Já foram descritos mais de 200 tipos de HPVs e cerca de 60 são detectados predominante na mucosa epitelial e estão classificados dentro do gênero alfa (Burl., et al 2013). As infecções pelo gênero alfa estão envolvidas tanto em doenças benignas quanto malignas (condilomas acuminados, cânceres de cabeça e pescoço, anal, e cervical) (DE VILLIERS et al., 2004).

Além dessa classificação os HPVs são divididos de acordo com seu potencial oncogênico, ou seja, a sua capacidade em gerar neoplasias malignas: em HPVs de baixo risco são representados principalmente pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81. Os de alto

risco que possuem maior potencial oncogênico, por estarem frequentemente associados às Neoplasias Intraepiteliais cervicais (NICs 2 e 3) e aos carcinomas invasores, são representados principalmente pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (MUÑOZ et al., 2003).

2.8 Genoma do HPV

O Papillomavirus apresenta uma estrutura icosaédrica sem envelope, com aproximadamente 50-60 nm de diâmetro (DOORBAR et al., 2015).

O genoma viral é um epissoma de DNA de cadeia dupla fita circular de aproximadamente 8.000 pares de bases, que contém oito fases de leitura aberta (Open Reading Frames – ORF), sendo dividido em uma região chamada precoce (E-early) E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, com cerca de 4kb, as quais estão envolvidas na replicação viral e oncogênese, a região tardia (L- late), com aproximadamente 3kb, que codifica as duas proteínas do capsídeo L1 e L2 e a região reguladora, e por fim a região chamada não codificadora LCR (*Long Control Region*), de cerca 1kb, que regula a replicação viral e expressão gênica (Figura 4) (BURD, 2003; DOORBAR et al., 2015).

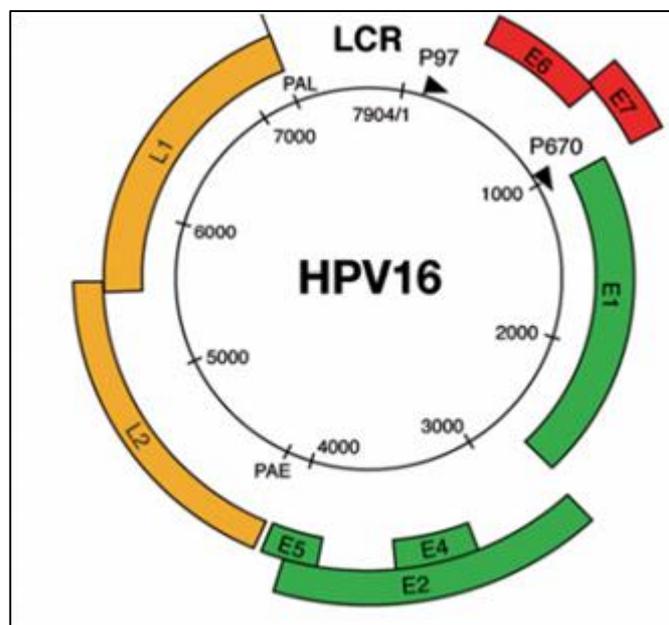


Figura 4 – Representação esquemática do genoma do HPV 16. As oito regiões de leitura aberta (ORF) estão indicadas na figura em colorido. Fonte: Modificado (DOORBAR, 2006).

Cada uma das proteínas virais codificadas pelo genoma do HPV, apresentam diferentes funções, dentre essas, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação,

E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. Já os genes E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular. A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo (ORTIZ et al., 2014).

2.9 Ciclo da infecção Viral

O ciclo da infecção e a patogenicidade do vírus, depende de múltiplos fatores como o genótipo do vírus, o tropismo, ou seja, qual célula é infectada e principalmente o sistema imunológico do indivíduo (SCHILLER; DAY; KINES, 2010).

A organização do ciclo de vida dos HPVs Alpha Papillomavirus é melhor elucidado do que os demais, mais especificamente do HPV 16. Na maioria dos casos para que haja infecção é necessário que ocorra uma lesão, como uma ferida, ou um trauma epitelial para que o vírus atinja a camada basal do epitélio infectando assim o tecido (DOORBAR, 2005; HORVATH et al., 2010).

Estudos mostram que o tropismo celular é controlado pelo nível das expressões virais, desde a entrada na célula, porém a entrada do vírus na célula ainda é controversa, visto que dependendo do tipo do HPV sua entrada pode ser diferente (SCHILLER; DAY; KINES, 2010). Estudos mostraram que os proteoglicanos de sulfato de heparano exercem um papel importante na adsorção e ligação do vírus com o receptor, assim como ocorre com outros vírus. Na maioria das infecções essas partículas do vírus são levadas lentamente para dentro da célula, quando se trata do HPV 16 o vírus entra na célula pelo processo de endocitose (EGAWA et al., 2015).

Após essa etapa, as partículas do HPV são desmontadas em endossomos tardios e/ou em lisossomos, já com a transferência do DNA viral para o núcleo da célula, que é realizada pelas proteínas do capsídeo viral L1 e L2. Inicialmente o genoma permanece nas células da camada basal, como epissomo estável, sem integração ao genoma da célula hospedeira, permitindo assim a síntese das proteínas precoces E1, E2, E6 e E5 dando início a replicação celular (Figura 5) (PATTERSON; SMITH; OZBUN, 2005; EGAWA et al., 2015).

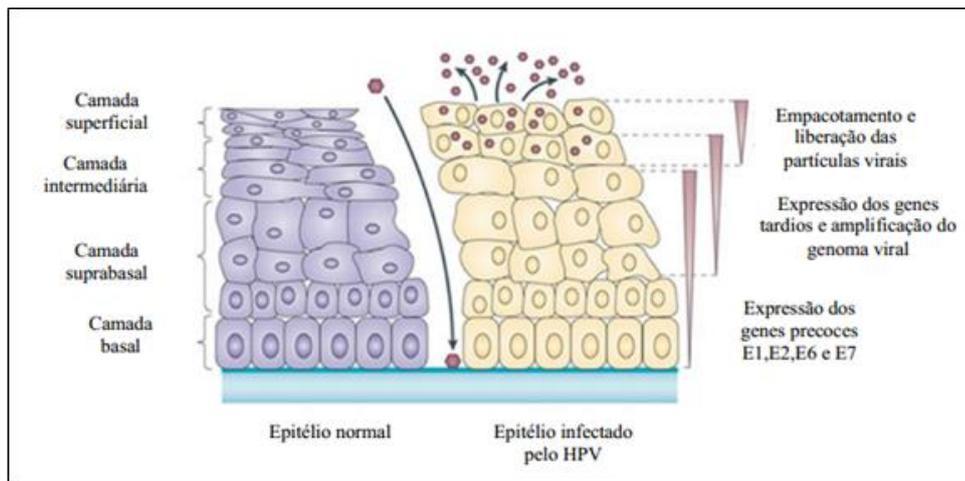


Figura 5 - Ciclo de Infecção pelo HPV. Fonte: Adaptado de (MOODY; LAIMINS, 2010)

Após a divisão celular, uma das células filhas permanece na camada basal e fornece um reservatório de DNA, enquanto a outra célula migra para a camada suprabasal e inicia a diferenciação com subsequente amplificação do DNA viral e expressão dos genes tardios. Nas camadas superiores do epitélio ocorre o empacotamento e liberação das partículas virais (DOORBAR, 2006; HORVATH et al., 2010).

2.10 Resposta Imune contra a infecção do HPV

Embora a infecção por HPV seja comum entre indivíduos jovens e sexualmente ativos, o câncer do colo do útero raramente pode surgir como resultado dessa infecção. Estudos mostraram que a maioria das mulheres jovens infectadas (80-90%) impedem a infecção e não apresentam sintomas clínicos (SCHIFFMAN et al., 2010; BERNARD, 2002).

A maioria dessas infecções são controladas por uma resposta imune mediada por células. Na imunidade inata, a resposta imune é mediada por barreira epitelial, sistema complemento, e uma variedade de células como células de Langerhans (LCs), células dendríticas imaturas, que fagocitam os antígenos e os apresentam a outras células B e T, desencadeando uma resposta adaptativa contra o vírus (Figura 6) (MANICKAM; SIVANANDHAM; TOURKOVA, 2007). Outros estudos demonstraram que a regressão de verrugas anogenitais, está acompanhada pelo aumento da resposta específica Th1 mediada por células TCD4+, assim como nos modelos de animais.

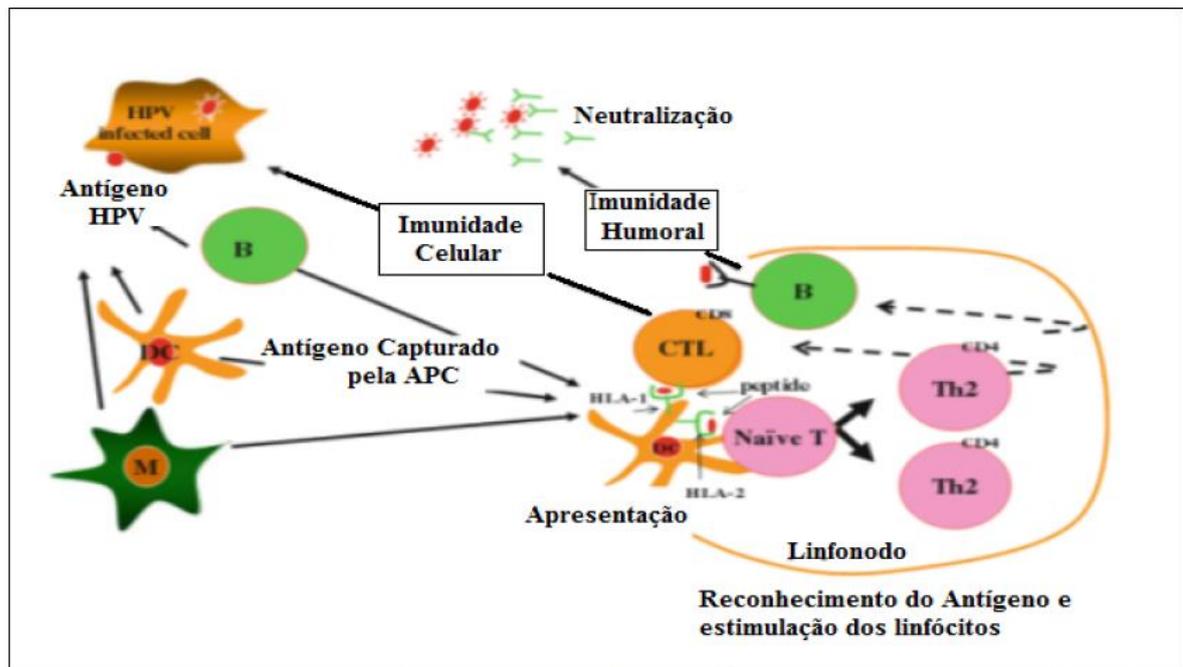


Figura 6 - Respostas imunológicas ao HPV DC, células dendríticas, CTL, linfócitos citotóxicos, APC célula apresentadora de antígenos e M monócito e B linfócito B. Fonte: Adaptado de Fonte: (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

Em casos de infecções persistentes por genótipos de alto risco, estudos mostraram uma incapacidade do desenvolvimento das respostas imunológicas, que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer do colo do útero como é o caso do HPV 16 e 18 (MONNIER-BENOIT et al., 2006).VELÁZQUEZ; PEIX; GÓMEZ-ALONSO, 2011). Alguns estudos mostraram a ausência da atuação da resposta imune inata, visto que o ciclo de vida do HPV é intra-epitelial, dificultando que o sistema imune detecte o vírus. Nos tipos de infecções por HPV de alto risco, observam-se vários mecanismos de evasão, na qual as proteínas E6 e E7 interferem na função de Tyk2, afetando a sinalização de STAT para produção de interferon e ativação de macrófagos e produção de anticorpos, assim como reduz os níveis da expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para apresentação de antígenos virais, diminuindo assim a ativação de linfócitos T (STANLEY, 2012; ZHOU; CHEN; ZHAO, 2013). A baixa resposta de células T, está relacionado com alguns mecanismos de evasão do vírus, porém ainda são necessários vários estudos para afirmar de fato isso (DE JONG et al., 2004; ZHOU; CHEN; ZHAO, 2013).

2.11 Processo Carcinogênico

A persistência do genoma viral no interior da célula do hospedeiro pode interferir no controle do ciclo celular e a ação oncogênica desse vírus está relacionada à interação das

oncoproteínas E6 e E7, codificadas pelos genes precoces E6 e E7, respectivamente. Estas proteínas estão envolvidas no controle da proliferação celular, controlados pelos genes p53 e pRb (retinoblastoma), respectivamente, responsáveis pelo controle e correção do DNA celular, pela transformação celular e a evolução maligna das lesões, assim a célula é induzida a dividir-se continuamente conduzindo à formação de um tumor (DOORBAR, 2006; LEUNG et al., 2014).

Em lesões malignas, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros (Figura 7). Para integrar-se ao DNA celular, é necessário que haja uma quebra no genoma viral. Esta separação não ocorre de forma aleatória, pois a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, resultando em transformação da célula hospedeira (DOORBAR, 2006; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

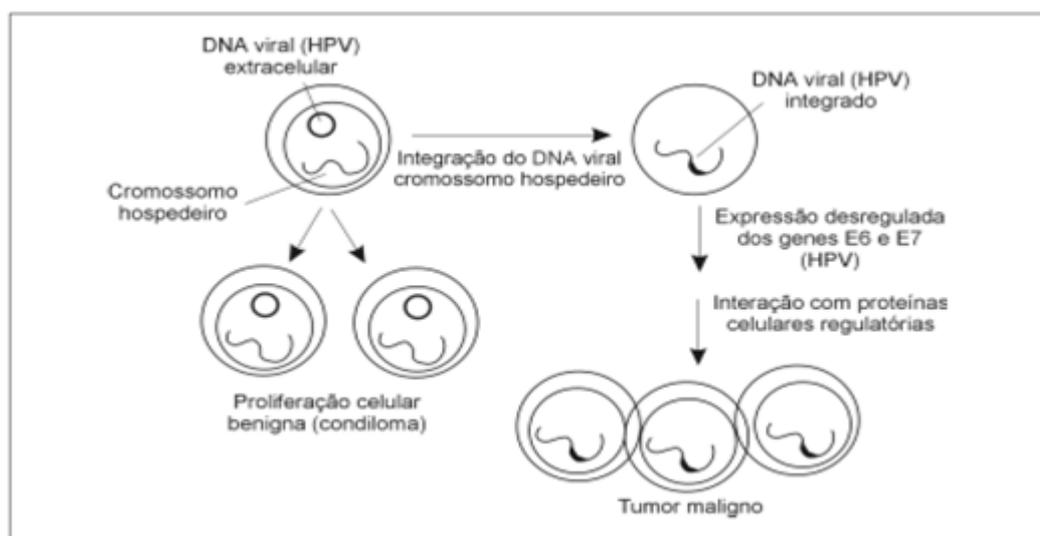


Figura 7 - Replicação viral em célula hospedeira. Adaptado de Alberts et al. (1994).

2.12 Diagnóstico da infecção por HPV

Para a detecção do HPV podem ser realizados vários métodos moleculares, que podem determinar o tipo viral envolvido na infecção como a reação em cadeia da Polimerase (PCR), métodos comerciais de genotipagem (INNO-LiPA HPV Genotyping v2, Linear Array HPV, Papillocheck®) entre outros. Cada teste tem sua sensibilidade e especificidade, podem determinar o tipo viral envolvido na infecção, assim como a distinção dos genótipos entre si, como também detectar o DNA viral mesmo em baixas quantidades (IARC, 2007; SCHIFFMAN et al., 2011; AMARO-FILHO et al., 2013).

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta alta sensibilidade e permite a detecção de menos de 10 cópias de DNA de HPV (VILLA; DENNY, 2006). A reação é baseada na amplificação da sequência alvo utilizando iniciadores tipo específicos permitindo amplificar sequências de DNA de diferentes tipos porque o alvo é uma região conservada do genoma do HPV (SCHIFFMAN et al., 2011; AMARO-FILHO et al., 2013).

Algumas reações de PCR utilizam iniciadores consenso que podem amplificar um grande espectro de tipos de HPV, como é o caso do PCR genérico PGMY (GRAVITT et al., 2000), que têm como alvo regiões do genoma viral conservada em diferentes tipos de HPV, como é o caso da região L1, considerada a região do genoma do HPV mais conservada. A sensibilidade e a especificidade da PCR podem variar dependendo dos iniciadores utilizados, do peso molecular do produto do PCR, condições da amplificação entre outros fatores. (MOLIJN et al., 2005).

