MARIA LUIZA NOGUEIRA DIAS GENTA

**Genotipagem do Papilomavírus Humano (HPV) nos casos
de câncer do colo uterino do Instituto do Câncer do Estado
de São Paulo no período de 2008 a 2012.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Doutora em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Genta, Maria Luiza Nogueira Dias

Genotipagem do Papilomavírus Humano (HPV) nos casos de câncer do colo
uterino do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de 2008 a 2012 /
Maria Luiza Nogueira Dias Genta. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Jesus Paula Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias do colo do útero 2.Papillomaviridae 3.Técnicas de
genotipagem 4.Prognóstico 5.Sobrevida

USP/FM/DBD-221/16

DEDICATÓRIA

Ao meu querido e amado amigo, companheiro e esposo, Pedro.

Aos nossos queridos filhos, testemunhos de nosso amor, Felipe, Luiza e
Julia.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho, pela compreensão, confiança e apoio durante toda a minha trajetória junto ao Grupo de Ginecologia Oncológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Levi, chefe do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela orientação e incentivo durante todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, pela oportunidade de realizar este estudo junto ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Marcelo Abrantes Giannotti, pela inestimável ajuda e amizade durante todo o processo de seleção e preparo do material histopatológico no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Fernando Nalesso Aguiar, pela grande ajuda, mesmo à distância, no Setor de Anatomia Patológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Ao companheiro de trabalho na Fundação Oncocentro do estado de São Paulo, Toni Ricardo Martins, pela persistência e entusiasmo.

À equipe de técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a coordenação da Sra. Lucília Araújo de Oliveira Ribeiro, pela amigável convivência e prestimosa cooperação.

À Rossana Verônica Lopez Mendoza, minha amiga epidemiologista que tanto me ensinou nos últimos passos desse trabalho.

Aos colegas do Setor de Ginecologia Oncológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pelo constante apoio e colaboração.

Aos meus queridos pais, Mario e Maria Aparecida, pela dedicação, amor e incentivo ao longo de minha vida.

Às pacientes, motivo do meu amor à Medicina, responsáveis pela minha dedicação e entusiasmo diante deste grande desafio.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE GRÁFICO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	Papilomavírus.....	4
2.1.1	Propriedades Genômicas.....	4
2.1.2	Taxonomia	6
2.2	HPV	8
2.2.1	Biologia celular	10
2.2.2	Carcinogênese	12
2.2.3	Diagnóstico	13
2.2.3.1	Métodos não moleculares.....	13
2.2.3.1.1	Citopatologia	13
2.2.3.1.2	Colposcopia	14
2.2.3.1.3	Histopatologia	14
2.2.3.1.4	Imunohistoquímica.....	14
2.2.3.2	Métodos moleculares.....	15
2.3	CÂNCER DO COLO UTERINO.....	17
2.3.1	Epidemiologia.....	17
2.3.2	Rastreamento.....	19
2.3.3	Vacinação	21
2.3.4	Patogenia	22
2.3.5	Estadiamento	23
2.3.6	Fatores prognósticos.....	25
3	OBJETIVOS.....	26

3.1	Geral	26
3.2	Específicos	26
3.2.1	Analisar a associação entre os diferentes genótipos de HPV com:.....	26
3.2.2	Avaliar o genótipo do HPV como fator prognóstico para a sobrevida global.	26
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	27
4.1	Amostra populacional e parâmetros avaliados.....	27
4.2	Preparo do material anatomopatológico (AP).....	28
4.3	Genotipagem do HPV.....	29
4.4	Análise estatística.....	31
4.5	Aspectos Éticos	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Seleção da amostra estudada	33
5.2	Frequência e distribuição das variáveis analisadas	39
5.3	Genotipagem do HPV.....	48
5.4	Análise de sobrevida	60
5.4.1	Curvas de sobrevida	60
5.4.2	Sobrevida global	60
5.4.3	Modelo de regressão de Cox	77
6	DISCUSSÃO.....	83
6.1	Genótipos do HPV	83
6.2	Idade ao diagnóstico.....	85
6.3	Tipo histológico.....	87
6.4	Impacto na sobrevida	88
7	CONCLUSÕES.....	91
	ANEXO I – PARECER CONSUSBTANCIADODO CEP.....	92
	ANEXO II – CARTA DE COLABORAÇÃO DO IMT.....	93
	ANEXO III – QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DOS DADOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	94
	ANEXO IV – QUADRO DE FREQUÊNCIA DE TODOSOS GENÓTIPOS DO HPV NA POPULAÇÃO ESTUDADA	97
	ANEXO V - CURVAS DE SOBREVIDA GLOBAL PARA CADA HPV ESTUDADO	98

Figura 1A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV16 positivas e HPV16 negativas.....	98
Figura 2A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV18 positivas e HPV18 negativas.....	99
Figura 3A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV33-58 positivas e HPV33-58 negativas.	100
Figura 4A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV31 positivas e HPV31 negativas.....	101
Figura 5A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV45 positivas e HPV45 negativas.....	102
Figura 6A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV35-39-68 positivas e HPV35-39-68 negativas.....	103
Figura 7A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV56-59-66 positivas e HPV56-59-66 negativas.....	104
Figura 8A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV52 positivas e HPV52 negativas.....	105
Figura 9A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV51 positivas e HPV51 negativas.....	106
Figura 10A - Curva de sobrevida para as pacientes com estadiamento FIGO (2009) completo	107
REFERÊNCIAS.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Integração do genoma do HPV ao DNA do hospedeiro. Nas células do câncer do colo uterino, o DNA do HPV está frequentemente integrado. A integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro ocorre na região E1/E2 do genoma viral. Após a integração, a maioria dos genes do HPV não são expressos com exceção dos genes E6 e E7	5
Figura 2 - Árvore filogenética inferida utilizando os genes E1, E2, L1 e L2 dos 132 genótipos de HPVs conhecidos	8
Figura 3 - Organização do genoma do HPV 16.	9
Figura 4 - Biologia celular do HPV no epitélio cervical, demonstrando a progressão das alterações celulares com a persistência da infecção pelo HPV	12
Figura 5 - Descrição padronizada pelo ensaio BD Onclarity™	34
Figura 6 - Simbologia utilizada no laudo automatizado do sistema BD Onclarity™ para identificação dos genótipos. Abaixo estão descritos os genótipos passíveis de detecção pelo método. Os números representam os genótipos individuais de HPV (16, 18, 45, 31, 51 ou 52); P1, P2 e P3 representam os agrupamentos de genótipos de HPV (P1= HPV33 e/ou 58; P2= HPV56 e/ou 59 e/ou 66; P3= HPV35 e/ou 39 e/ou 68)	35
Figura 7 - Várias etapas da genotipagem das 446 amostras iniciais	36
Figura 8 - Critérios de seleção da população incluída no estudo.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - População final estudada e os diversos dados coletados em prontuário.	38
Tabela 2 - Frequência de queixas clínicas	43
Tabela 3 – Distribuição dos tipos histológicos conforme parâmetros prognósticos .	45
Tabela 4 - Duração e doses do tratamento radioterápico com ciclos de quimiossensibilização.....	47
Tabela 5 - Média etária ao diagnóstico para cada genótipo de HPV estudado.....	49
Tabela 6 - Dados dos tipos histológicos carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma e suas variáveis, distribuídos entre os genótipos de HPV mais frequentes.	56
Tabela 7 - Distribuição dos genótipos mais frequentes dos HPV's estudados conforme estadiamento.....	57
Tabela 8 – Distribuição dos genótipos mais frequentes dos HPV's estudados conforme tamanho do tumor, acometimento parametrial,metástase linfonodal, taxa e local de recidiva.....	59
Tabela 9 - <i>Status vital</i> dos pacientes ao final do estudo.....	60
Tabela 10 - Sobrevida global e taxa de sobrevida em 5 anos (em meses) para os HPV-, os HPV's dos genótipos mais frequentes (HPV16, 18, 33-58, 31, 45) e HPVoutros	66
Tabela 11 - Análise univariada para sobrevida em 5 anos, considerando os seguintes fatores de risco: faixa etária ao diagnóstico, estadiamento clínico, tamanho do tumor, metástase linfonodal e tabagismo.....	78
Tabela 12 - Análise univariada para sobrevida em 5 anos, considerando os seguintes fatores de risco: tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, invasão vascular	80
Tabela 13 - Análise univariada para sobrevida em 5 anos, considerando a presença do DNA HPV no tumor e o número de genótipos na mesma amostra, e a presença do HPV16, HPV18, HPVoutros e HPV-.....	80
Tabela 14 – Modelo I de regressão de Cox múltiplo para sobrevida global ¹	81
Tabela 15 - Modelo II de regressão de Cox múltiplo para sobrevida global ¹	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estadiamento do câncer do colo uterino – FIGO 2009(Pecorelli, 2009) 24