A PCR em tempo Real é uma técnica em que a detecção se baseia na constância do sinal fluorescente de uma ou mais reações de PCR ao longo dos ciclos de amplificação, e as metodologias mais utilizadas são a SYBR® Green I e TaqMan® (DORAK, 2006).

A metodologia de TaqMan® é baseada na utilização de oligonucleotídeos lineares (sondas) que são marcados com uma molécula fluorescente (*reporter*) na extremidade 5' e uma molécula bloqueadora (*quencher*) na ponta 3'. Quando essas duas moléculas estão próximas em solução, o sinal do *reporter* é sequestrado pelo *quencher* e o instrumento não detecta nenhum aumento da fluorescência. Porém, quando existe a presença da sequência de DNA alvo, a sonda hibridiza e após a hibridização dos iniciadores, a nova fita de DNA é estendida pela Taq DNA polimerase. Essa enzima possui atividade 5' nuclease e ao encontrar com a sonda durante a extensão da nova fita de DNA, cliva a sonda, que resulta na separação do *reporter* do *quencher* e emissão de fluorescência pelo repórter. A emissão da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado e, portanto pode ser usado como método para determinação de carga viral (DORAK, 2006).

O kit comercial PapilloCheck® é baseado na amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 350pb da região E1 do HPV, utilizando um conjunto de iniciadores consenso, e posterior hibridização com sondas de DNA fixadas em um chip. Cada iniciador reverso possui na ponta 5' uma marcação universal, na qual ligam-se as sondas marcadas com Cy5-Dutp (Cyanine 5) contidas no tampão de hibridização. A leitura do chip é realizada por meio do instrumento CheckScanner™, nos comprimentos de onda de 532nm e 635nm, e o

resultado é automaticamente interpretado pelo software CheckReport™ (DALSTEIN et al., 2009).

3 Objetivos

3.1 Objetivos Geral

Caracterizar os genótipos por Papillomavírus humanos (HPVs) mais prevalentes na população mulheres com câncer de colo de útero e neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III) atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON).

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Descrever o perfil epidemiológico, sociodemográfico, clínico e de risco para a infecção pelo HPV entre as mulheres estudadas.
- 2- Descrever a frequência de HPV na população de mulheres com câncer de colo de útero e neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III).
- 3- Caracterizar os genótipos do HPV identificados na população de mulheres com câncer de colo de útero e neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III).
- 4- Descrever a frequência de infecção por HIV e EBV na população de mulheres com câncer de colo de útero e neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III).
- 5- Correlacionar dados clínicos e histológicos das pacientes incluídas no estudo com os dados moleculares obtidos.

4 Material e métodos

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de estudo observacional, transversal, descritivo que visou caracterizar molecularmente a infecção por Papillomavírus humano (HPV) na população de mulheres que foram submetidas a cirurgia de histerectomia total (HTA), diagnosticadas com neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III) e câncer cervical invasor atendidas na FCECON.

Este estudo é um desdobramento de estudo anterior intitulado “Caracterização dos genótipos de HPV nas mulheres com câncer de colo-uterino atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas”.

4.2 Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas -FCECON. É uma unidade de saúde terciária, de médio porte localizado no centro da cidade de Manaus- Amazonas, Brasil. Instituição de referência em oncologia, tendo como por objetivo promover a prevenção, o diagnóstico e o tratamento de câncer. Representa também referencial regional recebendo pacientes dos estados da região Norte e até mesmo de imigrantes oriundo de países da América Latina como Haiti, Venezuela e outros. Este contingente de pacientes oriundos de outros estados chega até a 30% dos pacientes atendidos.

4.3 População do Estudo

Foram incluídas neste estudo mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical de grau III (NIC III) ou com câncer cervical invasor que foram submetidas a cirurgia de histerectomia total (HTA) como tratamento na FCECON durante o período do estudo.

4.4 Pergunta científica

Na população de mulheres atendidas em um serviço de alta complexidade com neoplasias intra-epiteliais de grau III (NIC III) ou câncer cervical invasor que foram submetidas a procedimento de histerectomia total na FCECON, quais os genótipos do HPV mais frequentes?

4.5 Critérios de Elegibilidade

Critérios de Inclusão:

- ✓ Mulheres acima de 18 anos;
- ✓ Mulheres com diagnóstico de câncer do colo do útero invasor.
- ✓ Ou Mulheres com diagnóstico de lesão intra-epitelial de alto grau (NIC III). Critério de inclusão secundário (isto é, os casos de NIC III inseridos foram aqueles em que era esperado possível confirmação de câncer cervical invasor após análise da peça cirúrgica).
- ✓ Mulheres que tenham indicação de cirurgia (HTA) como tratamento.

Critérios de Exclusão:

- ✓ Mulheres que já realizaram tratamento quimioterápico e/ou radioterápico.
- ✓ Mulheres que apresentaram contraindicação para realização da cirurgia, ou que tiveram alguma complicação durante a cirurgia.

4.6 Tamanho da Amostra

Para o cálculo do tamanho amostral, foram considerados os seguintes aspectos:

Em relação aos casos de NIC III:

1. São atendidos em média por mês 20 casos novos de NIC III na FCECON.
2. Dentre os casos de NIC III confirmados e referenciados para a FCECON, apenas cerca de 10% são encaminhados para a histerectomia total ampliada (HTA) ou seja, tratamento cirúrgico. A indicação do tratamento cirúrgico depende do quadro clínico da paciente, da idade e da história obstétrica da mulher.

Em relação aos casos de carcinoma invasor:

1. São atendidos em média 20 casos novos de câncer de colo uterino invasor por mês na Fundação CECON.

2. Dentre os casos com confirmação histopatológica (por biopsia prévia), 80 % chegam ao serviço com estadiamento avançado e não tem indicação cirúrgica para tratamento (sendo encaminhados para tratamento por quimio e/ou radioterapia). Isto é, apenas cerca de 20% apresentam estadiamento clínico inicial, pouco avançado (IA1 a IB1), sendo apenas para estes casos indicados tratamento cirúrgico;
3. Foram também consideradas as perdas de mulheres que apresentam contraindicação clínica para realização da cirurgia, ou que tiveram alguma complicação durante a cirurgia não sendo possível a coleta da amostra. Além disso, as perdas de acesso as pacientes, seja por recusa para participar da pesquisa, seja por não ser possível a equipe de pesquisa estar presente no momento da conclusão da cirurgia para a obtenção da amostra do tecido da peça cirúrgica (Muitas vezes a cirurgia tem duração de cerca de 6 horas). Este percentual de perda foi calculado ser de 50%.

Dessa forma, as amostras foram coletadas por conveniência em um período de **18 meses**, assim sendo, o cálculo da amostra esta demonstrado abaixo (Quadro 2):

Quadro 2 - Cálculo das amostras do estudo

20 (casos de câncer invasor por mês) X 18 meses de coleta = 360
360 - 80% (casos avançados) = 72
72 - 50% (perdas) = 36 casos de mulheres com câncer cervical invasor.

4.7 Estratégia de abordagem das pacientes e obtenção dos dados socioeconômicos, epidemiológicos, clínicos e de risco para infecção pelo HPV

O estudo incluiu as pacientes com diagnóstico de câncer do colo do útero e neoplasias intra-epiteliais de grau III (NIC III) que fazem cirurgia de HTA ampliada como tratamento na FCECON. Durante o projeto, os colaboradores do estudo tiveram acesso aos prontuários dos pacientes e fizeram busca ativa para acesso das pacientes. As formas de busca ativa eram realizadas através da divulgação do mapa cirúrgico e por informações obtidas no setor de internação, aonde eram localizadas as mulheres que se encaixavam nos critérios de inclusão.

As mulheres que eram localizadas e já estavam internadas para a cirurgia, eram abordadas pela equipe envolvida antes da cirurgia e convidadas a participar da pesquisa. Esta abordagem acontecia no leito da internação respeitando as condições de privacidade da paciente. Ao aceitarem participar do projeto, as mulheres assinaram o Termo de Consentimento

Livre e Esclarecido (TLCE) (Apêndice I) e recebiam uma cópia do mesmo. Após esta abordagem o membro da equipe realizava um questionário sobre dados epidemiológicos, sociodemográficos, clínicos e de risco para a infecção do HPV (Apêndice II).

Para a realização do primeiro objetivo específico que é descrever o perfil epidemiológico, sociodemográfico, clínico e de risco para a infecção pelo HPV nas mulheres estudadas, os dados obtidos através da resposta do questionário continham as variáveis descritas abaixo (Quadro 3):

Quadro 3 - Variáveis analisadas no questionário

1	Idade
2	Procedência
3	Raça
4	Estado civil
5	Escolaridade
6	Ocupação
7	Renda familiar
8	Idade do início da vida sexual
9	Uso de preservativos
10	Uso de métodos contraceptivos
11	Número de parceiros sexuais
12	Número de filhos
13	Idade do primeiro parto
14	Tipo de parto
15	Número de abortos
16	História de menopausa
17	História de IST
18	Participação em rastreio do câncer cervical
19	História de alteração citológica
20	História de câncer na família
21	Queixas clínicas de lesão cervical
22	História de tabagismo
23	Estadiamento FIGO (para os casos de CC)
24	Tipo histológico (para os casos de CC)

4.8 Estratégia para coleta dos dados histológicos

Os resultados histológicos foram avaliados por patologistas da FCECON, e outros patologistas da rede particular de Manaus (em casos aonde a paciente, ou família levaram a peça cirúrgica para ser analisada em outros laboratórios), foram avaliados de acordo com os critérios da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP). O Estadiamento da neoplasia do colo do útero foi estabelecido pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO).

4.9 Estratégia de coleta e conservação da amostra biológica

Após a abordagem da mulher e o preenchimento do TCLE e do questionário, aguardava-se a mulher ir até o Centro Cirúrgico da Fundação CCECON para a realização da cirurgia de histerectomia total ampliada (HTA). Ao final da cirurgia, o material era coletado por cirurgiões, residentes ou por um membro da equipe do projeto treinado. Observando se não havia áreas necrosadas e certificando-se que o fragmento coletado tinha aproximadamente 3 a 5 mm de tecido, e que fosse retirado do cerne da lesão a partir da peça cirúrgica, neste caso o colo do útero, antes do armazenamento no formol. O material coletado era armazenado imediatamente, sem nenhum conservante, em microtubos de 2,0 mL livres de DNAase e RNAase e congelados a -20°C.

As amostras eram armazenadas no laboratório de biologia molecular da FCECON até o momento da extração do DNA.

A estratégia metodológica adotada para a seleção das pacientes e coleta das amostras pode ser visualizada na figura 8:

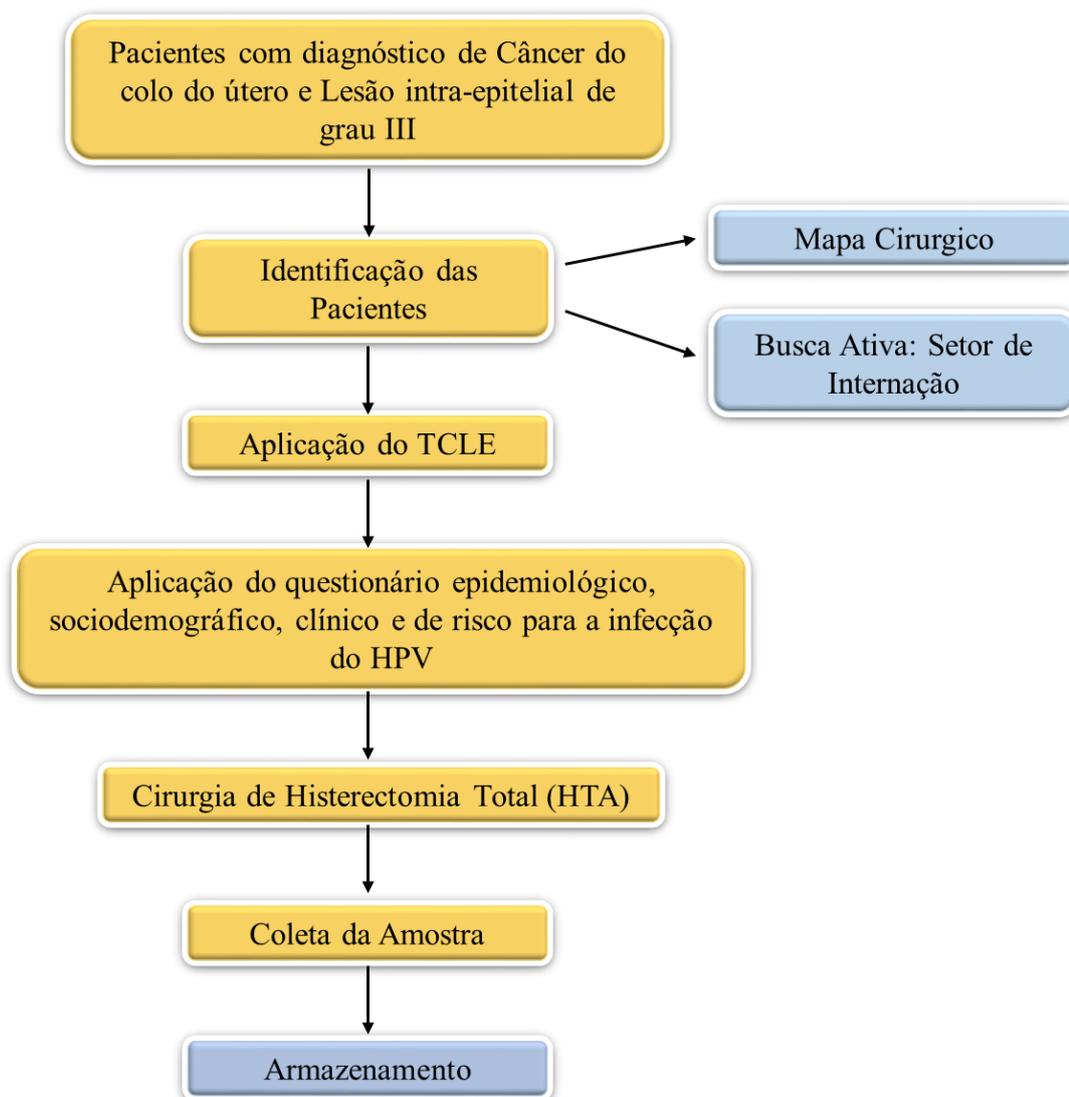


Figura 8 - Estratégia de seleção das pacientes e coleta dos dados e dados socioeconômicos, epidemiológicos, clínicos e de risco para infecção pelo HPV e coleta das amostras de câncer do colo do útero.

4.10 Estratégia molecular para detecção do HPV

Após a coletada da amostra, era realizada a extração do DNA do material, essa etapa era realizada no laboratório de biologia molecular da Fundação CECON. O material extraído era quantificado para avaliação da pureza do DNA, seguida da análise do DNA pelo gene da b-globina humana, ambas essas técnicas eram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Gerência de Virologia da FMT-HVD.

Para a realização do objetivo específico 2 e 3, as estratégias utilizadas para determinar a presença do HPV nos tecidos coletados foram:

1. Todas as amostras seguiram nas análises da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), na qual realizava a detecção do HPV 16 e HPV 18 que são considerados os mais prevalentes em lesões de alto grau e câncer invasor (SANJOSE ET AL., 2010).
2. As amostras positivas para HPV 16 e/ou HPV 18 não seguiram para realização do ensaio de determinação dos demais genótipos através do kit comercial PapilloCheck® - Greiner Bio-One, Germany, pois já havia sido determinado pelo menos um genótipo e por medida de contenção de custos considerando o valor do ensaio.
3. As amostras negativas para HPV 16 e 18 por qPCR eram testadas em uma reação de PCR convencional com os iniciadores PGMY09/11 genéricos (Life Technologies, São Paulo, Brasil).
4. As amostras positivas para a PCR convencional eram encaminhadas para a determinação dos demais genótipos através do kit comercial PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany).