Quadro 2 - Dados sociodemográficos da população distribuídos conforme os genótipos de HPV estudados..... 52

Quadro 3 - Antecedentes pessoais da população estudada distribuídos conforme os genótipos de HPV estudados..... 53

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Distribuição Normal da idade ao diagnóstico	39
Gráfico 2 - Distribuição geográfica do local de nascimento	40
Gráfico 3 - Distribuição racial da população.....	41
Gráfico 4 - Distribuição da escolaridade na população	41
Gráfico 5 - Data da última coleta de citologia cérvico-vaginal anterior ao diagnóstico de câncer do colo uterino	43
Gráfico 6 - Distribuição dos estadios clínicos conforme classificação FIGO (2009)	44
Gráfico 7 - Distribuição dos tipos histológicos.....	44
Gráfico 8 - Distribuição dos casos de carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma conforme estadiamento FIGO	45
Gráfico 9 - Frequência da modalidade de tratamento adotado conforme estadiamento clínico.....	46
Gráfico 10 - Local e frequência das recidivas	47
Gráfico 11 - Frequência dos genótipos de HPV na população estudada.	48
Gráfico 12 - Distribuição da média etária ao diagnóstico entre os genótipos mais frequentes dos HPVs estudados	50
Gráfico 13 - Distribuição da mediana da idade ao diagnóstico entre os genótipos mais frequentes dos HPVs estudados	51
Gráfico 14 - Distribuição proporcional dos tipos histológicos mais frequentes conforme cada genótipo de HPV estudado.....	54
Gráfico 15 - Distribuição temporal dos tipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas nas pacientes infectadas pelo HPV16.....	55
Gráfico 16 – Distribuição dos genótipos de HPV conforme o estadiamento do câncer do colo uterino de acordo com as normas da FIGO (2009).	58
Gráfico 17 - Curva de sobrevida global para pacientes com câncer do colo uterino estudadas.	61
Gráfico 18 - Curva de sobrevida global conforme a presença ou ausência de um dos 14 HPVs genotipados.....	62
Gráfico 19 - Curva de sobrevida global conforme a presença de um único ou múltiplos genótipo de HPV na amostra tumoral.	63

Gráfico 20- Curva de sobrevida para pacientes conforme os genótipos dos HPV's mais frequentes.	64
Gráfico 21 - Curva de sobrevida para pacientes conforme os genótipos dos HPV16 e o agrupamento dos HPV's outros (HPV35-39-68, HPV52 e HPV56-59-66).....	65
Gráfico 22- Curva de sobrevida global conforme a presença do HPV16 ou HPV18.	67
Gráfico 23- Curva de sobrevida global conforme a distribuição entre as faixas etárias	68
Gráfico 24 - Curva de sobrevida global conforme os estadiamentos 1, 2, 3 e 4 (FIGO).	69
Gráfico 25 - Curva de sobrevida global conforme os tipos histológicos.....	70
Gráfico 26 - Curva de sobrevida global conforme a presença ou ausência da invasão vascular, ou não avaliável na amostra.....	71
Gráfico 27 - Curva de sobrevida global conforme a presença ou ausência da metástase linfonodal.	72
Gráfico 28 - Curva de sobrevida global conforme o tamanho do tumor.....	73
Gráfico 29 - Curva de sobrevida global conforme o grau de diferenciação tumoral	74
Gráfico 30 - Curva de sobrevida global conforme o tratamento submetido a paciente.....	75
Gráfico 31 - Curva de sobrevida global conforme o consumo de tabaco.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC - Adenocarcinoma

CEC – Carcinoma de células escamosas

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP – Desvio padrão

E1, E2, E4, E5, E6 e E7 – *Early regions 1-7* ou Regiões precoces 1-7

FIGO – *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

HPV – Papiloma Vírus Humano

HR – *Hazard Ratio*

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

IMT – Instituto de Medicina Tropical

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IV – Invasão vascular

LCR- *Long control region* ou Região regulatória

NIC – Neoplasia intraepitelial cervical

nm – Nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open reading frame*

pb – Pares de bases

p53 – Gene supressor tumoral

PCR – Reação de polimerase em cadeia

pRb – Gene do Retinoblastoma

qPCR – PCR em tempo real / PCR quantitativo

RNA – Ácido ribonucléico

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

cGy – Centigray

μM – Micromolar

ng – Nanograma

m^2 – metro quadrado

Kg – kilograma

mg - miligrama

mL – Mililitro

μL - Microlitro

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

μm - micrômetro

RESUMO

Genta MLND. *Genotipagem do Papilomavírus Humano (HPV) nos casos de câncer do colo uterino do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de 2008 a 2012* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O câncer do colo uterino é a terceira neoplasia maligna que mais afeta as mulheres brasileiras e, quando não detectada precocemente, apresenta prognóstico reservado. O câncer do colo uterino é consequência da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Pouco é conhecido sobre a influência dos genótipos do HPV na apresentação clínica e o seu impacto na taxa de sobrevida no câncer do colo uterino. Os objetivos do estudo foram identificar os genótipos de HPV no tecido tumoral da população atendida no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e associar os genótipos de HPV aos fatores de risco conhecidos para o câncer do colo uterino. **MÉTODOS:** Foram incluídas mulheres com diagnóstico de câncer do colo uterino atendidas no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) entre maio de 2008 e junho de 2012. A análise do material tumoral parafinado confirmou histologicamente o diagnóstico de câncer do colo uterino. O DNA tumoral foi extraído de três fragmentos de 10µm de espessura do bloco de parafina de carcinoma do colo uterino e submetido ao ensaio clínico Onclarity (sistema automatizado da BD Viper LT) para detecção e genotipagem do HPV. Idade ao diagnóstico, estadiamento clínico, tipo histológico e tempo de sobrevida foram obtidos a partir de registros do prontuário até dezembro de 2015. **RESULTADOS:** Foram analisadas 414 pacientes. As frequências dos genótipos estudados foram HPV16 (54%) HPV18(9%), HPV33-58 (6%), HPV45 (5%), HPV31 (3%), HPV39-68-35 (3%), HPV59-56-66(3%), HPV52 (2%) e HPVnegativo (14%). A idade da população estudada variou de 17 a 87 anos, com média etária de 50,8 (DP=13,8 anos). Os tipos histológicos foram carcinoma de células escamosas (75%), adenocarcinoma (21%) e outros tipos histológicos (4%). Conforme o estadiamento clínico adotado pela FIGO (2009), 35% foi classificado como 1A1, 1A2 e 1B1, 17% como 1B2 e 2A e 48% como 2B a 4B. O genótipo do HPV apresentou distribuição diferente quanto à idade ao diagnóstico, tipo histológico e estadiamento. A mediana do tempo de sobrevida global desta coorte de pacientes com câncer do colo uterino foi de 37 meses [12-53 meses]. A sobrevida global acumulada em 5 anos após o diagnóstico de câncer do colo uterino foi de 55%. Ocorreram 119 (38%) óbitos no período e 133 (42%) recidivas subdivididas em três grupos: local (12%), regional (30%) e à distância (58%). Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier e estatística de Log-rank demonstraram que os genótipos de HPV 16 e 18 (59%) não se relacionaram a um pior prognóstico em comparação com outros genótipos de HPV (41%) (P=0,17). Idade ao diagnóstico, estadiamento clínico, tipo histológico, invasão vascular, metástase linfonodal, tamanho do tumor e os genótipos HPV16, HPV18 e HPVoutros foram analisados individualmente em um modelo de regressão de Cox. O genótipo do HPV se associou a pior taxa de sobrevida global apenas quando detectado mais de um HPV no material tumoral analisado. **CONCLUSÃO:** Apesar das diferentes distribuições dos os genótipos do HPV quanto à idade ao diagnóstico, tipo histológico e estadiamento, o genótipo do HPV não se mostrou como fator prognóstico independente no câncer do colo uterino.

Descritores: neoplasias do colo do útero; papillomaviridae; HPV; técnicas de genotipagem; prognóstico; sobrevida.

ABSTRACT

Genta MLND. *Genotyping of Human Papillomavirus (HPV) in uterine cervical cancer patients of the Cancer Institute of the State of São Paulo in the period from 2008 to 2012* [Tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: Uterine cervical cancer is the third most common malignant neoplasm affecting Brazilian women. Prognosis is poor when diagnosis is delayed. Cervical cancer is a consequence of human papillomavirus (HPV) infection. Little is known about the influence of HPV genotypes in Brazil and its impact on cancer survival rate. The purpose of the present study was to identify HPV genotypes of tumoral tissue from the affected population and to examine the association between HPV genotype and traditional cervical cancer risk factors. **METHODS:** Women diagnosed with cervical cancer at the Cancer Institute of the State of São Paulo (ICESP) between May 2008 and June 2012 were included in the study. Tumor specimens were reviewed to confirm the diagnosis of cervical cancer. Tumor DNA was extracted from three 10µm-thick paraffin block fragments of each subject. HPV genotype was detected using the Onclarity system (BD Viper LT automated system). Age at diagnosis, clinical staging, histological type and survival time were obtained from the hospital electronic data records until December 2015. **RESULTS:** 414 patients were analyzed. The HPV genotypes studied were HPV16 (54%), HPV18 (9%), HPV33-58 (6%), HPV45 (5%), HPV31 (3%), HPV39-68-35 (3%), HPV59-56-66 (3%), HPV52 (2%) and HPVnegative (14%). The age of the study population ranged from 17 to 87 years, mean age= 50.8 (SD=13.8 years). Histological types were classified as squamous cell carcinoma (75%), adenocarcinoma (21%) and other histological types (4%). According to the 2009 FIGO clinical staging, 35% were classified as 1A1, 1A2 and 1B1, 1B2 and 17% as 2A and 48% as 2B and 4B. HPV genotypes showed different distributions regarding age, histologic tumor types and clinical staging. The median overall survival time was 37 months [12-53 months]. The cumulative overall survival at 5 years after diagnosis of cervical cancer was 55%. There were 119 (38%) deaths during the study period and 133 (42%) recurrences subdivided into three groups: local (12%), regional (30%) and distant (58%). Kaplan-Meier survival curves and Log-rank statistics showed that HPV 16/18 (59%) did not influence prognosis compared to other HPV subtypes (41%) ($P=0.17$). Age at diagnosis, clinical stage, histological type, vascular invasion, lymph node metastasis, tumor size and HPV16 genotypes, HPV18 and HPV others were individually analyzed in a Cox regression model. HPV genotype was associated with poorer overall survival rate only when multiple HPV infection was detected in the tumoral specimen. **CONCLUSION:** Although HPV genotype showed different distribution regarding age at diagnosis, histological type and clinical staging, HPV genotype was not an independent prognostic factor of cervical cancer in the study population.

Descriptors: uterine cervical neoplasms; papillomaviridae; HPV; genotyping techniques; prognosis; survivorship

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 80% dos casos novos de câncer do colo uterino no mundo ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, é o mais comum entre as mulheres.¹ O câncer do colo uterino é a terceira neoplasia mais comum no Brasil entre as mulheres e, quando não detectada precocemente, apresenta prognóstico reservado.² O câncer do colo uterino é consequência da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), podendo haver infecção por um genótipo (infecção única) ou por mais de um (infecção múltipla).³

É essencial conhecer os fatores que contribuem para a regressão, progressão e persistência da infecção do colo uterino pelo HPV, na perspectiva de identificar os grupos de maior vulnerabilidade e risco para a doença, e assim avançar em estratégias para sua prevenção e controle.⁴ Embora o potencial oncogênico de cada genótipo do HPV tenha sido bem estabelecido, sua significância prognóstica permanece controversa. Estudo comparando a taxa de sobrevivência das pacientes com um único genótipo de HPV identificado no material tumoral do colo uterino com as pacientes com múltiplos genótipos HPV não demonstrou diferença estatística entre os grupos.⁵ Os HPVs de alto risco oncogênico mais frequentes (HPV16, HPV18 e HPV45) foram relacionados a alguns fatores prognósticos já conhecidos como: idade ao diagnóstico, estadiamento clínico e tipo histológico.^{6,7} A relação da idade ao diagnóstico do câncer do colo uterino com os genótipos de HPV mais frequentes na população mundial demonstrou que os tumores associados ao HPV16, 18 ou 45 são diagnosticados em média quatro anos antes do que os associados a outros genótipos de HPV de alto risco oncogênico, independentemente do tipo histológico.⁸ Alguns

estudos encontraram um pior prognóstico nos estádios iniciais de câncer do colo uterino quando relacionados ao HPV18.⁹⁻¹¹ Diferentes genótipos do HPV também foram relacionados com os tipos histológicos, sendo os adenocarcinomas mais frequentemente associados aos HPV18 e HPV45 do que os carcinomas de células escamosas.^{12,13} Também foi descrito uma menor sobrevida nos casos de adenocarcinoma associados ao HPV45.¹⁴ De Cremoux *et al.*, relataram que genótipos do HPV de alto risco foram associados com menor taxa de sobrevida livre de doença em comparação com os genótipos de risco intermediário (HPV 31, 33, 35, 39, 52, 53, 58, 59, 73).¹⁵ No entanto, outros estudos não observaram nenhuma diferença na taxa de sobrevida global entre os genótipos de alto risco e risco intermediário.^{16,17}

No Brasil, um país com dimensões continentais, ainda são poucos os dados disponíveis relacionados aos genótipos de HPV predominantes em amostras tumorais de câncer do colo uterino para cada região e sua relação com as características clínicas da doença.¹⁸ Estudos avaliaram os genótipos de HPV em algumas áreas distintas, como Estado de Minas Gerais, região Nordeste, cidade de Cruz Alta (Rio Grande do Sul) e Estado de São Paulo. Os dados disponíveis desses estudos brasileiros mostraram um predomínio do HPV16, seguido de diferentes genótipos, como o HPV18, 33 e 31 em diferentes proporções.¹⁸⁻²² Em relação à idade ao diagnóstico do câncer do colo uterino com os genótipos do HPV, o HPV33 foi associado com idade mais avançada quando comparado com os outros genótipos do HPV estudados.²² Quanto à associação dos HPVs de alto risco (HPV16 e 18) com prognóstico, não foi observada qualquer relação em um estudo realizado na cidade de Goiânia.¹⁷

O presente estudo foi proposto para descrever os genótipos de HPV em casos consecutivos de câncer do colo uterino atendidos no Instituto do Câncer do Estado de

São Paulo (ICESP) a fim de se analisar fatores prognósticos relacionados nesta população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus

Os Papilomavírus (PVs) são causa de tumores benignos como papilas ou verrugas em seu hospedeiro natural. As lesões são observadas no epitélio escamoso estratificado da pele e mucosa. Diferentes PVs podem acometer locais específicos do corpo como pele e mucosa.²³⁻²⁵ As infecções causadas pelos PVs são frequentemente assintomáticas, e muitas vezes permanecem latentes. Vários estudos demonstraram que uma grande variedade de diferentes tipos de PVs foi detectada em locais aleatórios da pele saudável dos seres humanos e animais.^{26,27} Condições de imunossupressão em humanos levam à ativação de infecções latentes ou aumento da suscetibilidade à reinfecções, resultando em lesões ativas e visíveis.²⁸

2.1.1 Propriedades Genômicas

Os PVs são vírus compostos por uma fita dupla circular de DNA, com aproximadamente 8000 pares de bases.²⁹ Apesar do seu tamanho pequeno, a sua biologia molecular é complexa. Os genomas dos PVs incluem três regiões distintas: a região regulatória, conhecida como *long control region* (LCR), a região precoce, denominada *early region* (ER), e a região tardia ou *late region* (LR).³⁰

A LCR é formada por uma sequência de genes que controlam a replicação e transcrição viral. A ER é responsável pela codificação de proteínas com múltiplas funções, como, a transativação da transcrição, a transformação, replicação e a adaptação viral a diferentes meios celulares. A LR contém as áreas codificadoras das proteínas L1 e L2, responsáveis pela formação do capsídeo e empacotamento

seletivo do DNA viral. Tais proteínas são expressas apenas em células com infecção ativa.³⁰

A Figura 1 representa a integração do DNA do papilomavírus humano (HPV) ao DNA do hospedeiro. Esse evento parece ocorrer aleatoriamente por todo o genoma do hospedeiro, apesar de uma possível preferência por locais frágeis dos cromossomos. A integração do DNA do HPV ao DNA do hospedeiro frequentemente ocorre na região dos genes E1/E2 (ER). Após a integração do DNA do HPV, a maioria dos genes do HPV não é expressa, com exceção de E6 e E7. Durante a integração do genoma viral, há perda do gene E2 que, por sua vez, libera a expressão dos genes E6 e E7, facilitando a transformação celular.³¹

FONTE: Adaptado de Ghittoni R *et al.*, *Virus Genes* 2010; 40:1-13³¹

Figura 1 - Integração do genoma do HPV ao DNA do hospedeiro. Nas células do câncer do colo uterino, o DNA do HPV está frequentemente integrado. A integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro ocorre na região E1/E2 do genoma viral. Após a integração, a maioria dos genes do HPV não são expressos com exceção dos genes E6 e E7

2.1.2 Taxonomia

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), os Papilomavírus (PVs) pertencem à família *Papillomaviridae*. A classificação dos papilomavírus (PVs) é complexa e baseada em análises filogenéticas. A região genômica L1 dos PVs é a mais conservada, facilitando a detecção com *primers* genéricos, mas também possui trechos variáveis que permitem separar os genótipos. Por esse motivo é utilizada para a classificação.³²

Os PVs são classificados em gênero, espécie e tipo.³² Gêneros diferentes compartilham menos de 60% de identidade nas sequências nucleotídicas de L1, espécies do mesmo gênero compartilham cerca de 60% a 70% de identidade nessas sequências e os tipos pertencentes à mesma espécie compartilham cerca de 71% a 89% de identidade nas sequências nucleotídicas de L1.³²

Atualmente, os PVs estão divididos em 29 gêneros formados por 189 tipos isolados, sendo 120 tipos humanos, 64 tipos mamíferos não humanos, 3 tipos de aves e 2 tipos de répteis.³³ Para nomear os gêneros de PVs, utiliza-se o alfabeto grego. Os PVs que acometem os humanos são denominados HPVs e estão agrupados em cinco gêneros: *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Mu-papillomavirus* e *Nu-papillomavirus* (Figura 2).