A estratégia metodológica adotada para a determinação da frequência e determinação do genótipo do HPV pode ser visualizada na figura 9:

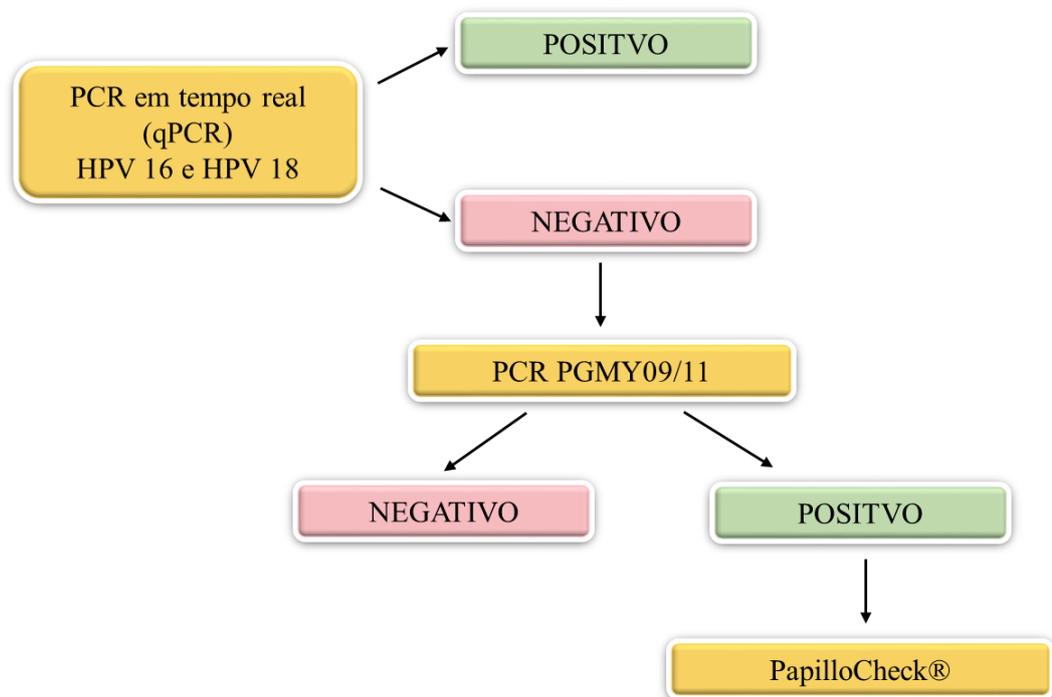


Figura 9 - Estratégia molecular para determinação da frequência e do genótipo do HPV.

4.11 Estratégia para detecção do EBV e HIV

Para a realização do objetivo específico 4, as estratégias usadas para determinar a frequência de infecção por HIV e EBV na população estudada foram: Para detecção do EBV, foi realizada uma reação de PCR. O protocolo detalhado está apresentado no item 4.20 a seguir.

Para a detecção do HIV, o ensaio utilizado seguirá a metodologia por quimioluminescência pelo conjunto diagnóstico ARCHITECT® HIV Ag/Ab Combo (Abbot) seguindo a recomendação do fabricante. Trata-se de um imuno ensaio para detecção qualitativa simultânea do antígeno HIV P24 e de anticorpos contra o vírus da Imunodeficiência humana em soro ou plasma. Estes testes foram realizados pelo laboratório de análises clínicas da Fundação CECON.

4.12 Extração do ácido nucléico

O DNA foi extraído de um fragmento de tecido de aproximadamente 3 a 5 milímetros (mm). A extração foi realizada utilizando kit comercial de extração de alta performance da QIAamp® DNA Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., USA) segundo as instruções do fabricante.

De acordo com as instruções do fabricante, para realizar a extração era necessária uma quantidade determinada do tecido extraído. Dessa forma, o fragmento de tecido coletado era cortado em pedaços menores e pesado numa balança analítica para que se obtivesse 25 mg do tecido, após a pesagem, era adicionado o tampão de lise de tecido e a proteinase K. A mistura era incubada a 56⁰C *over night*, até que ocorresse a lise total do tecido. Após a incubação eram adicionados tampões de lise, lavagem e de eluição de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da extração era feito a alíquota do DNA extraído, e a mesma era armazenada a -20⁰C.

4.13 Quantificação do DNA extraído

Para a quantificação do DNA extraído, utilizou 1 µL da amostra e o equipamento da Thermo Scientific NanoDrop 2000 c, cuja absorbância determinada para utilização das amostras foi de 260 nm, e sua pureza é medida pela relação 260/280 nm (Applied Biosystems, Inc., EUA).

4.14 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para Beta – globina humana

Para a análise da qualidade e viabilidade de amplificação do material extraído, foi realizado uma Reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene da β-globina humana, no qual

obtêm-se um fragmento de 268 pb que foi utilizado como controle interno da reação de detecção do DNA do HPV, afim de evitar os falsos negativos.

As sequências de β - globina humana utilizadas nessa reação foram: GH20: 50-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-30 e PC04: 50 CA-ACTTCATCCACGTTCCACC-30 (SAIKI et al., 1985).

4.15 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PGMY09/11 genéricos)

A PCR convencional foi realizada com os iniciadores PGMY09/11 genéricos (Life Technologies, São Paulo, Brasil) (quadro 4), que amplificam um fragmento de 450pb abrangendo a região L1 da maioria dos tipos de HPV de mucosa (GRAVITT et al., 2000).

Quadro 4 - Sequências do primer PGMY09/11

Primer		Sequência (5' – 3')						
PGMY 11 - A	CGA	CAG	GGA	CAT	AAC	AAT	GG
PGMY 11 - B	GCG	CAG	GGC	CAC	AAT	AAT	GG
PGMY 11 - C	GCA	CAG	GGA	CAT	AAT	AAT	GG
PGMY 11 - D	GCC	CAG	GGC	CAC	AAC	AAT	GG
PGMY 11 - E	GCT	CAG	GGT	TTA	AAC	AAT	GG
PGMY09 - F	CGT	CCC	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - G	CGA	CCT	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09- H	CGT	CCA	AAA	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - I	G	CCA	AGG	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - J	CGT	CCC	AAA	GGA	TAC	TGA	TC
PGMY09 - K	CGT	CCA	AGG	GGA	TAC	TGA	TC
PGMY09 - L	CGA	CCT	AAA	GGG	AAT	TGA	TC
PGMY09 - M	CGA	CCT	AGT	GGA	AAT	TGA	TC
PGMY09 - N	CGA	CCA	AGG	GGA	TAT	TGA	TC
PGMY09 - P	G	CCC	AAC	GGA	AAC	TGA	TC
PGMY09 - Q	CGA	CCC	AAG	GGA	AAC	TGG	TC

PGMY09 - R	CGT	CCT	AAA	GGA	AAA	TGG	TC
HMB01	GCG	ACC	CAA	TGC	AAA	TTG	GT

Fonte: adaptado de (GRAVITT *et al.*, 2000)

A reação de PCR convencional ocorreu nas seguintes concentrações: 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), 1,6 mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) 0,2 µM de cada primer para HPV PGMY09/11, 10 µM de cada primer para β-globina humana (PCO4/GH20), 5µL do DNA molde (amostra), 0,04U/µL de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), com um volume final de 25 µL (Quadro 5).

Quadro 5 - Protocolo da PCR para detecção do HPV

Componentes	Vol (µL) Reação	Concentração Final
PCR buffer 10x (sem MgCl ₂)	2,5	1x
dNTPs (10mM)	0,5	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	0,8	1,6 mM
Primer PGMY 09/11 (10µM)	0,5	0,2 µM
Primer PCO4 (10µM)	0,5	0,2 µM
Primer GH20 (10µM)	0,5	0,2 µM
Taq Platinum (5U/µL)	0,2	0,04 U/µL
DNA	5	
H2O q.s.p	14,5	
Total	25	

As condições necessárias para a amplificação foram de 95°C durante 5 min., seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 min., hibridização a 55°C durante 1 min., extensão a 72°C durante 1 min. e extensão final a 72° C durante 10 minutos, e em cada corrida foi incluído os seguinte controles: DNA de células HeLa como controle positivo e água como controle negativo.

4.16 Eletroforese

Todos os amplicons foram analisados por eletroforese, em gel de agarose (LW Biotec) a 1,5%. Para tanto, uma alíquota de 5,0 µL do produto amplificado na reação de PCR foi adicionada a 2,0 µL de solução tampão de amostra (0,5% azul de bromo fenol e 20% de glicerol), corado (10mg/mL), aplicado no gel submerso em cuba horizontal de eletroforese, com

solução tampão TBE 1X (89mM Tris; 89mM Ácido Bórico; 2mM EDTA), pH 8,4 (Fermentas lifesciences, Luthuania), sob tensão elétrica de 100 Volts, aproximadamente por 70 minutos.

Como controle negativo foi utilizado o “branco”. As bandas foram visualizadas sob a luz ultravioleta (UV) em uma câmara escura, equipada com transiluminador e a imagem foi registrada através de uma câmara fotográfica digital.

O tamanho dos amplicons foi determinado em comparação com o marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas lifesciences, Luthuania).

4.17 Detecção do DNA do HPV 16 por PCR em tempo Real (qPCR)

Para a detecção do DNA do HPV foi utilizado o protocolo segundo (VEO et al., 2015). As amostras foram submetidas ao ensaio de real-time PCR (qPCR) tipo específico, tendo como alvo a proteína E7 dos HPV 16. Os ensaios de qPCR foram processados em sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems®).

Os ensaios de real-time PCR (qPCR) para a proteína E7 do HPV 16 incluíram os seguintes primers de oligonucleotídeos: primer forward (5'GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC3') e primer reverse (5'GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C3'), e a sonda (5' FAM-CAA GCA GAA CCG GAC AG-MGB-NFQ), seguindo o protocolo a seguir (Quadro 6):

Quadro 6 - Protocolo para detecção do HPV 16

Componentes	Vol (µl) Reação	Concentração Final
TaqMan Master Mix 2x	12,5	1x
P HPV 16 E7 (10µM)	1	0,4 µM
P HPV 16 E7S (10 µM)	1	0,4 µM
Probe HPV 16 (10 µM)	0,5	0,2 µM
DNA	5	
H2O	5	
Total	25	

As condições necessárias para a amplificação foram de 50° C por 2 minutos e 95° C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos, 55° C por 1 minuto e 60° C por 1 minuto. Em todas as corridas foram adicionados: DNA HPV 16 conhecido, como controle positivo e água como controle negativo. Todas as amostras e controles foram testados em duplicata.

4.18 Detecção do DNA do HPV 18 por PCR em tempo Real (qPCR)

Para a detecção do DNA do HPV foi utilizado o protocolo segundo (VEO et al., 2015). As amostras foram submetidas ao ensaio de real-time PCR (qPCR) tipo específico, tendo como alvo a proteína E7 dos HPV 18. Os ensaios de qPCR foram processados em sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems®).

Os ensaios de qPCR para a proteína E7 do HPV 18 incluíram os seguintes primers de oligonucleotídeos: primer forward (5' AA GAA AAC GAT GAA ATA GAT GGA 3') e primer reverse (5' GGC TTC CAC CTT ACA ACA CA 3'), e a sonda (5' VIC-AAT CAT CAA CAT TTA CCA GCC-MGBNFQ 3'), seguindo o protocolo a seguir (Quadro 7):

Quadro 7 - Protocolo para detecção do HPV 18

Componentes	Vol (µl) Reação	Concentração Final
TaqMan Master Mix 2x	12,5	1x
P HPV 18 E7 (10µM)	1	0,4 (µM)
P HPV 18 E7S (10 µM)	1	0,4 (µM)
Probe HPV 18 (10 µM)	0,5	0,2 (µM)
DNA	5	
H2O	5	
Total	25	

As condições necessárias para a amplificação foram de 50° C por 2 minutos e 95° C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos, 50° C por 1 minuto e 60° C por 1 minuto. Em cada corrida foi incluído os seguinte controles: DNA HPV18 conhecido, como controle positivo e água como controle negativo. Todas as amostras e controles foram testados em duplicata.

4.19 Genotipagem pelo PapilloCheck®

Para determinar outros genótipos de HPV presentes na amostra, foi utilizado o kit comercial PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany), que é um teste baseado na tecnologia

de “microarray” para a detecção e genotipagem de um fragmento do gene E1 do genoma do Papilomavírus humano (HPV) (SERRAVALLE et al., 2015).

O ensaio é dividido em quatro etapas: PCR, hibridização, lavagem e escaneamento (Figura 10).

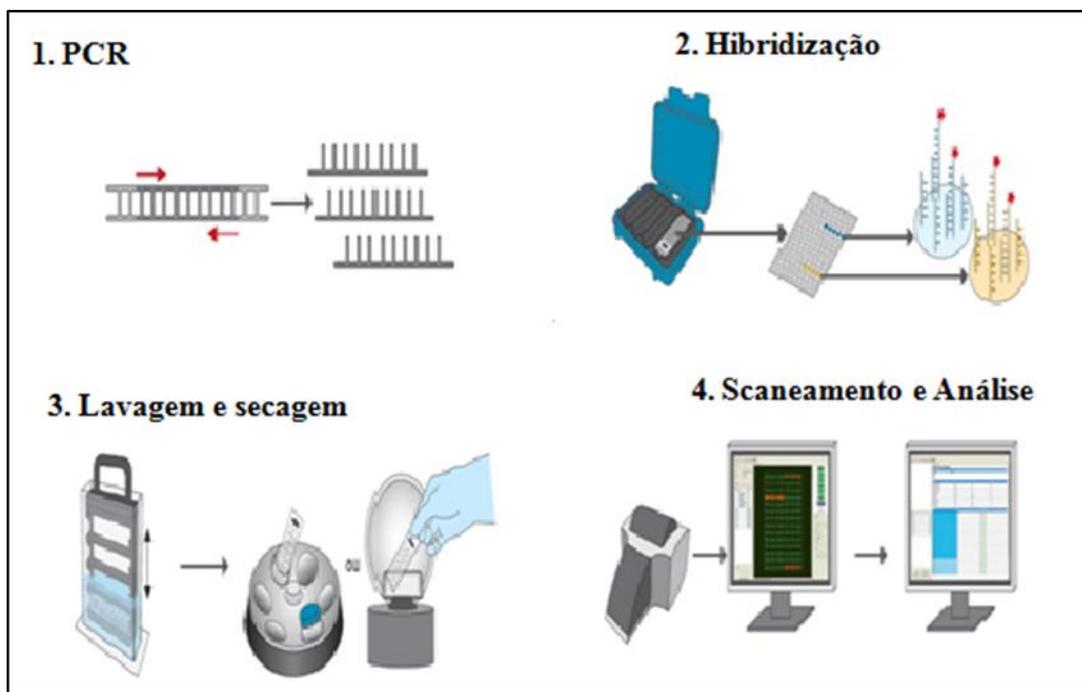


Figura 10 - Etapas da genotipagem pelo Papillocheck®. Fonte:

A primeira etapa do teste é realizada uma PCR, que foi composta por 5 μ L do DNA extraído, 19,8 μ L de solução contida no PapilloCheck® Master Mix, 1U de HotStart Taq DNA Polymerase (Quiagen, Germany) e 0,005U de UNG (Uracil N-DNA Glycosylase) (Fermentas, Germany) para volume final de 26 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, USA), segundo o protocolo: 37°C por 20 minutos para a ação da UNG, 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de (95°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos).

Os produtos da PCR foram então hibridizados para sondas DNA específica e controles “on-chip” ligados à superfície do chip PapilloCheck®. Cada “chip” contém 12 “microarrays” de DNA, permitindo a análise simultânea de 12 amostras cervicais. Durante a hibridização, o DNA ligado é marcado por fluorescência e o DNA não ligado é removido nas etapas de lavagem subsequentes. A eficiência da hibridização é monitorada (controle de hibridização).

Finalmente, o “chip” PapilloCheck® é escaneado, analisado e avaliado automaticamente usando o CheckScanner™ e CheckReport™ Software, respectivamente.

O CheckScanner™ é um scanner a laser bicolor (comprimento de onda de excitação 532nm e 635nm) que possibilita a detecção do sinal de fluorescência gerado pela presença do produto de amplificação específicos de HPV bem como os controles. O CheckReport™ Software possibilita a visualização, análise e avaliação dos resultados e apresenta automaticamente os valores correspondentes tanto dos tipos de HPV detectados como dos controles em um relatório detalhado.

O resultado é avaliado e emitido automaticamente pelo CheckReport™ e indica claramente a presença ou ausência de um ou mais dos 24 tipos de HPV detectáveis (Figura 11). Os protocolos foram padronizados e utilizados no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

HPV 16	HPV 45	HPV 59	HPV 6
HPV 18	HPV 51	HPV 66	HPV 11
HPV 31	HPV 52	HPV 68	HPV 40
HPV 33	HPV 53	HPV 70	HPV 42
HPV 35	HPV 56	HPV 73	HPV 43
HPV 39	HPV 58	HPV 82	HPV 44 / HPV 55*

* PapilloCheck® não permite a diferenciação entre o HPV 44 e o HPV 55.