Os principais HPVs relacionados com infecção de mucosa pertencem ao gênero *Alpha-papillomavirus*. Cerca de 100 tipos de Papiloma Vírus Humanos (HPV) tiveram o genoma completamente sequenciado.³² Destes, cerca de 40 tipos de HPV infectam a área genital.³⁴ Os *Alpha-papillomavirus* contém duas importantes espécies, as quais compreendem os principais tipos considerados de alto risco oncogênico: espécie 7 (HPV18, 39, 45, 59, 68) e espécie 9 (HPV16, 31, 33, 35, 52, 58, 67).³²

Os vírus que pertencem a uma mesma espécie geralmente compartilham propriedades biológicas e patológicas. Por exemplo, os PVs pertencentes à espécie nove do gênero *Alpha-papillomavirus*, denominados HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 e 67, são considerados de alto risco oncogênico, os quais estão associados a lesões malignas de mucosa.³²

Na Figura 2, os HPVs estão divididos em cinco grupos com diferentes tropismos epiteliais e associações à doença. Os PVs alfa (α) incluem os tipos de baixo risco para mucosa (muitos dos quais estão dentro do ramo sombreado laranja) que causam verrugas genitais, e os tipos de alto risco para a mucosa (contidos dentro do ramo destacado com rosa) que estão associados a câncer e neoplasias intra-epiteliais. O HPV que acomete a epiderme (contidos dentro da área sombreada cinza (α), verde (β) e azul (γ)) na maioria das vezes não está associado com cânceres. No entanto, alguns β -HPV foram associados ao desenvolvimento de cânceres de pele não melanoma em indivíduos imunossuprimidos e em pacientes portadores de *epidermodisplasia verruciforme*. Porém, seu possível papel na progressão do câncer na população em geral é discutível.³⁵

FONTE: Adaptado de Doorbar J *et al.*, *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F55-70³⁶

Figura 2- Árvore filogenética inferida utilizando os genes E1, E2, L1 e L2 dos 132 genótipos de HPVs conhecidos

2.2 HPV

Os HPVs são um grupo de vírus pequenos que medem 52 - 55 nm de diâmetro e não possuem envoltório.²⁹ Os HPVs envolvidos em infecções genitais são classificados, de acordo com a sua capacidade de gerar neoplasias malignas, em HPVs de baixo risco oncogênico (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) e de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59). Os tipos de HPV26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82 são classificados como genótipos de provável alto risco.^{24,37,38}

A organização do genoma do HPV16 é típica do grupo α -papilomavírus de alto risco (incluindo HPV18) e compreende uma região de controle longa (LCR) e oito

genes que são necessários para diferentes estágios do ciclo de vida do vírus. O LCR contém receptores para fatores de transcrição celular, bem como para as proteínas E1 e E2 virais que controlam a expressão de gene e replicação viral. O HPV16 tem dois promotores bem caracterizados, conhecidos como PE (promotor precoce; também conhecido como p97) e PL (promotor tardio; também conhecido como p670). Ambos promotores regulam a expressão de RNAm distintos durante a diferenciação epitelial (posição 97 e 670 no genoma HPV16). PAE e PAL indicam as posições de início e final do local de poliadenilação.³⁵ A Figura 3 indica a organização do genoma do HPV16.

FONTE: Adaptado de Bravo IG e Féliz-Sánchez M *Evolution, Medicine, and Public Health* 2015: 1:32-51³⁹

Figura 3 - Organização do genoma do HPV 16.

As proteínas E6 e E7 são comumente expressas nas células tumorais e relacionadas com a invasão tumoral. Estas duas proteínas estimulam a proliferação celular e interferem com as funções de proteínas supressoras de tumores, p53 e pRb (proteína do retinoblastoma).^{40,41}

2.2.1 Biologia celular

A infecção inicial pelo HPV ocorre nas células da camada basal do epitélio, onde o genoma do HPV permanece na forma epissomal no núcleo. Na divisão celular, uma das células filhas permanece na camada basal e fornece um reservatório de DNA viral e expressão do genes da LCR. Como o HPV necessita das enzimas celulares para replicar, uma consequência da infecção por esse vírus é o bloqueio da saída do ciclo celular. Células da camada suprabasal infectadas pelo HPV ficam em fase S incompleta para replicar o genoma do HPV em altas taxas. Nas camadas inferiores do epitélio ocorre o empacotamento e liberação das partículas virais⁴².

A maioria das infecções de HPV de alto risco regride espontaneamente sem gerar qualquer condição patológica. Em uma pequena porcentagem dos casos, a persistência da infecção viral leva ao desenvolvimento da doença inicial, denominada lesão de baixo grau ou neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau (NIC1). A lesão de baixo grau se caracteriza pela diferenciação anormal no terço superior do epitélio. A lesão regride ou progride para displasia grave, ou neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau (NIC2/3). As NICs 2/3 ainda podem regredir ou evoluir para o câncer do colo uterino. Este último estágio é associado a danos nos cromossomos das células hospedeiras que levam à ativação de oncoproteínas celulares e/ou neutralização de genes supressores de tumor. A frequência da integração do DNA do HPV aumenta

com a gravidade da lesão cervical. A maioria das células tumorais têm integrado o DNA viral ao seu genoma (Figura 1).³¹

A maioria das mulheres infectadas pelo HPV irá eliminar o vírus espontaneamente através de mecanismos imunológicos.⁴³ Habitualmente, a infecção por HPV é um fenômeno transitório em 90% dos casos, não sendo mais detectada após 36 meses.⁴⁴ Portanto, apenas uma pequena porcentagem das mulheres infectadas pelo HPV apresentará infecção persistente e estará sob risco de desenvolver câncer do colo uterino.⁴⁰ A infecção persistente por um HPV de alto risco oncogênico é necessária para o desenvolvimento de câncer do colo uterino. Entretanto, uma pequena parcela de mulheres, provavelmente por falha de mecanismos imunológicos, apresenta persistência da infecção, o que é necessário para provocar alterações atípicas no epitélio cervical e evoluir para transformação maligna.⁴⁵⁻⁴⁷ As mulheres que apresentam infecção persistente por HPV de alto risco constituem o verdadeiro grupo de risco para o desenvolvimento do colo uterino, com risco relativo de 100 a 300 vezes em relação àquelas nas quais a infecção não foi persistente (Figura 4).⁴⁸

FONTE: Adaptado de Crow MJ *Nature* 2012; 488(7413): S2-S3⁴⁹

Figura 4 - Biologia celular do HPV no epitélio cervical, demonstrando a progressão das alterações celulares com a persistência da infecção pelo HPV

2.2.2 Carcinogênese

As proteínas codificadas pelos oncogenes virais E6 e E7 virais são as 2 proteínas mais importantes na patogênese da doença maligna e atuam na regulação anormal do crescimento celular. Estas proteínas ligam-se às proteínas supressoras de tumor do hospedeiro, p53 e pRb. A proteína p53 do hospedeiro é um importante inibidor do crescimento celular. Quando E6 se liga ao p53, a célula hospedeira continua em divisão celular. O efeito anti-apoptótico resultante permite mutações cromossômicas sem mecanismos reguladores de reparação celular. Da mesma forma, a proteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb) do hospedeiro que normalmente interrompe o crescimento celular ou induz a apoptose em resposta ao DNA mutado. Quando há ligação da proteína E7 à proteína do retinoblastoma, permite-se que as células com DNA alterado cresçam continuamente. A presença

contínua da expressão de oncogenes E6 e E7 é necessária para sustentar a imortalidade das células tumorais.³¹

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HPV é realizado por meio de métodos não moleculares e moleculares. Os métodos não moleculares incluem inspeção visual, colposcopia, citopatologia e histopatologia. Esses métodos são considerados indiretos porque não detectam a presença do vírus, mas sim alterações citopatológicas e histopatológicas decorrentes da infecção viral. Os métodos moleculares são diretos e detectam a presença do genoma do HPV ou seus transcritos na amostra clínica.^{50,51}

2.2.3.1 Métodos não moleculares

2.2.3.1.1 Citopatologia

O exame citopatológico identifica alterações celulares benignas e malignas, sendo utilizado como teste de triagem. Testes citopatológicos são realizados a partir do exame microscópico do esfregaço cervical corado segundo a técnica de Papanicolaou. Tal técnica pode ser usada para identificar lesões pré-tumorais do colo uterino além das células tumorais. Essa técnica permitiu que a citopatologia fosse utilizada para prevenir o desenvolvimento de câncer do colo uterino ao invés de simplesmente detectar o câncer em estádios precoces.⁵² A principal evidência citológica de infecção pelo HPV é a coilocitose ou a atipia coilocitótica, que é a combinação de atipia nuclear e a formação de halo perinuclear.⁵³

2.2.3.1.2 Colposcopia

A colposcopia é um exame visual especializado do colo uterino, vagina e vulva que é indicado para a avaliação dos casos de citologia cervical alterada. Durante o exame, procuram-se áreas de epitélio suspeito para direcionar biópsia à procura de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas de câncer do colo uterino.

2.2.3.1.3 Histopatologia

O exame histopatológico da biópsia guiada por colposcopia da área suspeita é necessário para o diagnóstico e quantificação do grau da lesão. Desta forma, é definitivo para o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino. A extensão da atividade mitótica, proliferação celular imatura e da disfunção nuclear identificam o grau da neoplasia. A classificação histopatológica vigente é a que divide as lesões intra-epiteliais em três graus: alterações celulares ocupando o terço inferior do epitélio denominado NIC1; alterações ocupando dois terços do epitélio, denominado NIC2; e alterações celulares ocupando todo o epitélio, denominado NIC3. A partir da invasão estromal, as lesões são classificadas como invasivas.⁵⁴

2.2.3.1.4 Imunohistoquímica

O teste imunohistoquímico procura antígenos virais nos tecidos empregando anticorpos dirigidos para proteínas comuns aos papilomavírus através de conjugação com peroxidase ou substância fluorescente. Este teste apresenta sensibilidade limitada, pois as proteínas do capsídeo viral L1 e L2 são expressas apenas em infecções ativas. Por outro lado, as proteínas virais precoces são geralmente expressas em pequena quantidade no tecido infectado.⁵⁵ Por essas razões, optou-se pela detecção de proteínas celulares diferencialmente expressas em células

infectadas. Durante o processo de carcinogênese do câncer do colo uterino, a proteína E7 interage e degrada pRb, que resulta na liberação de E2F, que aumenta a expressão de p16^{INK4A}.^{56,57} Portanto, como a proteína p16^{INK4A} encontra-se aumentada nas infecções de HPV de alto risco oncogênico, esta está sendo usada para diferenciar infecções deste grupo com infecções por HPV de baixo risco oncogênico ou infecções latentes por HPV de alto risco.⁵⁸⁻⁶⁰

2.2.3.2 Métodos moleculares

Com os novos testes moleculares para detecção dos genótipos do HPV de alto risco oncogênico, foi possível identificar a população portadora deste subgrupo de HPVs, a qual deve ser considerada de risco para desenvolver no futuro o câncer do colo uterino. Estão disponíveis dois testes básicos para detecção do HPV: aqueles que reportam a detecção de genótipos de alto risco sem especificar quais, e aqueles que relatam a presença de mais de 40 genótipos, incluindo o HPV16 e HPV18, os quais são responsáveis por 70% dos casos de câncer do colo uterino. O genótipo do HPV é detectado através de testes de DNA viral, teste de RNA e através de marcadores celulares de HPV associados à transformação tumoral.⁶¹

Os testes que detectam o DNA do HPV são mais sensíveis que a citologia e podem determinar o genótipo viral envolvido na infecção. Técnicas de *Southern blotting*, hibridização *in situ*, Captura Híbrida® versão II (hc2, Digene, EUA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) foram empregadas em estudos epidemiológicos e clínicos (IARC, 2007). Estudos recentes indicam que o teste de HPV é a ferramenta de rastreio mais sensível para a detecção de NIC2 e NIC3, e câncer do colo uterino.⁶²

Dentre os testes de DNA, o HC2® (Qiagen, EUA; anteriormente Digene Corp), é um ensaio com amplificação de sinal baseado na hibridização do DNA de HPV alvo

com sondas de RNA marcadas para a detecção qualitativa do DNA de HPVs de alto e baixo risco oncogênico. O HC2[®] Identifica o genótipo de 13 HPVs de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68).⁶³ Com a mesma metodologia, também existe no mercado o teste Cervista HPV HR[®] (Hologic, EUA), que detecta HPV66 além dos 13 genótipos detectados pelo HC2[®], e o Cervista[®] (Cervista[®] 16/18) que detecta os genótipos de alto risco HPV16 e HPV18.

A reação de PCR apresenta alta sensibilidade e permite a detecção de menos de 10 cópias de DNA de HPV em uma amostra. A reação é baseada na amplificação da sequência alvo utilizando processo de termociclagem e *primers* tipos-específicos, desenhados para amplificar exclusivamente um único genótipo de HPV. Alternativamente, utiliza *primers* consenso, que permitem amplificar sequências de DNA de diferentes genótipos porque o alvo é uma região conservada do genoma do HPV. Após a realização de PCR utilizando *primers*, pode-se realizar a reação de sequenciamento genômico ou RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), para se determinar qual o genótipo de HPV que está causando a infecção. Esta reação é baseada na utilização de enzimas de restrição que digerem a sequência de DNA amplificado, gerando fragmentos de tamanhos diferentes que são visualizados através de eletroforese em gel de agarose.⁶⁴

A PCR em tempo real é uma técnica que realiza a detecção do sinal fluorescente de uma ou mais reações de PCR ao longo dos ciclos de amplificação. Atualmente, existem testes comerciais disponíveis que realizam a genotipagem do HPV por PCR em tempo real qualitativo de forma totalmente automatizada. Dentre eles o Cobas[®] 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems, EUA) e o BD Onclarity HPV Assay (BD Diagnostics, EUA) realizam desde o processo de extração do DNA até a montagem da reação, amplificação e detecção do DNA alvo através de PCR em

tempo real. O teste BD Onclarity HPV Assay (BD *Diagnostics*, EUA) identifica individualmente seis genótipos de alto-risco (HPV16, 18, 31, 45, 51 e 52) ao mesmo tempo em que detecta 8 genótipos de HPVs de alto risco, distribuídos por três grupos denominados pelo fabricante P1, P2 e P3 (P1: HPV33-58; P2: HPV56-59-66; e P3: HPV35-39-68).⁶⁵ O Cobas 4800® System (Roche Molecular Systems, USA), detecta individualmente o HPV16 e HPV18 e também fornece um resultado em pool para outros 12 genótipos de alto risco (HPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Ele é baseado no PCR em tempo real, técnica sensível capaz de detectar menos de 10 cópias de DNA do HPV na amostra.⁶⁶

Além de testes de genotipagem baseados na identificação do DNA do HPV, há também testes disponíveis que têm como alvo o RNAm dos oncogenes E6 e E7 de HPV de alto risco oncogênico como o Aptima HPV Assay (Gen-Probe, EUA) e o NucliSENS EasyQ® HPV (*bioMérieux*, France). Testes de RNAm, como Aptima mRNA® (Gen-Probe, EUA) são capazes de identificar os transcritos de RNAm E6 e E7 e detectar 14 genótipos de HPV alto risco. Este teste recebeu recentemente a aprovação da FDA para o teste de HPV cervical.

2.3 CÂNCER DO COLO UTERINO

2.3.1 Epidemiologia

A infecção genital pelo HPV é transmitida por contato sexual e está relacionada ao início precoce da atividade sexual, ao número de parceiros e ao comportamento sexual. A infecção pelo HPV em mulheres já está bem estabelecida como a principal causa de câncer cervical. A evidência do papel do HPV em outros cânceres

anogenitais (ânus, vulva, vagina e pênis) e cânceres de cabeça e pescoço têm aumentado.³⁴

Em todas as regiões do mundo, a prevalência da infecção pelo HPV é mais alta em mulheres com menos de 34 anos de idade, diminuindo no grupo dos 35 a 44 anos. Porém, a incidência de câncer cervical é mais alta na faixa etária dos 45 aos 54 anos⁶⁷, denotando a latência entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer. No Brasil, as taxas de prevalência da infecção genital pelo HPV em mulheres variam de 6,7% a 89% de acordo com a população estudada e o tipo de anomalias encontradas no teste citológico.⁶⁸⁻⁷⁸