Figura 11 - Genótipos detectáveis pelo PapilloCheck®

4.20 Detecção do DNA do Epstein - Barr (EBV) por PCR multiplex

Para a detecção do vírus de Epstein - Barr (EBV) foi utilizado o protocolo de PCR adaptado (Quadro 8) (MARKOULATOS et al., 2001). Que amplificam um fragmento de 170pb. Os seguintes primers: EP5 AACATTGGCAGCAGGTAAGC e EM3 ACTTACCAAGTGTCCATAGGAGC.

Quadro 8 - Protocolo para detecção do EBV

Componentes	Vol (µl) Reação	Concentração Final
PCR buffer 10x (sem MgCl ₂)	2,5	1x
dNTPs (10mM)	1	0,4 (mM)
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	3 (mM)
Primer EP13 (10µM)	0,75	0,3 (µM)
Primer EM3 (10µM)	0,75	0,3 (µM)
Taq Platinum (5U/µL)	0,2	0,04 (U/µL)
H2O	15,3	
DNA	3	
Total	25	

O protocolo da reação de PCR no Termociclador teve início a partir de desnaturação inicial a 95°C durante 5min., seguido por 10 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 seg., hibridização a 63°C durante 60 seg., seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 seg., hibridização a 60°C durante 30 seg., extensão a 72°C durante 30 seg. e extensão final a 72° C durante 40 segundos. Em cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: Amostra conhecida positivamente (controle positivo) e água (controle negativo); juntamente com as amostras em duplicata.

4.21 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Na análise dos dados quantitativos, quando aceita a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a média e o desvio-padrão (DP). Já no caso da rejeição da hipótese de normalidade optou-se por calcular a mediana. Na comparação da média da idade em relação as variáveis categóricas foram aplicados os testes paramétricos de *t-student* e Análise de Variância – ANOVA. Na análise da idade ainda foi calculado o Intervalo de Confiança ao nível de 95% (IC95%). Já na comparação das proporções dos dados categóricos foi aplicado o teste do qui-quadrado de *Pearson*; e teste exato de *Fisher* para tabelas 2x2 (VIEIRA, 2004).

O software utilizado nas análises dos dados foi o programa Epi Info versão 7.2.1 para Windows, que é produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças Norte-americano – CDC (www.cdc.gov/epiinfo). Já o nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5%.

4.22 Aspectos éticos

O protocolo a partir dos quais este estudo se fundamentou foi aprovado previamente pelo CEP da Fundação CECON em 15/06/2013 (número de CAAE:128.122134.0000.0004).

4.23 Limitações do Estudo

O estudo realizado apresentou algumas limitações, como a dificuldade em obter os fragmentos da amostra fresca, pois a cirurgia demorava até 6 horas ou mais dependendo do estado da paciente. Problemas nos resultados histopatológicos das pacientes, os laudos demoram e algumas amostras são encaminhadas para fora do hospital, houve perda de alguns dados, devido a dificuldade de comunicação com as pacientes.

4.24 Fontes de Financiamento

Alguns itens de consumo foram adquiridos por recursos já disponibilizados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). A infraestrutura de equipamentos foi viabilizada por parcerias com o Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV) e o ILMD/FIOCRUZ.

Outros insumos foram providos pelas parcerias com o INCT HPV/CNPq/ MCT e com o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo / USP.

5 Resultados

Foram selecionadas 47 pacientes através do mapa cirúrgico e do setor de internação; destas, somente 42 pacientes foram incluídas no estudo. Entre as pacientes excluídas, duas (2) foram excluídas por serem pacientes que já haviam passado por quimioterapia ou radioterapia, uma (1) paciente foi excluída por se tratar de câncer de endométrio, e duas (2) mulheres foram excluídas pois não foi possível resgatar os dados histopatológicos (figura 12).

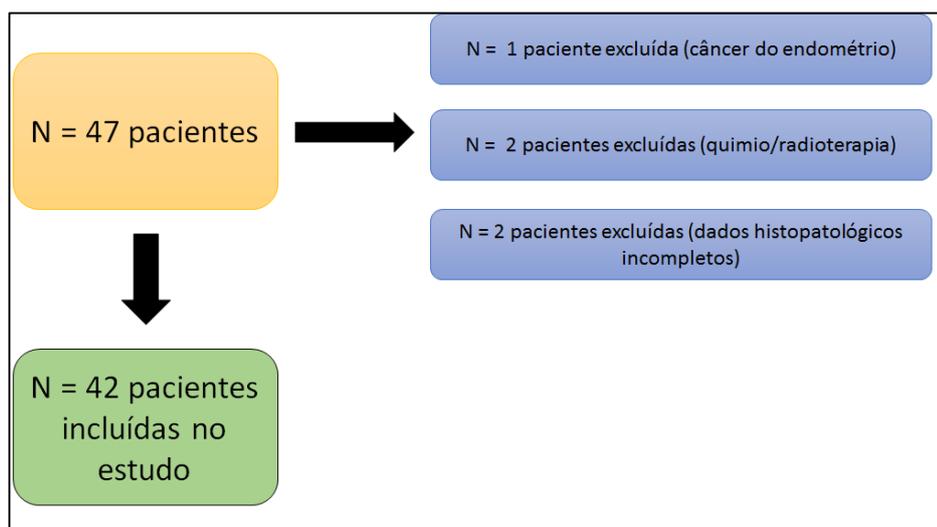


Figura 12 - Diagrama das amostras coletadas e selecionadas para o estudo.

5.1 Perfil socioeconômico e demográfico

Dentre as características socioeconômicas, a maioria das participantes eram da raça parda (80,9%), com nível de escolaridade até o fundamental completo (38,1%) e tinham como renda familiar até 1 salário mínimo (61,90%). Sobre o estado civil a maioria (28,6%) era casada (Tabela 01).

Tabela 1 - Distribuição segundo a frequência das variáveis socioeconômicas das mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Raça		
Parda	34	80,9
Branca	6	14,3
Negra	1	2,4
Indígena	1	2,4
Escolaridade		
Fundamental incompleto	12	28,6
Fundamental completo	16	38,1
Médio incompleto	3	7,1
Médio completo	8	19,0
Superior incompleto	2	4,8
Superior completo	1	2,4
Renda familiar (salário mínimo)		
Até 1	26	61,9
2 a 3	14	33,3
> 3	2	4,8
Estado civil		
Solteira	11	26,2
Casada	12	28,6
Relação estável	11	26,2
Viúva	5	11,9
Divorciada	3	7,1

f_i = frequência absoluta simples.

A idade das mulheres variou de 20 a 78 anos, com uma média de 48,4± 12,9 anos (Gráfico 01).

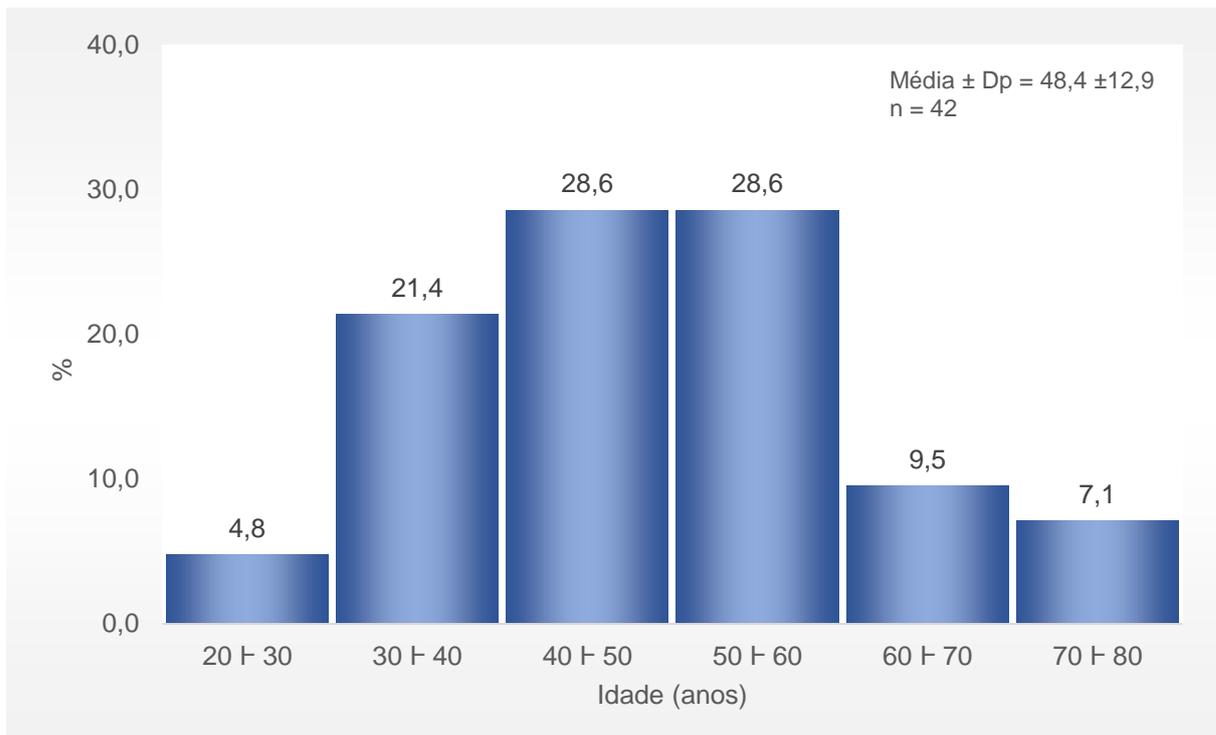


Gráfico 1 - Distribuição segundo a faixa etária e média de idade das mulheres com câncer do colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

5.2 Características clínicas e comportamentais

A maioria das pacientes responderam ter iniciado a atividade sexual entre os 15 aos 20 anos (69,1%), com uma média de idade da primeira relação de $16,0 \pm 2,4$ anos. Quando questionadas sobre o uso do preservativo 50% das pacientes afirmavam nunca terem utilizado, 38,1% usavam as vezes, e 11,9% sempre faziam o uso do preservativo. Dentre os motivos para a não utilização do preservativo elas afirmavam não usar por serem casadas ou estarem uma relação estável (29,7%), não gostar de usar o preservativo (13,5%), o parceiro não gostar de utilizar a camisinha (2,7%) e outros motivos (54,1%). Sobre a utilização de algum outro método contraceptivo a maioria usou anticoncepcional oral (63,2%) e 36,8% usou anticoncepcional injetável (Tabela 02).

Tabela 2. Distribuição das variáveis referente ao comportamento sexual das mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Idade que iniciou a relação sexual (anos)		
11 F 15	9	21,4
15 F 20	29	69,1
20 F 25	4	9,5
Média ± Dp	16,0 ± 2,4	
Uso de preservativo (camisinha)		
Nunca	21	50,0
Às vezes	16	38,1
Sempre	5	11,9
Motivo de não usar camisinha (n = 37)		
Casada ou relação estável	11	29,7
Não gosta	5	13,5
Parceiro não gosta	1	2,7
Outros	20	54,1
Usa ou usou algum outro método anticoncepcional	19	45,2
Método utilizado (n = 19)		
Anticoncepcional oral	12	63,2
Anticoncepcional injetável	7	36,8
Número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses		
1	41	97,6
3	1	2,4
Número de parceiros sexuais na vida		
1	8	19,1
2 a 3	16	38,1
4 a 5	14	33,3
6 a 10	4	9,5
Mediana	3,0	

f_i = frequência absoluta simples.

Sobre o número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses (em relação a data da entrevista) 97,6% relataram ter tido apenas 1 parceiro sexual, e 2,4% tiveram 3 parceiros sexuais nos últimos 12 meses. Quanto ao número de parceiros sexuais na vida 19,1% responderam terem tido apenas 1 parceiro sexual durante sua vida toda, 38,1% tiveram de 2 a 3 parceiros, 33,3% de 4 a 5 parceiros, 9,5% tiveram de 6 a 10 parceiros sexuais na vida, com uma mediana de 3,0 (Tabela 02).

Tabela 3. Distribuição segundo o número de filhos, tipo de parto, aborto e medicamento sistêmico utilizado por mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Número de filhos		
1	6	14,3
2 a 3	16	38,1
4 a 5	11	26,2
> 5	9	21,4
Mediana	3,0	
Idade do primeiro parto (anos)		
15 F- 20	27	64,3
20 F- 25	14	33,3
25 F- 30	1	2,4
Média ± Dp	18,7	
Tipo de parto		
Cesariana	6	14,3
Normal	36	85,7
Teve algum aborto	23	54,8
Fuma ou já fumou	14	33,3

f_i = frequência absoluta simples.

As pacientes incluídas no estudo apresentaram uma mediana 3,0 filhos, sendo que a maioria tinha de 2 a 3 filhos (38,1%), seguido de 4 a 5 filhos (26,2%), demonstrando um alto percentual no número de filhos. Quanto a idade do primeiro parto, a maioria (64,3%) tinha tido seu primeiro filho entre 15 e 20 anos, com uma média de idade do primeiro parto 18,7± 2,9. Em relação ao tipo de parto 85,7% afirmavam ter tido parto normal e 14,3% parto cesariana. Quando questionadas se tiveram tido algum aborto, 54,8% afirmaram ter tido um aborto em algum momento da vida (Tabela 03).

Quando questionadas sobre o tabagismo, 33,3% afirmaram fumar ou ter fumado em algum momento da vida.

Tabela 4. Distribuição segundo agravos sexualmente transmissíveis, sintomas de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Apresenta ou apresentou infecções sexualmente transmissíveis	5	11,9
HIV	1	2,4
Sífilis	2	4,8
Outra	3	7,1
Já apresentou corrimento vaginal	22	53,4
Já apresentou verruga	2	4,8
Já apresentou ferida	3	7,1

f_i = frequência absoluta simples.

Quando questionadas se tinham alguma história de uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST) 11,9% responderam ter tido alguma IST como: HIV (2,4%), Sífilis (4,8%) e outras ISTs (7,1%). Em relação a alguns sintomas de ISTs 53,4% relataram que já haviam tido algum corrimento vaginal, 4,8% relataram ter tido alguma verruga e 7,1% já apresentou alguma ferida na região genital (Tabela 04).

Quando abordadas sobre a realização do preventivo, metade das mulheres afirmou realizar o preventivo 1 vez ao ano, 14,3% nunca realizaram o preventivo ou realizam a cada dois anos, 11,9% realizam a cada três anos, 7,1% de seis em seis meses e 2,4% não sabia responder de quanto em quanto tempo fazia o preventivo. Em relação aos exames anteriores realizados apenas 8,6% responderam ter tido alguma alteração nos preventivos anteriores. Das mulheres incluídas no estudo 26,2% afirmaram ter algum familiar que já apresentou câncer do colo do útero como: mãe (45,4%), tia (36,4%), avó (9,1%) e irmã (9,1%) ou familiares que tenham tido outro tipo de câncer (40,5%) (Tabela 05).

No momento da entrevista 35,7% das pacientes estavam apresentando alguma queixa clínica, dentre elas (26,2%) apresentavam dor pélvica e (4,8%) apresentavam sangramento durante as relações sexuais e (4,8%) apresentavam corrimento vaginal (Tabela 05).

Tabela 5 - Distribuição segundo preventivo, sinais e câncer na família de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Frequência que realiza o preventivo		
Nunca realizou	6	14,3
De seis em seis meses	3	7,1
Uma vez ao ano	21	50,0
A cada dois anos	6	14,3
Mais de três anos	5	11,9
Não sabe	1	2,4
Já apresentou alguma alteração nos preventivos anteriores (n = 35)	3	8,6
Familiar já apresentou câncer do colo do útero (n = 11)		
Mãe	5	45,4
Tia	4	36,4
Avó	1	9,1
Irmã	1	9,1
Familiar que já apresentou outro tipo de câncer	17	40,5
Está apresentando alguma queixa clínica (no momento da entrevista)	15	35,7
Sangramento durante as relações sexuais	2	4,8
Dor pélvica	11	26,2
Corrimento Vaginal	2	4,8

f_i = frequência absoluta simples.

5.3 Status patológico, tipo histológico e FIGO

Dentre as 42 pacientes 30,9% (13 mulheres) tinham um diagnóstico de neoplasia intra-epitelial de grau III (NIC III), e 69,1% (29 mulheres) tinham um diagnóstico de carcinoma invasor. Em relação ao tipo histológico das pacientes diagnosticados com carcinoma invasor 52,4% tinham diagnóstico de carcinoma de células escamosas (CEC), seguido de 14,3% de adenocarcinoma (ADC) e 2,4% de adenoescamoso. Quanto ao tipo histológico das pacientes diagnosticadas com NIC III 30,9% apresentavam carcinoma *in situ* com ocupação glandular (Tabela 06).