A despeito de avanços do papel do HPV na etiologia do câncer do colo uterino, da prevenção primária e secundária, e de avanços no tratamento adjuvante do câncer do colo uterino, as estatísticas mundiais indicam mais de 500.000 novos casos e 275.000 mortes por câncer do colo de útero por ano.⁷⁹ A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê crescimento de 45% na taxa de mortalidade por essa neoplasia no período compreendido entre 2007 e 2030 (de 11.3 milhões para 15.5 milhões de óbitos), com maior incidência nos países em desenvolvimento (WHO, 2011).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou em 16.340 o número de casos novos de câncer do colo uterino para o ano de 2016, o que gera incidência estimada em 15,85 casos novos a cada 100.000 mulheres.⁸⁰ Conforme este informe, o câncer do colo uterino é o mais incidente na região Norte (23,97/100.000), o segundo mais incidente nas regiões Nordeste (19,49/100.000) e Centro-Oeste (20,72/100.000), terceiro no Sudeste (11,30/100.000) e quarto na região Sul (15,17/100.000), sem considerar os tumores de pele não-melanoma.⁸⁰ As diferenças regionais se expressam de forma semelhante na mortalidade proporcional. Em 2011, na região Norte, as mortes por colo uterino representaram cerca 17% de todos os

óbitos por câncer em mulheres, ocupando a primeira posição. No Nordeste ocuparam a segunda posição (9%) e no Centro-Oeste, a terceira (8,7%). No Sul e no Sudeste o colo uterino foi responsável por 4,6% e 4,4% dos óbitos por câncer respectivamente, percentuais correspondentes à sexta posição em ambas as regiões.⁸⁰

As taxas de incidência estimada e de mortalidade no Brasil apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento. Porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoce bem estruturados. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas de incidência (5,0 a 6,9 casos/100.000), enquanto países da África apresentam índices bastante elevados (26,8 a 33,7 casos/100.000).⁸¹ Segundo o *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN), cerca de 85% dos casos de colo uterino ocorrem nos países menos desenvolvidos. A mortalidade difere 18 vezes entre as diferentes regiões do mundo, com taxas de menos de 2/100.000 na Ásia Ocidental e de 27,6/100.000 na África Oriental.⁸²

Nos países desenvolvidos, observou-se uma drástica redução da prevalência de câncer invasivo do colo uterino graças ao amplo acesso populacional aos programas de rastreio.⁸³ Nestes países, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 59 a 69%. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, os casos são diagnosticados em estádios mais avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de 45 a 50% após cinco anos.⁸⁴ No Brasil, a falha no rastreamento de lesões pré-tumorais leva ao diagnóstico tardio e está associada a pior prognóstico do câncer do colo uterino.³⁶

2.3.2 Rastreamento

A citologia oncótica cérvico-vaginal (exame de Papanicolaou) permite a detecção precoce das lesões precursoras do carcinoma de colo uterino. O exame de Papanicolaou foi descrito em 1941 como um método diagnóstico simples e de baixo custo aplicável em larga escala para rastreamento populacional. Durante a década de 50, um programa de prevenção do colo uterino foi introduzido nos Estados Unidos utilizando a citologia oncótica cérvico-vaginal. Na década de 40 a mortalidade por câncer do colo uterino era de 15/100.000 mulheres, com o rastreamento, essa taxa caiu para 2,9/100.000 mulheres nos anos de 1997 a 2001.⁸⁵ Países como Finlândia, Suécia, Dinamarca e Islândia obtiveram uma queda de mais de 50% das taxas de incidência dessa neoplasia. A partir de então, o rastreamento do colo uterino através da citologia cérvico-vaginal periódica pela técnica de Papanicolaou foi adotado globalmente.⁸⁶ Tal prática reduziu a mortalidade e a incidência do câncer do colo uterino em até 75%. Entretanto, esta eficácia não foi reproduzida na América Latina, onde a cobertura é reduzida, a qualidade do método é inadequada, gerando falso-negativos e o acesso ao tratamento adequado é limitado.⁸⁷ Por esses motivos, as taxas de colo uterino na maior parte dos países da América Latina permanecem entre as mais elevadas do mundo.⁸⁸

No Brasil, o Ministério da Saúde implantou desde 1998, o programa nacional de controle do câncer no colo uterino e da mama denominado “Viva Mulher”, que visa a reduzir as taxas de morbimortalidade por estas neoplasias.⁸⁹ Este programa recomenda o exame citopatológico para o rastreamento do câncer do colo uterino em mulheres dos 25 aos 64 anos de idade. Após 2 exames anuais consecutivos negativos, é recomendado controle trienal.⁸⁹ No entanto, estudo realizado com 2300 mulheres (entre 15 e 65 anos) nas cidades de São Paulo e Campinas mostrou que 86,5% das pacientes com alterações citológicas cérvico-vaginais e 92,8% das

pacientes com alterações histológicas de tecido cervical haviam feito exame citopatológico cujo resultado foi normal em período inferior a três anos. Estes dados revelaram falhas no programa que vão desde a técnica da coleta, análise da citologia e no seguimento das pacientes.⁹⁰

2.3.3 Vacinação

Desde 2006 encontra-se disponível a vacina bivalente contra o HPV 16 e 18. Estes dois genótipos do HPV são responsáveis por 70% dos casos e são os dois mais os mais prevalentes em todas as regiões geográficas.^{8,13,91} Os demais tipos de HPVs apresentam diferenças geográficas na sua frequência. O HPV45 é o terceiro mais prevalente na África, Ásia Central/Ocidental, América do Norte e Oceania. Na América Central, América do Sul e Europa o terceiro mais prevalente é o HPV 31.^{13,92} No Brasil, os tipos mais comuns são 16, 18, 33 e 31.⁴ A vacina quadrivalente, a qual tem cobertura para os HPVs 6, 11, 16 e 18 foi disponibilizada mais recentemente, porém os genótipos 6 e 11 estão relacionados a verrugas genitais e tem baixo risco oncogênico.⁹³

Programas de vacinação populacional foram adotados em diversos países do mundo e seus benefícios serão contabilizados nos próximos 10 anos.⁹⁴ Em 2014, o Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro lançou uma campanha nacional para imunizar meninas de 11 a 13 anos contra o HPV. A vacina aplicada no Brasil é a quadrivalente, recomendada pela Organização Mundial da Saúde. A partir de 2016, o Ministério da Saúde recomenda que a adolescente seja submetida a duas doses da vacina, sendo a segunda seis meses depois da primeira dose.⁹⁵

Acredita-se que a vacina terá um impacto nas futuras incidências mundiais de câncer do colo uterino.⁸ Porém, 30% dos carcinomas de colo uterino ainda não são

preveníveis pelas vacinas comercialmente disponíveis e a substituição dos genótipos 16 e 18 por outros HPVs de alto risco hoje menos prevalentes nos alertam para a necessidade do conhecimento regionalizado do genótipo do HPV relacionado ao câncer do colo uterino.^{93,96}

2.3.4 Patogenia

Apesar de necessário, a infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento do carcinoma de colo uterino. Outros fatores contribuem para o desenvolvimento do colo uterino: tabagismo, imunossupressão, uso prolongado de anticoncepcional hormonal^{2,97}, número de parceiros sexuais durante a vida, assim como os hábitos dos parceiros sexuais, a idade do parceiro sexual em relação à da mulher e a idade ao início da vida sexual.⁹⁸

Em um estudo multicêntrico com mais 300 mil mulheres, o tabagismo foi descrito como um provável fator independente na etiologia do câncer do colo uterino.⁶ Neste estudo foram enumerados alguns dos possíveis mecanismos de carcinogênese desencadeados pelo tabagismo como imunossupressão local contra infecções virais⁹⁹ e dano no DNA das células escamosas causado pela nicotina e cotinina.¹⁰⁰

Mulheres com imunossupressão de diferentes etiologias apresentam um maior risco de carcinoma de colo uterino quando comparadas com a população normal. Um estudo alemão em 224 mulheres transplantadas renais em uso de terapia imunossupressora descreveu um risco de três vezes maior de colo uterino.¹⁰¹ Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, quando em uso contínuo por longo período de drogas como ciclofosfamida, também apresentam um risco elevado para lesões pré-neoplásicas no colo uterino.¹⁰²

Outro fator de risco significativo é o uso de anticoncepcionais hormonais. O uso continuamente por mais de 5 anos está associados a um risco de até duas vezes mais em desenvolver carcinoma de colo uterino.¹⁰³ Por outro lado, trabalhos realizados com mulheres em uso da terapia de reposição hormonal demonstraram não haver impacto negativo no risco de carcinoma de colo uterino.¹⁰⁴

2.3.5 Estadiamento

O estadiamento mais utilizado para o câncer do colo uterino se baseia nas normas da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), a qual foi atualizada em 2009, conforme o Quadro 1.¹⁰⁵ Trata-se de um sistema que adota quatro estadios e baseia-se nos achados clínicos: exame ginecológico, biópsia e conização, urografia excretora e ou ultrassonografia de vias urinárias, cistoscopia, retoscopia e raio X de tórax.