Quanto a classificação FIGO das pacientes com carcinoma invasor a maioria (23,8%) estava no estadiamento IB1 segundo os resultados histopatológicos da peça cirúrgica, seguido do IA2 e IB2 (7,1%) (Tabela 06).

Tabela 6. Distribuição segundo o status patológico, tipo histológico e FIGO de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Status patológico		
NIC III	13	30,9
Carcinoma invasor	29	69,1
Tipo histológico		
Carcinoma de células escamosas	22	52,4
Carcinoma <i>in situ</i> com ocupação glandular – NIC III	13	30,9
Adenocarcinoma	6	14,3
Adenoescamoso	1	2,4
Estadiamento		
I	2	4,8
IA	2	4,8
IA1	2	4,8
IA2	3	7,1
IB	2	4,8
IB1	10	23,8
IB2	3	7,1
IIA	2	4,8
IIB	1	2,4
IIIB	1	2,4
IVB	1	2,4

f_i = frequência absoluta simples.

5.4 Infecção pelo HPV

A prevalência da infecção pelo HPV entre as 42 pacientes incluídas no estudo foi de 88,1% (tabela 08). O restante dos casos (11,9%) foram considerados negativos para o DNA HPV na estratégia que utilizamos para a detecção do mesmo, pois em ambos os testes de detecção utilizados no estudo (PCR em tempo Real para HPV 16 e 18, PGMY, Papillocheck®) não houve a detecção do HPV em nenhuma das amostras. Dos genótipos encontrados o HPV 16 foi o mais prevalente (70,3%), seguido pelo HPV 18 (21,6%), HPV 06 (2,7%) e 5,4% não foi possível determinar o genótipo, pois foram positivos no PGMY mas não detectados nos testes de genotipagem (Tabela 07).

Tabela 07 – Distribuição segundo o resultado da frequência da Infecção pelo HPV e genótipos encontrados nas mulheres com NIC III e câncer do colo do útero atendidas na FCECON, Manaus-AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Resultado do HPV		
Positivo	37	88,1
Negativo	5	11,9
Genótipo do HVP (n = 37)		
HPV 06	1	2,7
HPV 16	26	70,3
HPV 18	8	21,6
Indeterminado	2	5,4

f_i = frequência absoluta simples.

5.5 Coinfecção

Dentre as pacientes incluídas no estudo, confirmou-se pela análise do prontuário que 1 mulher (2,6%) apresentava sorologia positiva para HIV e 7 (16,7%) foram positivas na PCR para o EBV (Tabela 08).

Tabela 08 - Distribuição da frequência de HIV e EBV em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis (n = 42)	f_i	%
Resultado do EBV		
Positivo	7	16,7
Negativo	35	83,3
Resultado do HIV		
Positivo	1	2,6
Negativo	41	97,4

f_i = frequência absoluta simples.

Das pacientes que tinham a presença do EBV 6 (16,3%) tinham presença do HPV. Quanto ao genótipo do HPV destas mulheres infectadas pelo EBV, 3(50%) pacientes foram positivas para HPV 16, 1(16,6%) para HPV 18, 1(16,6%) para HPV 06 e 1(16,6%), não foi possível definir o genótipo do HPV. Quanto a presença do HIV, a única paciente positiva para HIV, apresenta também infecção por HPV e EBV.

5.6 Genótipo HPV x resultado histopatológico (NIC III e carcinoma invasor)

Quanto a frequência do genótipo de HPV e o resultado histopatológico, observou-se a frequência do HPV 16 em ambos os tipos de lesões, tanto no diagnóstico de NIC III como no de carcinoma invasor, seguido do HPV 18, HPV 06 e os genótipos indeterminados (gráfico 02).

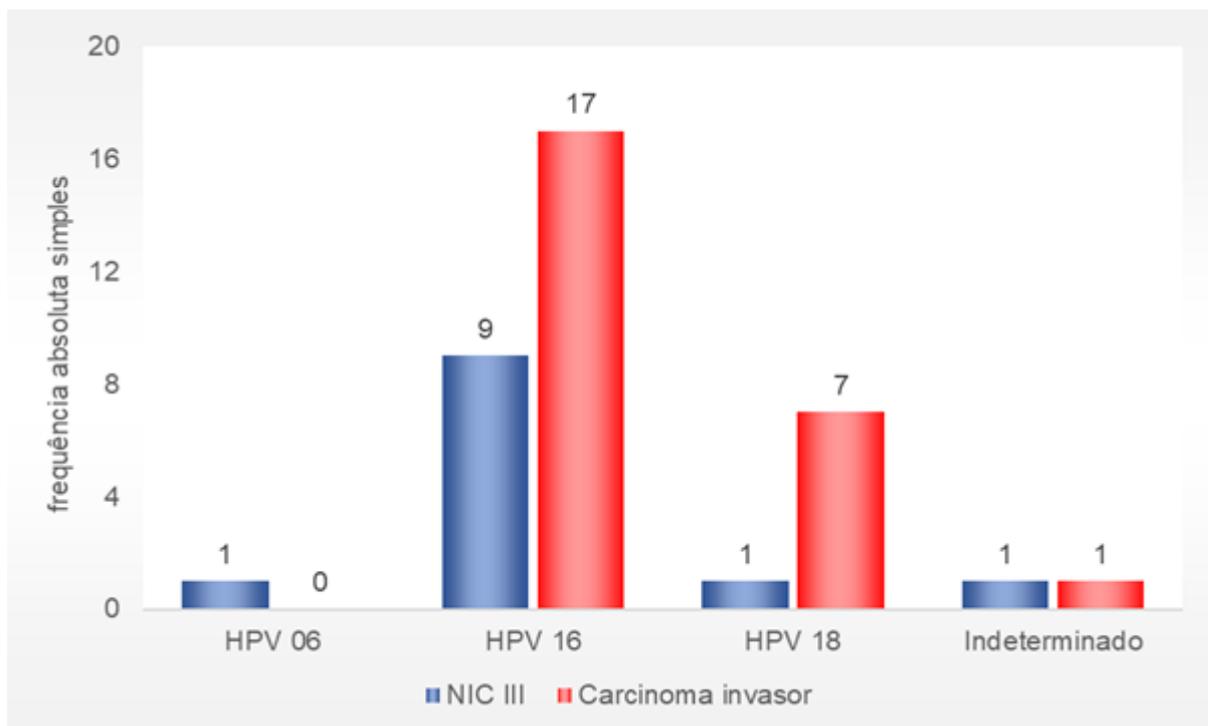


Gráfico 2 - Distribuição segundo os genótipos do HPV em relação ao status histopatológico de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Na distribuição dos genótipos do HPV por classificação histológica, o genótipo mais observado na maioria das pacientes com carcinoma de células escamosas foi o genótipo HPV16, assim como nas pacientes com adenocarcinoma e carcinoma *in situ* com ocupação glandular (NIC III) (Gráfico 03).

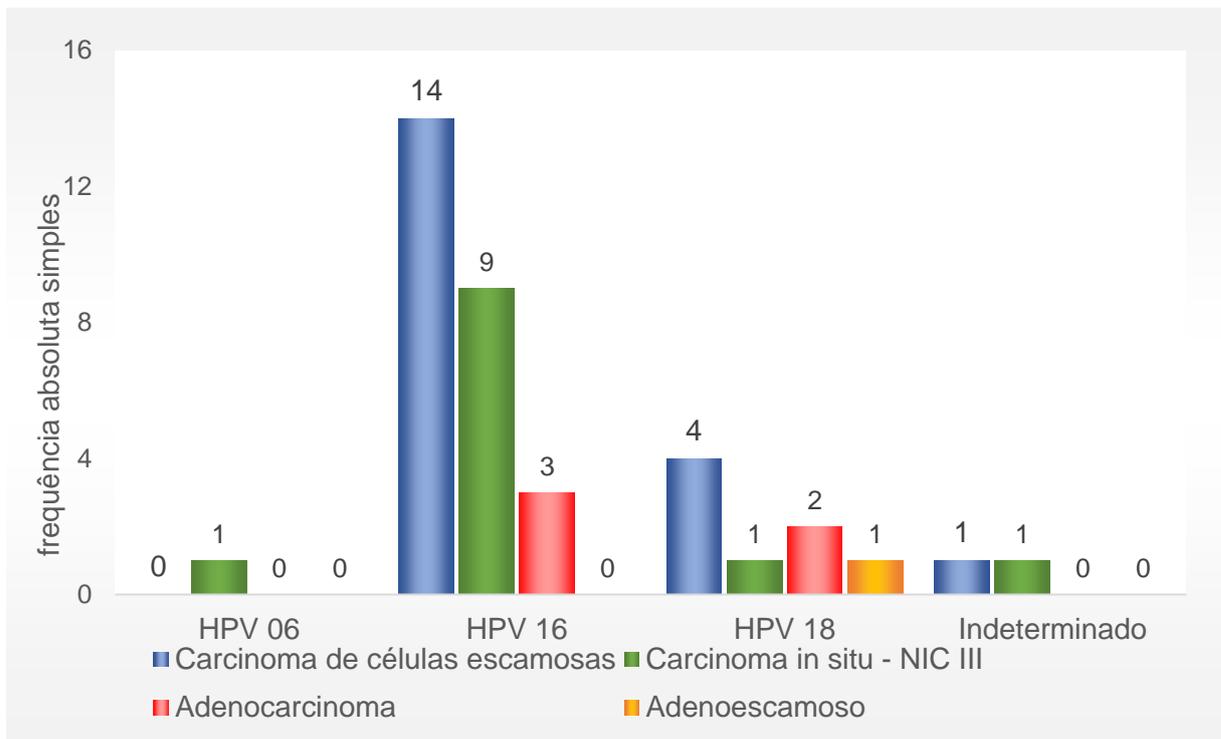


Gráfico 3. Distribuição do genótipo do HPV e os tipos histológicos encontrados em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

5.7 Resultado histopatológico x Genótipo HPV x Idade

Dentre as pacientes com o diagnóstico de NIC III 92,3% foram positivas para o HPV16 e 7,7% foram negativas para o HPV. Quanto as mulheres diagnosticadas com carcinoma invasor, 86,2% foram positivas para HPV e 13,8% foram negativas para HPV. Não houve associação estatística quanto as variáveis analisadas (resultado patológico para os diagnósticos de NIC III, carcinoma invasor e do resultado do HPV) (Tabela 09).

Quanto ao tipo histológico e o resultado do HPV, das pacientes classificadas com carcinoma de células escamosas (CEC) 86,4% eram positivas para HPV e 13,6% negativas para HPV, representando a maioria das pacientes incluídas no estudo. Em relação aos outros tipos histológicos, 83,3% eram adenocarcinomas positivos para HPV e 16,7% eram negativos para HPV e quanto ao tipos histológico adenoescamoso 1 amostra foi positiva para HPV. Já para os carcinomas *in situ* com ocupação glandular (NIC III) 92,3% foram positivos para HPV e 7,7% negativos. Em relação a essas variáveis (tipos histológico, resultado do HPV) não foi possível aplicar a estatística, devido as restrições dos testes aplicados. Houve associação estatística entre o resultado do HPV e a idade das pacientes (Tabela 09).

Tabela 09 - Distribuição segundo o resultado do HPV em relação ao resultado patológico, histológico e idade de mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Variáveis	Resultado HPV				Total	p
	Positivo		Negativo			
	(n = 37)		(n = 5)			
	f _i	%	f _i	%		
Resultado patológico						0,998*
NIC III	12	92,3	1	7,7	13	
Carcinoma invasor	25	86,2	4	13,8	29	
Tipo histológico						***
Carcinoma de células escamosas	19	86,4	3	13,6	22	
Carcinoma <i>in situ</i> com ocupação glandular	12	92,3	1	7,7	13	
Adenocarcinoma	5	83,3	1	16,7	6	
Adenoescamoso	1	100,0	-	-	1	
Idade (Média ± Dp)	50,1 ± 12,4		36,0 ± 9,5			0,020*

f_i = frequência absoluta simples. * Teste exato de *Fisher*; ** Teste *t-student*; *** Não foi possível aplicar a estatística de teste devido as restrições do qui-quadrado. Valor de p em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Analisando a distribuição da média da idade das mulheres, o status patológico (NIC III e carcinoma invasor) e o genótipo encontrado, observamos no gráfico 4 que a média de idade das mulheres com HPV 16 foi de 51,9 anos. Mulheres infectadas com HPV 18 foram 5 anos mais novas do que as com HPV 16, idade média de 46,5 anos. Mulheres infectadas com HPV 06 tiveram uma idade média de 32,0 e a média de idade dos casos infectados por outros tipos de HPV foi de 49,5 anos (valor ANOVA p=0,350).

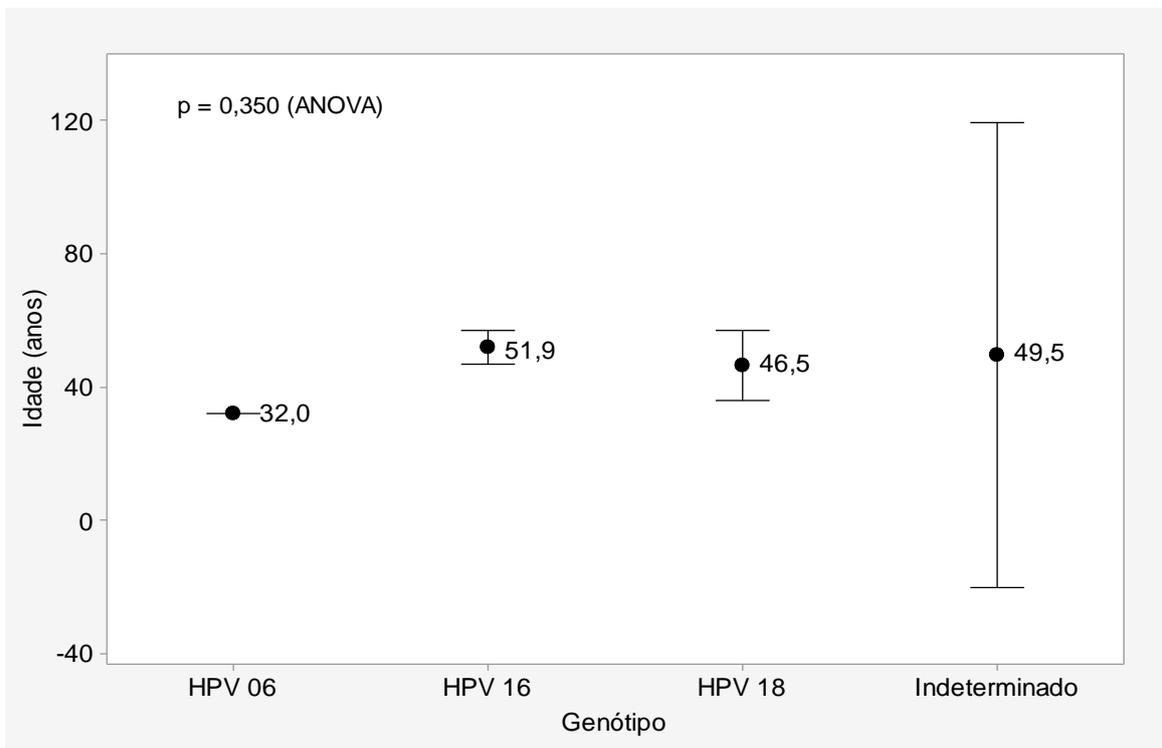


Gráfico 4 - Distribuição da média de idade em relação aos genótipos do HPV em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

Considerando a distribuição da média de idade, o status patológico e resultado do HPV, observa-se que as mulheres negativas para HPV diagnosticadas com carcinoma invasor tiveram a média de idade de 35,2 anos, as diagnosticadas com NIC III tiveram uma média de idade de 39,0. As mulheres positivas para HPV diagnosticadas com carcinoma invasor tiveram a média de idade de 51,5 e as diagnosticadas com NIC III tiveram uma média de idade de 47,2 (valor ANOVA $p=0,096$) (Gráfico 5).