Quadro 1 - Estadiamento do câncer do colo uterino – FIGO 2009¹⁰⁵

0	Carcinoma <i>in situ</i>
I	Carcinoma restrito ao colo uterino
IA	Carcinoma invasivo diagnosticado apenas no microscópico, com maior profundidade de invasão menor que 5 mm e maior extensão menor ou igual a 7 mm
IA1	Invasão do estroma menor que 3 mm em profundidade e extensão menor que 7 mm
IA2	Invasão do estroma maior que 3 mm e menor que 5 mm e extensão menor que 7 mm
IB	Lesão clinicamente visível no colo uterino ou câncer pré-clínico maior que estadio IA
IB1	Lesão clinicamente visível menor ou igual a 4 cm no maior diâmetro
IB2	Lesão clinicamente visível maior que 4 cm no maior diâmetro
II	Carcinoma invade além uterino, mas não chega à parede pélvica ou ao terço inferior da vagina
IIA	Sem acometimento do paramétrio
IIA1	Lesão clinicamente visível menor ou igual a 4 cm no maior diâmetro
IIA2	Lesão clinicamente visível maior que 4 cm no maior diâmetro
IIB	Acometimento indubitável do paramétrio
III	O tumor estende-se à parede pélvica e ou envolve o terço inferior da vagina e ou causa hidronefrose ou rim não funcionante
IIIA	Tumor envolve o terço inferior da vagina, sem extensão para a parede pélvica
IIIB	Extensão para a parede pélvica e ou hidronefrose ou rim não funcionante
IV	O carcinoma estende-se além da pelve ou a mucosa da bexiga ou reto (comprovado por biópsia).
IVA	Estende-se a órgãos adjacentes, como reto e bexiga
IVB	Metástases para órgãos distantes, incluindo linfonodos inguinais e paraórticos

2.3.6 Fatores prognósticos

O estadió clínico e o estado dos linfonodos regionais são considerados fatores prognósticos de maior impacto na sobrevida do carcinoma de colo uterino.¹⁰⁶ Outras variáveis anatomopatológicas também contribuem, tais como: o tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, embolização linfovascular, nível de infiltração da parede cervical e o padrão de infiltração.¹⁰⁷

Alguns estudos identificaram a genotipagem do HPV como um fator independente de prognóstico. Em 2007, Lai *et al.*, observaram um pior prognóstico nas pacientes com câncer do colo uterino associado ao HPV 18, mas não com o HPV16.¹⁰ O mesmo achado foi encontrado no subgrupo de pacientes tratadas exclusivamente com histerectomia radical e linfadenectomia pélvica.⁹ Já os HPVs 58 e 31 foram associados a uma maior sobrevida.^{69,108}

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar o genótipo do HPV na população de pacientes consecutivas com diagnóstico de câncer do colo uterino atendidas no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de maio de 2008 a junho de 2012.

3.2 Específicos

3.2.1. Analisar a associação entre os diferentes genótipos de HPV com:

- a) idade ao diagnóstico da doença;
- b) tabagismo;
- c) tipo histológico;
- d) estadiamento.

3.2.2. Avaliar o genótipo do HPV como fator prognóstico para a sobrevida global.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Amostra populacional e parâmetros avaliados

Trata-se de estudo longitudinal (coorte histórica) dos casos consecutivos de câncer do colo uterino atendidos no Setor de Ginecologia Oncológica da Divisão de Clínica Ginecológica do Instituto do Estado de São Paulo (ICESP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), no período de maio de 2008 a junho de 2012. Pela natureza retrospectiva do estudo, solicitamos a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto e a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido foram obtidos pelo parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo I).

O Setor de Informática forneceu o registro de todos os pacientes classificados com o Código Internacional de Doenças (CID) para tumores de colo uterino, código C53 e suas variáveis, atendidos no ICESP no período de maio de 2008 a junho de 2012. O prontuário médico eletrônico do ICESP foi utilizado para preencher ficha de dados das pacientes participantes do estudo. Tal ficha foi idealizada para obter informações epidemiológicas, como a idade ao diagnóstico da doença, data do início e término do tratamento, intervalo livre de doença e sobrevida, como tabagismo e paridade, e clínicas como sintomatologia, exame físico e o estadiamento conforme as normas da FIGO, tipo histológico, modalidade de tratamento (Anexo II).

4.2 Preparo do material anatomopatológico (AP)

Todos os casos foram revisados por um patologista do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), o qual selecionou os cortes mais representativos dos tumores e reavaliou:

- 1) tipo histológico segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS):
 - carcinoma de células escamosas (CEC),
 - adenocarcinomas (ADC),
 - outros carcinomas,
- 2) Grau histológico baseado na diferenciação celular (escamosa ou glandular), polimorfismo nuclear e atividade mitótica:
 - G1 (bem diferenciado),
 - G2 (moderadamente diferenciado),
 - G3 (pouco diferenciado).

Após identificação do bloco a ser estudado, este foi submetido a seis cortes de 10µm de espessura. Foram preparados dois tubos tipo “*Eppendorf*” com três cortes em cada tubo para a extração de DNA e posterior detecção e genotipagem de HPV. Além disso, uma lâmina normal com um corte de 5µm de espessura corada com hematoxilina eosina (HE) foi preparada para confirmar a presença de tumor no material estudado.

4.3 Genotipagem do HPV

A genotipagem do HPV foi realizada pelo sistema automatizado BD Onclarity™ (BD *Diagnostics*, EUA). Trata-se de um teste de PCR em tempo real capaz de detectar simultaneamente 14 genótipos de HPV baseado nas regiões E6 e E7 do DNA viral. Esta metodologia fornece a genotipagem individual de seis HPVs (HPV 16, 18, 31, 45, 51 e 52), e de três grupos genotípicos compostos por oito HPVs (P1: HPV 33-58; P2: HPV 56-59-66; e P3: HPV 35-39-68).

Cada paciente teve o seu material parafinado manipulado individualmente seguindo as etapas abaixo:

- a) identificação de um tubo BD Onclarity™ HPV LBC contendo diluente com uma etiqueta com código de barras criada a partir de informações da pacientes,
- b) retirada a tampa do tubo BD Onclarity™ HPV LBC,
- c) transferidos três fragmentos de 10µm de espessura do material anatomopatológico parafinado da paciente diretamente ao tubo,
- d) complementado o tubo com 0,5 ml de água destilada,
- e) apertada bem a tampa do tubo BD Onclarity™ HPV LBC,
- f) invertido o tubo BD Onclarity™ HPV LBC de 3 a 4 vezes para garantir que o espécime e o diluente estivessem bem misturados,
- g) após a transferência manual do material AP parafinado para um tubo BD Onclarity™ HPV LBC, a amostra diluída pode ser armazenada a 2-30 °C por até 15 dias, ou até 30 dias quando armazenado a -20°C.

O ensaio da BD Onclarity™ HPV foi projetado para uso com o BD Viper™ LT, um sistema automatizado de processamento de amostras incluindo extração de ácidos nucleicos para a reação de PCR em tempo real. As amostras passaram por

uma etapa de pré-aquecimento para homogeneizar a matriz, facilitar a lise celular e a liberação do DNA a fim de ser extraído e amplificado. Após arrefecimento, as amostras foram colocadas no sistema BD Viper™ LT onde foram executadas de maneira automatizada todas as etapas envolvidas na extração e amplificação do DNA.

No interior do BD Viper™ LT, cada amostra foi transferida para um tubo de extração que continha partículas de óxido férrico em um filme solúvel. O ácido foi adicionado para diminuir o pH e induzir uma carga positiva sobre o óxido férrico, que por sua vez, vincula o DNA carregado negativamente. As partículas de óxido férrico e o DNA ligado foram então atraídos para as laterais do tubo de extração através de ímãs. O conteúdo líquido e não aderido às laterais do tubo foi descartado. As partículas de óxido férrico e o DNA ligado foram lavados com uma solução tampão de pH elevado para eluir o DNA purificado. Finalmente, uma solução tampão neutra foi usada para ajustar o pH do eluato para aperfeiçoar a amplificação do DNA.

O ensaio para detecção do HPV Onclarity™ BD baseia-se a amplificação simultânea e detecção de DNA alvo usando *primers* de amplificação e sondas marcadas com fluorescência, usando a reação PCR em tempo real. O sistema de BD Viper™ LT pipetou uma porção da solução de DNA purificada em cada tubo de extração para três tubos (G1, G2 e G3) com reagentes (*primers* de amplificação, sondas marcadas com fluorescência, DNA-polimerase, nucleotídeos e outros) que em seguida foram selados para evitar a contaminação. A presença ou ausência de DNA do HPV é determinada pelo ciclo de PCR no qual o sinal cruza um limite pré-estabelecido. Além disso, o ensaio amplificou e detectou um fragmento do gene da β -globina humana como um controle interno para avaliar o processamento de amostra, extração e amplificação. Desta forma, o DNA extraído foi usado para configurar três

reações de genotipagem por PCR: G1, que detecta HPV 16, HPV 18 e HPV 45 além do controle interno de DNA do gene da β -globina humana; G2, que detecta HPV 31, HPV 33-58 e HPV 56-59-66 além do controle interno de β -globina; e G3, que detecta HPV 51, HPV 52 e HPV 35-39-68 e o controle interno da β -globina. Após 40 ciclos PCR, qualquer sinalização para um genótipo específico e/ou o controle de β -globina interno foi considerada positiva para esse canal.^{65,109}

Todo este processo foi realizado na Fundação Oncocentro do Estado de São Paulo (FOSP) em parceria com o Instituto de Medicina Tropical (IMT), sob a supervisão do Professor José Eduardo Levi, pesquisador do laboratório de Virologia do IMT (Anexo III).