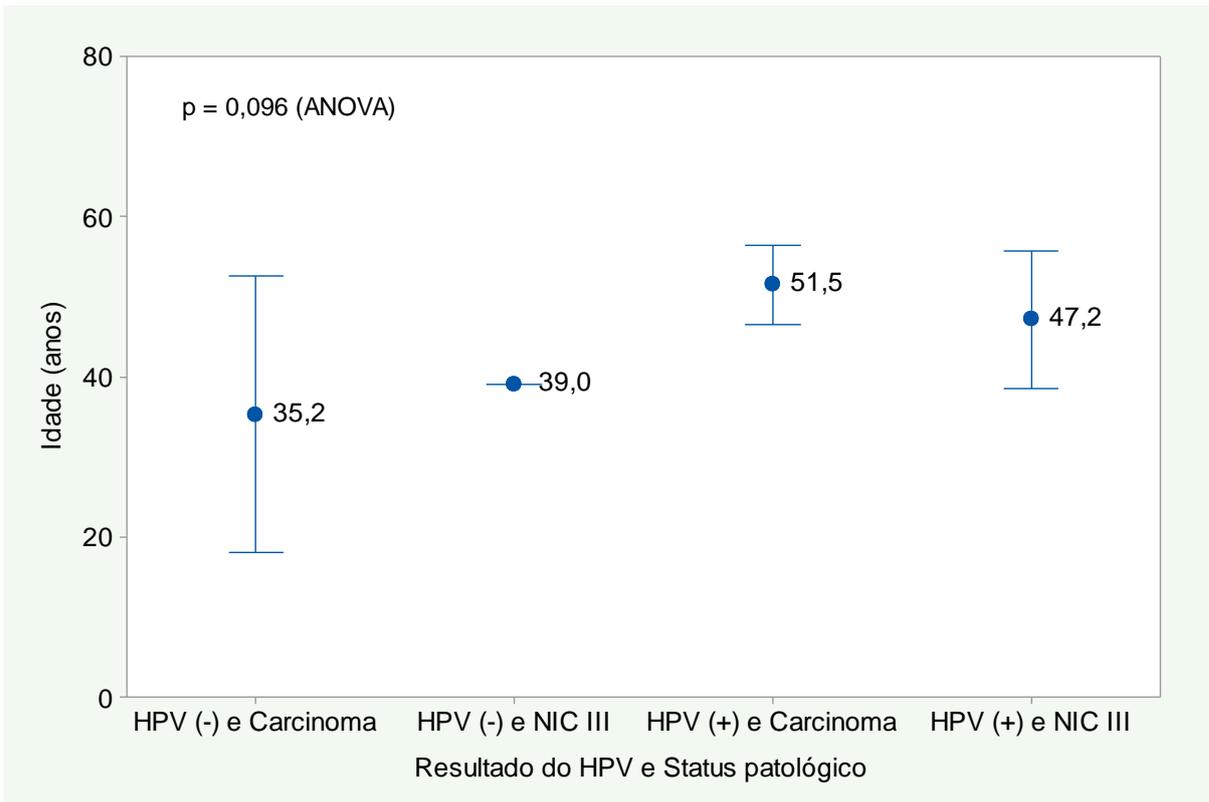


Gráfico 5 - Distribuição da média de idade em relação ao resultado do HPV e status em mulheres com câncer de colo de útero e NIC III atendidas na FCECON, Manaus – AM.

6 Discussão

A indústria da biotecnologia está atenta para a tendência ou a clara necessidade de mudança de paradigma no sentido de rever o algoritmo do rastreamento do câncer cervical principalmente em regiões onde há alta prevalência desta patologia. Uma das variáveis importantes neste sentido é conhecer claramente a variabilidade de genótipos do HPV envolvidos nas lesões de alto grau ou mesmo no câncer cervical invasivo na região onde se deseja implantar o rastreamento molecular.

Neste estudo observou-se que em lesões cervicais de alto grau ou em câncer de colo de útero invasivo em mulheres submetidas a tratamento cirúrgico atendidas no centro de referência em diagnóstico e tratamento do câncer no Amazonas (FCECON), o HPV 16 se apresentou como o mais frequente (70,3%) seguido do HPV 18 (21,6%). Observou-se ainda evidências do envolvimento do HPV 6 (considerado de baixo risco oncogênico) no desenvolvimento de lesões de alto grau.

Após análise da caracterização sociodemográfica das mulheres estudadas evidenciou-se a predominância da raça/cor parda, característica que pode ser observada com grande frequência no estado do Amazonas. O nível de escolaridade foi baixo, uma vez que a grande maioria das mulheres incluídas no estudo apresentaram até 8 a 9 anos de estudo, o que equivale a atingir no máximo o ensino fundamental (IBGE, 2016). Considerando o que diz a Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílio – PNAD, a educação é um bem coletivo imprescindível para a inserção social, que apresenta um visível impacto nas condições gerais da população, incluindo melhorias à saúde da população e informação a essas mulheres (BRASIL, 2012). Percebe-se que a escolaridade baixa dessas mulheres pode interferir no acesso aos serviços de informações, prevenções, sendo uma característica muito frequente em países subdesenvolvidos e no estado do Amazonas.

A média de idade das participantes foi de $48,4 \pm 12,9$ anos, sendo incluída uma mulher com carcinoma invasor com 20 anos de idade. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de LOYA et al., (2016) com 300 amostras de carcinomas invasores realizado em uma área urbana do Paquistão compreendendo uma média de idade de $49,5 \pm 12,4$ anos. Mas ao compararmos com a média da idade das pacientes portadoras de câncer do colo do útero no mundo que é de $51,4 \pm 13,3$ anos (DE SANJOSE et al., 2010), percebe-se claramente que esta neoplasia no Amazonas atinge mulheres mais jovens. Da mesma forma, estudos realizados em São Paulo, encontraram uma média de idade de $53,15 \pm 15,14$ anos (OLIVEIRA, 2011), e 52,1 anos (ELUF-NETO et al., 1994). Estudos realizados na Fundação CECON já descreveram

pacientes com 17 anos apresentando lesões de alto grau e carcinoma (dados não publicados). Em uma metá-análise realizada com mulheres africanas que tinham citologia normal e neoplasias, encontrou mulheres com menos de 25 anos com lesões de alto grau e carcinoma invasor (OGEMBO et al., 2015). Outro estudo realizado em Natal encontrou uma média de idade de 44.3 ± 11.25 anos, as idades variaram entre 19 e até 69 anos (FERNANDES et al., 2010). Nossa população, se enquadra mais com a idade apresentada em países como a África.

A maioria das pacientes incluídas no estudo responderam ter apenas 1 salário mínimo, como renda familiar o que corrobora com os dados de escolaridade encontrados no estudo, e que reflete significativamente na falta de acesso à informação, dificultando que essas mulheres procurem um serviço de saúde.

Neste estudo 38,1% das mulheres são provenientes de algum município do Estado do Amazonas (Urucurituba, Parintins, Lábrea, Codajás, Alto Jutai, Borba, Manacapuru, São Paulo de Olivença, Coari entre outros), 45,3% de Manaus e 7% de outros estados do Brasil como Maranhão, Pernambuco, Ceará. Observamos que um grande parte dessas pacientes vindas do interior é reflexo da geografia do Estado do Amazonas, que apresenta uma imensa população ribeirinha, que na maioria das vezes vive em isolamento, o que dificulta principalmente o acesso a informação, saúde, educação.

Quanto a situação conjugal, a maioria (54,8%) relatou estar casada ou em uma relação estável, permitindo a dedução da existência de maior atividade sexual monogâmica e fixa. Um estudo realizado no norte da África em Marrocos mostrou que a poligamia não é uma prática frequente entre as mulheres incluídas no estudo, pois 79,2% dos casos de câncer cervical e 88,6% dos casos controles, as mulheres disseram que eram monógamas, retratando não ser uma prática comum entre as mulheres incluídas neste estudo (BERRAHO et al., 2017).

Quando se avaliou as características clínicas e comportamentais observou-se o início da atividade sexual muito precoce, concentrando a maioria entre 11 a 20 anos (90,5%), com uma média de idade da primeira relação de $16,0 \pm 2,4$ anos, levando à exposição à infecção pelo HPV muito cedo, podendo sua persistência levar ao desenvolvimento do câncer do colo do útero nessas mulheres. Estudos sugerem que o início da atividade sexual antes dos 18 anos aumenta o risco de até 1,62 vezes ($p=0,034$) para a infecção pelo HPV (MARCELLUSI et al., 2015). Podemos sugerir que esse fator de risco também foi responsável pelo desenvolvimento das lesões de alto grau ou do câncer do colo do útero.

Quanto ao uso do preservativo (camisinha), foi relatado pela metade da população estudada que não faz uso do mesmo. Dentre as justificativas para a não utilização do

preservativo observou-se: ser "casada ou estar em uma relação estável", "não gostar de utilizar o preservativo", "o parceiro não gosta" e outros, como por exemplo não terem acesso a camisinhas ou não acharem importante o uso delas. Estes dados corroboram com a situação conjugal em que as mulheres vivem, pela "confiança no parceiro", assim como os níveis de escolaridade.

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, está o uso de contraceptivos orais de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Neste estudo a maioria das mulheres utilizam contraceptivos orais, e a grande maioria deste grupo são as pacientes já diagnosticadas com câncer do colo do útero. Alguns estudos mostram que o uso de contraceptivos orais por 6 anos ou mais, está associados com o desenvolvimento do câncer cervical (OR =1.8) (BERRAHO et al., 2017). Um estudo que analisou os riscos relativos para o câncer cervical, mostrou que mulheres que utilizam esses contraceptivos quando comparadas as que não usam possuem um maior risco para o câncer do colo do útero (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al., 2007).

O número de parceiros sexuais é considerado um fator de risco mais consistente para algumas infecções sexualmente transmissíveis. Neste estudo 33,3% das mulheres relataram terem tido entre 4 a 5 parceiros ao longo de sua vida sexual. Dados semelhantes foram observados em estudo realizado no Sudoeste da China com 40.311 mulheres triadas, que mostrou que as que tiveram de 3 ou mais parceiros sexuais (32,3%) têm um maior potencial para adquirir infecção do HPV (TANG et al., 2017). Outro estudo mostrou que ter mais de 5 parceiros aumenta o risco em 2,52 vezes para adquirir infecções induzidas pelo HPV (MARCELLUSI et al., 2015).

A alta paridade também foi uma característica das pacientes incluídas neste estudo sendo uma mediana de 3 filhos. A alta paridade é considerada um fator consistente para o desenvolvimento do câncer em mulheres que possuem infecção pelo HPV (BOSCH et al., 2002). Mulheres atendidas em um serviço de ginecologia de referência em Recife, participaram de um estudo na qual foi identificado fatores de risco para o câncer cervical e o HPV, e os resultados mostraram que mulheres com 4 ou mais gestações apresentam duas vezes mais risco de lesão cervical ou infecção por HPV (MENDONÇA et al., 2010).

Em relação ao aborto, a população estudada já havia passado pela experiência de pelo menos 1 aborto. Dentre os fatores que podem provocar o aborto estão as infecções sexualmente transmissíveis como por *Chlamydia trachomatis* (NAKUBULWA et al., 2015). Quando

abordadas se já haviam tido alguma IST apenas 11,9% relata já ter apresentado alguma infecção, dentre elas estava o HIV e Sífilis. Um estudo realizado no Senegal localizado na África Ocidental, recrutou mulheres com HIV e HPV, mostrou que mulheres HIV positivas apresentam baixos níveis de regressão do HPV, quando existem infecções HSIL (WHITHAM et al., 2017) .

Com relação ao tabagismo, algumas pacientes responderam ter fumado ou ainda praticar tabagismo no momento da entrevista. Existe uma associação do tabagismo com o câncer cervical, bem demonstrada em uma metanálise evidenciando que o tabagismo aumenta significativamente o risco para o câncer cervical, e seus efeitos são reforçadas quando há interação com a infecção pelo HPV (ZHEN; HU; BIAN, 2013).

Dados observados na população estudada de mulheres com NIC III e carcinoma invasor, mostram que a maioria das pacientes (83,3%) realizava o preventivo uma vez ao ano, e ao analisarmos a população, 69,1% foram diagnosticadas com câncer do colo do útero, e destas, apenas 8,6% relataram terem apresentado exame citológico de rastreio alterado, sugerindo que mesmo essas mulheres realizando o preventivo, não foi possível detectar lesões precursoras. Como este rastreio é baseado no teste citopatológico, alguns estudos sugerem que este método apresenta limitações de sensibilidade, reprodutibilidade e baixa qualidade de execução (SANKARANARAYANAN; BUDUKH; RAJKUMAR, 2001; KITCHENER; CASTLE; COX, 2006). Alguns estudos vêm questionando os resultados falsos negativos cujas taxas podem variar de 2% a 50%, sendo questionado a validade desses testes nos programas de rastreamento do câncer do colo do útero (ARBYN et al., 2011; AMINISANI; ARMSTRONG; CANFELL, 2013). Alguns autores defendem a substituição do exame citopatológico ou mesmo a associação com testes moleculares para a detecção do DNA de HPV de alto risco oncogênico (GRAVITT et al., 2010). Estudos no Amazonas vêm utilizando testes moleculares associados à citologia em meio líquido em mulheres de rastreio, outros utilizam novas ferramentas para o auxílio da detecção do HPV (SALES, 2015; MARINO, 2015).

Quanto ao histórico familiar de câncer das mulheres estudadas, quando perguntadas se tiveram algum familiar com câncer do colo do útero 26,2% responderam que sim. Essa resposta demonstra o quanto que a doença atinge o cotidiano das mulheres do Amazonas onde, de acordo com os dados de óbitos da FCECON, no ano de 2016 ocorreu um total de 253 mortes por câncer do colo do útero (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) .

Nas pacientes estudadas 30,9% tinham um diagnóstico de neoplasia intraepitelia de grau III, o tipo histológico mais frequente não foi possível determinar, devido a falta de informação nos laudos histológicos.

Já nas pacientes estudadas que tiveram um diagnóstico de carcinoma invasor, o tipo histológico mais frequente observado foi o CEC (52,4%), seguido do ADC (14,3%) e ASC (2,4%). Dados parecidos foram obtidos em um estudo realizado com 104 pacientes com diagnóstico de câncer cervical no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e Hospital de Câncer de Barretos, aonde o tipo histológico mais prevalente foi o CEC (81,7%), seguido do ADC (15,4%) e de outros tipos (2,9%) (OLIVEIRA, 2011). Outro estudo realizado no município de Manaus-AM com 164 mulheres com lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero na FCECON-AM, o tipo histológico mais encontrado foi CEC (13,7%) seguido do ADC (2,0%) o restante eram lesões pré-malignas (HSIL e LSIL) (FERREIRA, 2007). Outro estudo realizado com 95 casos de mulheres com câncer do colo do útero, mostrou que (76,8%) tinha CEC, (23,2%) tinham adenocarcinoma endocervical (CARVALHO, 2016).

Estes dados histológicos corroboram com a literatura, que enfatiza que as principais categorias histológicas de carcinomas invasores do colo do útero são o Carcinoma de células escamosas (CEC) representando aproximadamente 90% dos casos de câncer do colo do útero, e o adenocarcinoma cervical (ADC) representando 10% dos casos (WHO, 2012; INCA, 2014; WHO, 2014). Os ADC são considerados tipos histológicos raros, estudos realizados no Brasil mostram uma taxa menor de ADC, em Manaus encontraram 2,0% de ADC (FERREIRA, 2007), em Recife a taxa encontrada de ADC foi de 6,8% (LORENZATO et al., 2000), Belém 3,2% e em São Paulo 4,5% (ELUF-NETO et al., 1994). Em nosso estudo encontramos uma taxa bem maior do que as estudos citados, assim como em outro estudo com 104 mulheres com diagnóstico de câncer do colo do útero, foi encontrado 15,4% de ADC (OLIVEIRA, 2011).

Neste estudo observou-se um caso particular de carcinoma adenoescamoso (ASC) que correspondeu a 2,4% da população estudada. O ASC é um tipo histológico que se apresenta com diferenciação glandular e escamosa variável. Em um estudo epidemiológico multinacional realizado com 3.626 mulheres na Europa diagnosticadas com carcinoma invasor, 2,7% foram diagnosticadas com ASC (HOLL et al., 2015). Em outro estudo realizado com mulheres com faixa etária acima de 18 anos na Nova Zelândia diagnosticadas com ICC, 3,1% tiveram o ASC (SYKES et al., 2014).

A paciente com ASC descrita neste estudo é proveniente de uma comunidade ribeirinha do município de Coari-Amazonas. Já havia sido submetida à conização e seu laudo patológico

apresentou o tipo histológico de carcinoma Adenoescamoso. Na ocasião havia sido feita a pesquisa do DNA do HPV mas não tinha sido possível a determinação do genótipo viral. A mulher, então foi submetida a histerectomia total ampliada e da peça cirúrgica foi realizado o teste INNO-LIPA HPV (Innogenetics, Ghent, Bélgica) e detectou-se a presença do HPV 18.

Para a determinação do estágio clínico da neoplasia invasiva, a comunidade científica utiliza convencionalmente o sistema FIGO. Nas pacientes estudadas, foi determinado o estadiamento das pacientes com carcinomas invasores e observou-se que a maioria estava no estágio IB1. De acordo com as condutas de tratamento para neoplasia de colo de útero, para os estádios I, IA, IA1,IA2 pode se realizar a cirurgia, radioterapia, ou até mesmo combinação de ambos os tratamentos. Nos estádios IB e IIA o tamanho do tumor é um fator relevante na escolha do tratamento primário, ou seja, é o tamanho da lesão que irá dizer se será feito a cirurgia combinada com radioterapia ou somente radioterapia. Nos estádios IIB, IIIA, IIIB, IVA a recomendação é que pode ser realizado um tratamento cirúrgico paliativo, dependendo da indicação de cada paciente mais a radioterapia (mas cada paciente é avaliado devido suas condições clínicas). E por fim o estágio IVB ainda é muito controverso sendo indicado quimio/radioterapia e cirurgias paliativas de acordo com cada caso (BRASIL, 2000) (PECORELLI; ZIGLIANI; ODICINO, 2009). Neste estudo, a população incluiu pacientes que foram submetidas a histerectomia como tratamento.

Os dados deste estudo demonstram que a maioria das pacientes estudadas submetidas à cirurgia encontrava-se no estadiamento I. Em Recife 37,3% das pacientes apresentam-se no estadiamento III, e em outro estudo realizado em São Paulo 34,6% das mulheres apresentavam-se no estadiamento II, sugerindo que no Amazonas o diagnóstico é feito tardiamente (LORENZATO et al., 2000; OLIVEIRA, 2011). A realidade apresentada na FCECON, mostra que aproximadamente 80 % das mulheres chegam ao serviço com estadiamento avançado e não tem indicação cirúrgica para tratamento (sendo encaminhados para tratamento por quimio e/ou radioterapia) demonstrando que ainda existe a dificuldade no acesso ao diagnóstico precoce do câncer do colo do útero.

Neste estudo observou-se 3 pacientes com estadiamento IIB, IIIB e IVB sendo considerados avançados. De acordo com as condutas do INCA (2014), a decisão de realizar cirurgia é feita de acordo com a condição clínica da paciente, e a mesma é considerada paliativa. Entre estas três pacientes em questão, observou-se que apenas uma realizava o preventivo de ano em ano, e ainda assim foi diagnosticada com estágio IIB. A outra paciente relatava que fazia o preventivo a cada dois anos, pois não tinha nenhum sintoma e simplesmente se acomodou. E por último a terceira paciente com estadiamento IVB que nunca realizou o

preventivo, e ao realizar já foi diagnosticada com carcinoma invasor e com quadro metastático. Mais uma vez, esses dados demonstram falhas no sistema de rastreio provocando situações dramáticas em que o diagnóstico do câncer já é feito em estágios avançados da doença.

Apesar do câncer do colo do útero ser um tumor que se apresenta com maior potencial de prevenção e cura, é necessário que o diagnóstico seja feito precocemente. Além disso, é imprescindível eficiência na cobertura dessas mulheres no rastreio, frequência de realização dos preventivos, qualidade dos exames citológicos, coleta, interpretação das amostras e o tratamento adequado para cada paciente mediante seu diagnóstico (CASARIN; PICCOLI, 2011). Quando existem essas ações, é mais fácil a detecção inicial evitando assim a mortalidade deste câncer.

Portanto, o estadiamento FIGO também é importante para definição do prognóstico e sobrevida das pacientes, como mostrado em nossos resultados. Estudos mostram que estadiamento 0 e I tem um bom prognóstico e a sobrevida das pacientes é significativa (CUSCHIERI et al., 2014), já para mulheres com estádios III e IV a prognóstico e a sobrevida ficam comprometidos (MEIRA et al., 2014). No atual estudo não foi avaliada a taxa de sobrevida das pacientes, porém estudos já relatam que as taxas de sobrevida são diferentes em países desenvolvimento e naqueles que estão em desenvolvimento, e que o principal fator que contribui para isso é a detecção precoce (NAKAGAWA et al., 2011). Entre as pacientes incluídas no atual estudo e que mantiveram o seguimento no hospital, nenhuma foi a óbito.

A taxa de positividade para HPV encontrada neste estudo foi de 88,1%. Um estudo realizado com 647 mulheres, em hospitais de Tokyo, com diagnóstico de NIC II, NIC III e ICC, utilizando as metodologias de PCR (PGMY 09/11) e métodos de hibridização encontrou nos casos de NIC III uma prevalência de 98,8% e nos casos de ICC de 87,9% (AZUMA et al., 2014). Outro estudo realizado em São Paulo com 172 mulheres (metodologia Linear Array HPV genotyping) encontrou uma prevalência de 98,8% para HPV (DE OLIVEIRA et al., 2013). Nossos dados corroboram com vários estudos nos quais houve uma alta taxa de prevalência para o HPV (LEVI et al., 2004; FERREIRA J., 2007; LIRA et al., 2010; ORTEGA-CERVANTES et al., 2016; LOYA et al., 2016).

Dentre as amostras positivas, os genótipos mais encontrados do HPV foram: HPV16 (70,3%), seguido pelo HPV18 (21,6%). Quando comparamos com estudos realizados no mundo, os tipos de HPV mais frequentes são HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 58 (MUÑOZ et al., 2003; DE SANJOSE et al., 2010), sendo o HPV 16 sempre o mais frequente nos carcinomas invasores (DE OLIVEIRA et al., 2013; SYKES et al., 2014; NOWAKOWSKI et al., 2015;

MARTINS et al., 2016; MA et al., 2017), assim como também o mais frequente nas pacientes com NIC III (AZUMA et al., 2014 ; WANG et al., 2017; DE BROT et al., 2017).

Uma única amostra de mulher submetida a histerectomia por apresentar resultado histopatológico de NICII, foi positiva para HPV 06 exclusivamente. Sabe-se que a persistência da infecção por HPV de alto risco é a principal causa para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, sendo o HPV 16 e HPV 18 os responsáveis pela grande maioria dos casos de câncer do colo do útero (KREIMER et al., 2011). O HPV 06 é considerado um tipo de baixo risco para o desenvolvimento do câncer (MUÑOZ et al., 2003). No entanto, neste caso a paciente foi diagnosticada com coinfeção por HIV e EBV. Sugerindo que a presença destes outros vírus, podem ter potencializado o risco para lesões do HPV de baixo risco. Em estudo que investigou a correlação da infecção de herpes vírus com HPV 16 em casos de câncer cervical e lesões pré-cancerosas, detectou que em 22% das pacientes tinham coinfeção por EBV, encontrando uma maior frequência do EBV em pacientes com câncer ($P < 0.006$) (SZOSTEK et al., 2009). Até o momento, ao analisarmos o prontuário da paciente, ainda não tínhamos novos dados do seu histopatológico, para assim podermos relatar o desfecho clínico dessa paciente.

Quanto ao HPV de baixo risco detectado, um estudo realizado detectou o mesmo HPV e o considerou como um evento raro, que a presença deste HPV pode induzir o câncer em circunstâncias raras, como é o caso de nossa paciente, sendo HIV positiva e EBV positiva, porém são necessários outros estudos para afirmar essa relação (DE SANJOSE et al., 2010). Em um caso clínico publicado, uma mulher de 38 anos, HIV positiva, tinha câncer do colo do útero, e tinha infecção única pelo HPV 11, também considerado um HPV de baixo risco e exclusivamente encontrado em lesões benignas, demonstrando que a infecção por esse tipo de HPV é rara e pouco se sabe sobre o mecanismo carcinogênico desse genótipo em câncer cervical (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Em duas amostras deste estudo não foi possível determinar o genótipo do HPV, pois foram negativas para HPV 16 e 18 (PCR em Tempo Real) e negativas no PapilloCheck®, mas positivas na PCR genérica (PGMY09/11). Este fato pode se dar por limitação metodológica ou pela utilização de amostra não representativa da lesão. Um estudo que tinha como objetivo investigar as possíveis falhas de testes de detecção de DNA de HPV em carcinomas cervicais, encontrou 5 amostras negativas no PapilloCheck®, porém positivas nos outros ensaios, sugerindo que deleções de grandes fragmentos não estão presente no gene E1 dessas amostras, porém ao gerarem sequencias com qualidade não observaram nenhuma deleção que justificaria o resultado negativo no PapilloCheck® (OLIVEIRA, 2011). Portanto, para determinação do genótipo desses HPV seria necessário a utilização de outras metodologias.

Quanto a infecções múltiplas por outros genótipos de HPV, não foi possível determinar pois o fluxo metodológico no trabalho foi definido apenas para realizar o teste PapilloCheck® (que permitiria a determinação de vários genótipos) caso a amostra fosse negativa para HPV 16 e 18. A prevalência da infecção por EBV na amostra estudada foi de 16,7% e a coinfeção por HPV e EBV foi de 16,3%. Além disso observou-se o caso de tripla infecção, já descrita anteriormente, de HPV 06, EBV e HIV. A presença do HIV aumenta a probabilidade de obter a infecção por HPV, devido a imunodeficiência causada pelo HIV (PALEFSKY 1999). Em um estudo realizado com pacientes HIV positivas em São Paulo encontrou uma alta prevalência de mulheres com HPV e HIV (LEVI,2004). A coinfeção entre o EBV e o HPV, está descrita na literatura como sendo, responsável por 38% a 64,4% de todos os casos de câncer cervical, porém ainda não está compreendida (SHI et al., 2016). Estudos mostram que o impacto de uma coinfeção do EBV com HPV de alto risco ainda não foi totalmente compreendida (KHENCHOUCHE et al., 2013).

Quanto ao tipo histológico e o genótipo encontrado, o HPV16 foi o mais prevalente nas mulheres com NIC III e mulheres que tinham carcinoma de células escamosas, concordando com dados encontrados em diversos estudos. Em um estudo realizado com 3.162 mulheres diagnosticadas com CC em um estudo multicêntrico 94,2% foram HPV positivos para CEC (NOWAKOWSKI et al., 2015).

Quanto a distribuição da média de idade em relação aos genótipos do HPV, observou-se que os casos de HPV 16 e HPV 18 as mulheres são mais velhas em relação as que apresentam os demais genótipos, dados estes que estão de acordo com as estimativas de lesões precursoras ou dos casos de ICC (SAFAEIAN et al., 2009; DE SANJOSE et al., 2010). Os genótipos indeterminados mostraram-se com intervalos maiores, porém não há como concluir algo pois a quantidade era pequena desses genótipos.

Quanto a distribuição da média da idade e da presença do HPV e o status patológico das mulheres observou-se que as mulheres mais velhas tinham diagnóstico de câncer cervical e presença do HPV. Esses dados corroboram com a história natural do câncer, em que mulheres com idades mais avançadas, acima de 40 anos e que são infectadas por HPV, apresentam um risco maior de desenvolver o câncer, diferente das mulheres mais novas (POWELL et al., 2011). Assim como os dados mostrados das pacientes com NIC III tiveram uma média de idade de 47,2 anos.

Neste estudo observou-se 5 casos (11,9%) em que não foi possível detectar o HPV podendo ter sido por resultados falso-negativos. Dessas amostras negativas 4 eram carcinomas

invasores (3 CEC e 1 ADC) e 1 amostra era NIC III. Em um estudo realizado com 104 amostras de tumor do colo do útero analisadas pelo ensaio Linear Array HPV Genotyping Test (LA), apenas 1 amostra apresentou resultado negativo para HPV, e esta era um adenocarcinoma (OLIVEIRA, 2011). Estudos mostram que uma taxa menor de positividade para HPV pode ser vista em casos de ADC quando comparados a CEC (DE SANJOSE et al., 2010). No atual estudo, visando encontrar algum erro laboratorial, foram extraídas novas amostras, as quais passaram pela amplificação do DNA endógeno (todas positivas), e todas as técnicas do estudo repetidas. Ainda assim, continuaram negativas. Essa negatividade pode ser devido a sensibilidade insuficiente das metodologias usadas, como o alvo utilizado, fazendo com que o HPV nessas amostras não seja detectado, ou pode estar relacionada a representatividade da amostra coletada e a região da lesão em que ela foi coletada. (HERRINGTON, 1999).

7 Conclusão

A taxa de prevalência do HPV na população de mulheres com lesão intraepitelial de grau 3 (NIC III) e de carcinomas invasores submetidas a histerectomia total ampliada na Fundação CECON foi de 88,1%.

Das 42 pacientes estudadas 69,1% eram diagnosticadas com carcinomas invasores e (30,9%) com NIC III.

Os genótipos mais frequentes nas duas populações foram o HPV16 (70,3%) e HPV18 (21,6%).

A infecção por HPV de baixo grau (HPV 06 exclusivamente) co-infectado por EBV e HIV pode ter sido responsável por provocar lesão de alto grau (NICIII), evidenciando que um HPV de baixo risco pode também levar ao desenvolvimento do câncer do colo do útero, porém ainda são necessários mais estudos para confirmar essa relação.

A idade das pacientes com NIC III e carcinoma invasor está relacionada com a presença do HPV.

A frequência de co-infecção do HPV e do EBV foi de 16,7% e de HIV foi de 2,6%.

O tipo histológico mais encontrado nas mulheres com carcinoma invasor de colo de útero foi o de carcinoma de células escamosas (CEC) com 52,4%, seguido do adenocarcinoma 14,3% e adenoescamoso (4%).

Quanto a classificação FIGO das pacientes com carcinoma invasor a maioria (23,8%) estava no estadiamento IB1, seguido do IA2 e IB2 com 7,1%, IA,IA1,IB,IIA ambos com 4,8% e por fim 2,4% das pacientes foram classificadas com estadiamento IIB,IIB e IVB.

Mulheres com HPV 16 tiveram uma média de idade 51,9 anos. Mulheres infectadas com HPV 18 tinham idade média de 46,5 anos.

O status patológico e resultado do HPV, observou-se que as mulheres positivas para HPV diagnosticadas com carcinoma invasor tiveram a média de idade de 51,5 e as diagnosticadas com NIC III tiveram uma média de idade de 47,2.

8 Perspectivas e desdobramentos do estudo

Será realizado estudo detalhado do caso clínico da paciente HPV 06, EBV e HIV positivo a fim de tentar analisar outros fatores que possam estar envolvidos no processo de oncogênese deste caso. Assim será possível discutir melhor o caso em questão.

Será desenvolvido um estudo para investigar a associação entre as características genéticas do HPV 16 e a classificação histológica dos tumores de colo de útero das pacientes deste estudo, para poder correlacionar com dados obtidos em outros estudos.

9 Referências Bibliográficas

AGGARWAL, P. Cervical cancer: Can it be prevented? **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 775, 2014.

AMARO-FILHO, S. M. et al. **A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort PLoS One**, 2013. Disponível em: <internal-pdf://204.193.38.59/Amaro-Filho-2013-A comparative analysis of cli.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591395/pdf/pone.0057810.pdf>

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **AJCC Cancer Staging Handbook**. [s.l: s.n.].

AMINISANI, N.; ARMSTRONG, B. K.; CANFELL, K. Uptake of liquid-based cytology as an adjunct to conventional cytology for cervical screening in NSW, Australia: a cross-sectional and population-based cohort analysis. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1196, 2013.

ARBYN, M. et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 12, p. 2675–2686, 2011.

AYRES, A. R. G.; AZEVEDO E SILVA, G. **Cervical HPV infection in Brazil: Systematic review** *Revista de Saude Publica*, 2010.

AZUMA, Y. et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 44, n. 10, p. 910–917, 2014.

BANKS, L.; PIM, D.; THOMAS, M. Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p. 877–886, 2012.

BERRAHO, M. et al. HPV and cofactors for invasive cervical cancer in Morocco: a multicentre case- control study. **BMC Cancer**, v. 17, n. 435, p. 1–9, 2017.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 55, n. 4, p. 244–65, 2002.

BRASIL. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. [s.l: s.n.].

BRASIL, N. Câncer do colo do útero. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 351–354, 2000.

- BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 52–61, 2006.
- BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 232–243, 2013.
- CARVALHO, K. Estadiamento, Genótipos De Hpv E Metilação Do Gene Wif1 Em Câncer Do Colo Do Útero: Associações Com O Prognóstico E Sobrevida. p. 84, 2016.
- CASARIN, M. R.; PICCOLI, J. DA C. E. [Education in health for prevention of uterine cervical cancer in women in Santo Ângelo, state of Rio Grande do Sul, Brazil]. **Ciência & saúde coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3925–32, 2011.
- CASTRO, M. M. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 186–196, 2011.
- CORRÊA, G. J. Prevalência do Papilomavírus humano (hpv) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino. **Dissertação de Mestrado**, v. UEA/ FMT-H, 2005.
- CUSCHIERI, K. et al. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 11, p. 2721–2726, 2014.
- DALSTEIN, V. et al. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 156, n. 1–2, p. 77–83, 2009.
- DE BROT, L. et al. Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. **Cancer Cytopathology**, v. 125, n. 2, p. 138–143, 2017.
- DE JONG, A. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5449–5455, 2004.
- DE OLIVEIRA, C. M. et al. HPV-11 associated metastatic cervical cancer. **Gynecologic oncology case reports**, v. 2, n. 1, p. 18–9, 2011.

DE OLIVEIRA, C. M. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC cancer**, v. 13, p. 357, 2013.

DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, 2010.

DE VILLIERS, E. M. et al. **Classification of papillomaviruses***Virology*, 2004.

DE VILLIERS, E. M. **Cross-roads in the classification of papillomaviruses***Virology*, 2013.

DOORBAR, J. **The papillomavirus life cycle***Journal of Clinical Virology*, 2005.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, 2006.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. SUPPL.5, p. F55–F70, 2012.

DOORBAR, J. et al. **Human papillomavirus molecular biology and disease association***Reviews in Medical Virology*, 2015.

DORAK, M. T. **Real-time PCR**. Disponível em: <<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>%0AReal-time>.

EGAWA, N. et al. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. p. 3863–3890, 2015.

ELUF-NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British journal of cancer**, v. 69, n. 1, p. 114–9, 1994.

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 research notes**, v. 3, n. 1, p. 96, 2010.

FERREIRA, J. DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV E DO POLIMORFISMO DA PROTEÍNA P53 EM PACIENTES COM LESÕES CERVICAIS ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO CENTRO DE CONTROLE DE ONCOLOGIA DO AMAZONAS. **Training**, p. 1–128, 2007.

FIGUEIREDO ALVES, R. R. et al. Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: a community-based study. **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, p. 1041, 2013.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357–361, 2000.

GRAVITT, P. E. et al. Effectiveness of VIA, pap, and HPV DNA testing in a cervical cancer screening program in a Peri-Urban community in Andhra Pradesh, India. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

HARPER, D. M.; DEMARS, L. R. Gynecologic Oncology HPV vaccines – A review of the first decade. 2017.

HERRINGTON, C. S. **Do HPV-negative cervical carcinomas exist? - Revisited** **Journal of Pathology**, 1999.

HOLL, K. et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 12, p. 2858–2868, 2015.

HORVATH, C. A. J. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology journal**, v. 7, p. 11, 2010.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Monograph**, v. 89, p. 223–276, 2007.

IBGE. **IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2015 Release**. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?src=NCBI&ictv_id=20095347%0Ahttp://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

INCA. **Inca 2014**. [s.l: s.n.].

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 2007.

KHENCHOUCHE, A. et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus co-infection in cervical carcinoma in Algerian women. **Virology journal**, v. 10, p. 340, 2013.

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of

cervical cytology screening. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, 2006.

KREIMER, A. R. et al. Efficacy of a bivalent HPV 16/18 vaccine against anal HPV 16/18 infection among young women: A nested analysis within the Costa Rica Vaccine Trial. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 9, p. 862–870, 2011.

LEUNG, C. O. N. et al. miR-135a leads to cervical cancer cell transformation through regulation of β -catenin via a SIAH1-dependent ubiquitin proteosomal pathway. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 9, p. 1931–1940, 2014.

LEVI, J. E. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, n. 1, p. 225–231, 2004.

LORENZATO, F. et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 10, n. 2, p. 143–150, 2000.

LOYA, A. et al. Human papillomavirus genotype distribution in invasive cervical cancer in Pakistan. **Cancers**, v. 8, n. 8, 2016.

MA, L. et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical lesions. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 2, p. 535–541, 2017.

MARCELLUSI, A. et al. Health utilities lost and risk factors associated with HPV-induced diseases in men and women: The HPV Italian collaborative study group. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 156–167, 2015.

MARINO, J. M. **Análise da estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.**
[s.l: s.n.].

MARKOULATOS, P. et al. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4426–32, 2001.

MARTINS, T. R. et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Virology journal**, v. 13, n. 1, p. 138, 2016.

MENDONÇA, V. G. DE et al. Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 10, p. 476–485, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SIM-Sistema de Informações de Mortalidade**. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=19465>>. Acesso em: 21 jul. 2017.

MOLIJN, A. et al. **Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections**. *Journal of Clinical Virology*, 2005.

MONNIER-BENOIT, S. et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*, v. 102, n. 1, p. 22–31, 2006.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*, v. 348, n. 6, p. 518–27, 2003.

NAKAGAWA, J. T. et al. Carcinoma do colo do útero: Taxa de sobrevida e fatores prognósticos em mulheres no Estado de Mato Grosso. *ACTA Paulista de Enfermagem*, v. 24, n. 5, p. 631–637, 2011.

NAKUBULWA, S. et al. Genital infections and risk of premature rupture of membranes in Mulago Hospital, Uganda: a case control study. *BMC research notes*, v. 8, p. 573, 2015.

NOWAKOWSKI, A. et al. HPV-Type Distribution and Reproducibility of Histological Diagnosis in Cervical Neoplasia in Poland. *Pathology and Oncology Research*, v. 21, n. 3, p. 703–711, 2015.

OGEMBO, R. K. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes among African women with normal cervical cytology and neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, v. 10, n. 4, p. e0122488, 2015.

OLIVEIRA, C. M. DE. Existe câncer cervical HPV negativo? 2011.

ORTEGA-CERVANTES, L. et al. Human papilloma virus genotypes in women from Nayarit, Mexico, with squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. v. 10, n. 3, 2016.

ORTIZ, A. P. et al. Cross-sectional study of HPV-16 infection in a population-based subsample of Hispanic adults. *BMJ Open*, v. 4, n. 2, p. e004203, 2014.

PATTERSON, N. A.; SMITH, J. L.; OZBUN, M. A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Journal of virology*, v. 79, n. 11, p.

6838–47, 2005.

PECORELLI, S.; ZIGLIANI, L.; ODICINO, F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 105, n. 2, p. 107–108, 2009.

PIERCE CAMPBELL, C. M. et al. Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: A case series within the HPV Infection in Men Study. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 4, p. 652–659, 2013.

POWELL, N. G. et al. The risk of cervical cancer associated with specific types of human papillomavirus: a case-control study in a UK population. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 128, n. 7, p. 1676–82, 2011.

RIBEIRO, A. A. et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, n. 1, p. 16, 2015.

SAFAEIAN, M. et al. Detection of precancerous cervical lesions is differential by human papillomavirus type. **Cancer Research**, v. 69, n. 8, p. 3262–3266, 2009.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 1985.

SALES, L. **CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR HPV EM MULHERES QUE REALIZAM EXAME DE RASTREIO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO DO MUNICÍPIO DE MANAUS.** [s.l: s.n.].

SANKARANARAYANAN, R.; BUDUKH, A. M.; RAJKUMAR, R. **Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries** *Bulletin of the World Health Organization*, 2001.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807–15, 2012.

SCHIFFMAN, M. et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3159–3169, 2010.

SCHIFFMAN, M. et al. **Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer** *Journal of the National Cancer Institute*, 2011.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E. The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2101–2104, 2005.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 20852, n. 31, p. 14–9, 2003.

SCHILLER, J. T. et al. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. **Vaccine**, v. 26, n. SUPPL. 10, 2008.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. **Current understanding of the mechanism of HPV infection** **Gynecologic Oncology**, 2010.

SERRAVALLE, K. et al. **[Comparison of two techniques for HPV genotyping in women with high-grade squamous intraepithelial lesion]** **Rev Bras Ginecol Obstet** , 2015. Disponível em: <internal-pdf://150.233.8.200/Serravalle-2015-[Comparison of two techniques.pdf%5Cnhttp://www.scielo.br/pdf/rbgo/v37n2/0100-7203-rbgo-37-02-00094.pdf>

SHI, Y. et al. **Co- infection of Epstein- Barr virus and human papillomavirus in human tumorigenesis** **Chinese Journal of Cancer**, 2016.

SILVA, J. et al. Oncogenic HPV types infection in adolescents and university women from North Portugal: From self-sampling to cancer prevention. **Journal of Oncology**, 2011.

SIMONATO, L. E. et al. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 10, p. 593–598, 2008.

STANLEY, M. A. **Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus** **Clinical Microbiology Reviews**, 2012.

STEENBERGEN, R. D. M. et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 395–405, 2014.

SYKES, P. et al. Type distribution of human papillomavirus among adult women diagnosed with invasive cervical cancer (stage 1b or higher) in New Zealand. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 374, 2014.

SZOSTEK, S. et al. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 337–342, 2009.

TANG, Y. et al. Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in

Southwest China : a cross-sectional five years study in non-vaccinated women. **Virology Journal**, v. 14, n. 84, p. 1–10, 2017.

VELÁZQUEZ, E.; PEIX, Á.; GÓMEZ-ALONSO, A. Microorganisms and cancer: Scientific evidence and new hypotheses. **Cirugía Española (English Edition)**, v. 89, n. 3, p. 136–144, 2011.

VEO, C. A. R. et al. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. **Tumor Biology**, v. 36, n. 7, p. 5399–5405, 2015.

VILLA, L. L.; DENNY, L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, n. Supplement 1, p. S71–S80, 2006.

VINK, M. A. et al. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: Estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1161–1169, 2013.

WANG, F. et al. A systematic investigation of the association between HPV and the clinicopathological parameters and prognosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 5, p. 910–917, 2017.

WHITHAM, H. K. et al. A comparison of the natural history of HPV infection and cervical abnormalities among HIV-positive and HIV-negative women in Senegal, Africa. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 26, n. 6, p. 886–894, 2017.

WHO. Comprehensive Cervical Cancer Control. **December 2014**, p. 364, 2014.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

ZHEN, S.; HU, C. M.; BIAN, L. H. Glutathione S-transferase polymorphism interactions with smoking status and HPV infection in cervical cancer risk: An evidence-based meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

ZHOU, F.; CHEN, J. Z.; ZHAO, K. N. Human papillomavirus 16-encoded E7 protein inhibits IFN- γ -mediated MHC class I antigen presentation and CTL-induced lysis by blocking IRF-1 expression in mouse keratinocytes. **Journal of General Virology**, v. 94, n. PART 11, p. 2504–2514, 2013.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat**

Rev Cancer, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

10 Apêndices

Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE

Convidamos a Senhora para participar da Pesquisa “Caracterização dos genótipos de HPV na população de rastreio e em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dra. Kátia Luz Torres Silva, Dra. Valquiria do Carmo e Dr. José Eduardo Levi, a qual pretende identificar as infecções pelo Papilomavírus humanos (HPV) mais frequentes na população de mulheres do Amazonas e também em mulheres que apresentam lesão de colo de útero.

Sua participação é voluntária e se dará respondendo a um questionário que será aplicado por um técnico de saúde além de coleta de material do colo do útero (o mesmo utilizado na rotina do exame preventivo de câncer de colo de útero ou da biopsia para exame citopatológico – quando houver indicação do seu médico). Caso a senhora seja selecionada para a avaliação do desempenho e aceitação de dispositivo para autocoleta receberá instruções para uso do material de coleta.

O material coletado será utilizado unicamente para os objetivos da pesquisa e serão encaminhados para realização de exames especializados para pesquisa e genotipagem do vírus HPV. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos sendo apenas pequeno incômodo no momento da coleta do material para o exame preventivo do câncer de colo de útero. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o benefício de ganhos no conhecimento sobre a infecção pelo HPV, sua caracterização e relação com o câncer de colo de útero no Estado do Amazonas.

Se depois de consentir em sua participação a Senhora desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa nem do seu tratamento ou atendimento no serviço de saúde. A Sra. não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

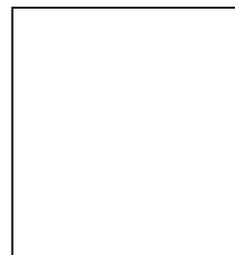
Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados em artigos científicos, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com os pesquisadores no endereço Rua Francisco Orellana, 215 – Planalto – Diretoria de Ensino e Pesquisa, pelo telefone (92) 36554774.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____,
fui informada sobre o que os pesquisador pretendem realizar e porque precisam da minha
colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto. Este
documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador,
ficando uma via com cada um de nós.

Manaus, ___/___/___

Assinatura da participante – Paciente



Impressão do dedo polegar

Apêndice II - Instrumento de coleta de dados epidemiológicos, sociodemográficos e de risco para a infecção pelo HPV.

Código no Projeto _____

Dados do estudo

1. Data da abordagem para o estudo: ___/___/___

2. Código de identificação da paciente: _____

Dados pessoais:

3. Iniciais da paciente: _____

4. Endereço para contato: _____

5. Telefone: _____

6. Celular: _____

7. Data de Nascimento: ___/___/___ 8. Município de Nascimento: _____

9. Estado: _____

12. Raça: () Branca () Parda () Negra () Indígena () Oriental

13. Estado civil: () Solteira () Casada () Viúva () Relação estável () Divorciada

Dados Sócio-demográficos:

14. Escolaridade: () Analfabeto () Fundamental incompleto () Fundamental completo
() Médio incompleto () Médio completo () Superior incompleto () Superior completo

15. Ocupação: _____

16. Renda familiar: () 1 salário mínimo () 2 – 3 salários mínimos () ≥ 4 salários mínimos

Dados comportamentais:

17. Com qual idade iniciou a atividade sexual: _____

18. Faz uso de camisinha na relação sexual: () Nunca () as vezes () Sempre

19. Se não utiliza, qual o motivo: _____

20. Usa ou usou algum método anticoncepcional (exceto camisinha)?

() Sim () Não Se sim, qual?

() Pílula (anticoncepcional oral) () Anticoncepcional injetável

() Dispositivo intra-uterino (DIU) () Tabela () Coito interrompido

() Outro Especificar: _____

21. Número de parceiros sexuais em um ano: _____

22. Quantos parceiros sexuais já teve ao longo de sua vida: _____

23. Número de filhos (paridade): _____ 24. Idade do primeiro parto: _____

25. Qual tipo de parto: () Normal () Cesariana

26. Teve algum aborto: () Sim () Não 27. Quantos: _____

Dados epidemiológicos:

28. Já é menopausada? () Sim () Não 29. Há quanto tempo? _____

30. Qual foi a data da sua última menstruação? ____/____/____

31. Já apresentou doenças sexualmente transmissíveis: () Sim () Não () Não sabe

32. Se sim, qual(is): _____

33. Já apresentou: Corrimento vaginal? () Sim () Não () Não sabe

Verruga? () Sim () Não () Não sabe

Ferida? () Sim () Não () Não sabe

34. Realiza exame preventivo de câncer de colo de útero com que frequência?

() Nunca realizou () 6 em 6 meses () 1 x ao ano () a cada 2 anos () mais de 3 anos

() Não sabe

35. Quais os motivos pelos quais não realizou o exame? () Inibição () Medo ()

Falta de tempo () Dificuldade de acesso () Outros

Especificar: _____

36. Já apresentou algum tipo de alteração nos preventivos anteriores? () Sim () Não
Qual? _____

37. Tem algum familiar que já apresentou câncer de colo de útero? () Sim () Não
Quem? _____

38. Teve algum familiar que já apresentou outro tipo de câncer? () Sim () Não Qual
tipo? _____

39. Se estiver apresentando queixas clínicas? () Sim () Não Quais são?

() Úlceras genitais () Dificuldade de urinar () Sangramento durante relações
sexuais () Corrimento vaginal () Coceira () Dor pélvica () Outras
Especificar: _____

40. A senhora fuma ou já fumou? () Sim () Não 41. Por quanto tempo? _____

42. Quantidade consumida de cigarros ao dia? _____

43. Fez uso de algum medicamento sistêmico nos últimos 3 meses? () Sim () Não

44. Qual? () Antibiótico () Antifúngico () Antiinflamatório () Analgésico
() Hiper/ Dia () Outro Especificar: _____

45. Conhecimentos à cerca do HPV:

() Nunca ouviu falar sobre HPV

() Informação sobre HPV em mídia eletrônica ou impressa

() Informação sobre HPV em instituição de ensino

() Informação sobre HPV em instituição de saúde

() Conhecimento de vacinas, tratamento sobre o HPV

() Conhecimento da associação do HPV com câncer de colo de útero

46. Quais as medidas que você conhece e que adota para prevenção do câncer de colo
de útero?

Dados Clínicos e Tratamento:

47. Estadiamento FIGO: _____

48. Tipo Histológico (laudo anato-patológico): _____

49. Qual tratamento a paciente será submetida: _____

Identificação do Colaborador: _____