4.4 Análise estatística

A principal variável deste estudo foi o genótipo do HPV entre os casos de câncer do colo uterino estudados. Esta variável foi avaliada conforme faixas etárias e os diversos fatores de risco relacionados à infecção pelo HPV, como: número de parceiros sexuais, paridade, uso de contracepção hormonal e tabagismo. Fatores prognósticos para o câncer do colo uterino como: tipo histológico, grau de diferenciação celular, invasão linfocascular e estadiamento FIGO também foram relacionados aos diferentes genótipos encontrados. Além disso, os genótipos foram relacionados com resposta ao tratamento, recidiva e sobrevida.

As análises estatísticas foram realizadas com os programas estatísticos IBM SPSS for Windows versão 18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA) e STATA 13.1. Frequências e porcentagens foram calculadas para as variáveis qualitativas e para as variáveis quantitativas foram calculadas a média e desvio padrão (DP). As

associações entre diversos fatores epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos com os genótipos do HPV foram analisadas com o teste de qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. Curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank. O modelo de risco proporcional de Cox foi utilizado para examinar a associação entre os genótipos do HPV e sobrevida global. O nível de significância adotado para os testes de hipóteses foi de 5%.

4.5 Aspectos Éticos

Foi obtida a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido deste estudo por sua natureza retrospectiva (parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) (Anexo II).

5 RESULTADOS

5.1 Seleção da amostra estudada

Foram separados todos os prontuários das 731 pacientes consecutivas atendidas no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) no período de maio de 2008 a junho de 2012, acompanhadas até dezembro de 2015, com diagnóstico de câncer do colo uterino entre 2001 a 2012. A escolha deste período coincide com a data do início das atividades do ICESP, em maio de 2008. Neste momento, pacientes que já se encontravam em seguimento por câncer do colo uterino no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram transferidas para atendimento no ICESP, o que justifica a presença de pacientes com diagnóstico anterior ao ano de 2008 na população estudada.

Do grupo de 731 pacientes identificadas, a primeira informação coletada foi o laudo do anatomopatológico tumoral. Foram selecionadas apenas as pacientes com diagnóstico de tumor primário e invasivo do colo uterino, e identificado as que o material anatomopatológico estivesse disponível em nosso serviço.) Desta forma, foram excluídas 217 pacientes:

- 144 pacientes com material anatomopatológico (AP) do tumor externo ao nosso serviço,
- 46 pacientes com lesões precursoras do câncer do colo uterino, mas sem sinais de invasão no material AP,
- 27 pacientes apresentavam outro sítio tumoral primário com acometimento secundário do colo uterino.

Após esta análise preliminar, obtivemos 514 pacientes selecionadas para o estudo de genotipagem do HPV em material tumoral e sua correlação com variáveis. O material AP destas pacientes foi reavaliado pelo setor de Anatomia Patológica da ICESP/HCFMUSP, e após a conferência da representatividade tumoral nos novos cortes realizados no material parafinado armazenado, foram excluídas 68 pacientes devido ausência de tumor ou indisponibilidade de blocos parafinados para cortes adicionais.

O material anatomopatológico desta população de 446 pacientes foi submetido a seis cortes de 10µm de espessura. Preparados dois tubos tipo “Eppendorf” com três cortes em cada tubo para a extração de DNA. Estes tubos foram encaminhados para estudo do genótipo do HPV em material tumoral pelo método automatizado que utiliza plataforma BD Onclarity™.que detecta 14 genótipos de HPV de alto risco. Seis genótipos de HPVs são detectados individualmente (HPV 16, 18, 31, 45, 51 e 52), e oito genótipos de HPVs são agrupados em P1, P2 e P3 (P1= HPV33 e/ou 58; P2= HPV56 e/ou 59 e/ou 66; P3= HPV35 e/ou 39 e/ou 68), Figura 6 e Figura 5.

Figura 5- Descrição padronizada pelo ensaio BD Onclarity™

Figura 6 - Simbologia utilizada no laudo automatizado do sistema BD Onclarity™ para identificação dos genótipos. Abaixo estão descritos os genótipos passíveis de detecção pelo método. Os números representam os genótipos individuais de HPV (16, 18, 45, 31, 51 ou 52); P1, P2 e P3 representam os agrupamentos de genótipos de HPV (P1= HPV33 e/ou 58; P2= HPV56 e/ou 59 e/ou 66; P3= HPV35 e/ou 39 e/ou 68)

Conforme a Figura 7, dentre todas as amostras analisadas (n=446), 232 amostras foram positivas na primeira leitura para um dos genótipos de HPV testado. No entanto, 83 amostras não obtiveram positividade na primeira leitura apesar do controle interno com β -globina humana ser positivo (presença de DNA humano na amostra). Tais amostras tiveram suas curvas do PCR em tempo real reanalisadas. As

amostras que apresentaram positividade tardia para algum dos genótipos testados foram consideradas positivas (n=43) e as demais, foram consideradas HPVnegativas para os 14 genótipos testados (n=40).

As demais amostras que falharam na primeira leitura (n=131) foram reencaminhadas para o ensaio BD Onclarity™ com apenas um fragmento tumoral parafinado de 10µm de espessura, a fim de reduzir a quantidade de parafina que poderia interferir na leitura do método. Das 131 amostras reencaminhadas para leitura, 90 amostras apresentaram o controle da β -globina humana positivo e 41 amostras tiveram controle β -globina negativo, das quais 32 foram excluídas. As demais 9 pacientes haviam participado de outro estudo e o material tumoral foi genotipado por outra metodologia.²²

Das 90 amostras que apresentaram o controle da β -globina humana positivo, 61 delas foram genotipadas pelo PCR em tempo real inicial ou tardio. As 29 amostras restantes que foram consideradas HPVnegativas, porém 12 pacientes haviam participado de estudo supracitado²², foram incluídas entre a amostras positivas. Apenas 17 amostras HPVnegativas foram adicionadas às 40 amostras iniciais, totalizando 57 amostras HPVnegativo.

Figura 7- Várias etapas da genotipagem das 446 amostras iniciais

Assim, após a análise destas 446 amostras, 32 delas foram excluídas por falha do método devido a grande quantidade de parafina presente no fragmento analisado,

ou por má qualidade do DNA da amostra detectado na ausência da β -globina humana de controle, totalizando 414 pacientes genotipadas (Figura 8).

Figura 8 - Critérios de seleção da população incluída no estudo

A população de 414 pacientes foi analisada a partir de:

- 1) dados epidemiológicos: idade, raça, situação conjugal, paridade, número de parceiro, estado menopausal,
- 2) dados clínicos: sintomatologia, estadiamento, tamanho do tumor ao diagnóstico e acometimento dos paramétrios,
- 3) dados anatomopatológicos: tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, presença de invasão vascular e metástase linfonodal,
- 4) tratamento, tempo de sobrevida e recidiva da doença.

A análise de sobrevida incluiu apenas as pacientes com diagnóstico a partir de 2008 (n=313 ou 75% da população total genotipada), conforme Tabela 1.

Tabela 1 - População final estudada e os diversos dados coletados em prontuário.

Ano	n	%
1986	1	0,2
1990	1	0,2
1997	2	0,5
1998	1	0,2
1999	3	0,7
2001	3	0,7
2002	8	1,9
2003	7	1,7
2004	11	2,7
2005	10	2,4
2006	34	8,2
2007	20	4,8
2008	25	6,0
2009	48	11,6
2010	97	23,4
2011	120	29,0
2012	23	5,6
Total 2008-2012	313	75,0
TOTAL	414	100,0

5.2 Frequência e distribuição das variáveis analisadas

A idade da população estudada variou de 17 a 87 anos, com média etária de 50,8 (DP=13,8 anos). O histograma com a distribuição normal da população está representado no Gráfico 1.

Gráfico 1- Distribuição Normal da idade ao diagnóstico

A distribuição geográfica da população estudada conforme o local de nascimento informado no registro médico está representada na Gráfico 2. Os estados foram agrupados conforme as 5 regiões brasileiras. Além das pacientes nascidas em território nacional, observou-se uma mínima parcela de pacientes (0,5%) nascidas no exterior (Espanha n=1, e Peru n=2).

Gráfico 2 - Distribuição geográfica do local de nascimento

Conforme a ficha de identificação preenchida pela paciente no cadastro hospitalar, seguindo os critérios demográficos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) que define como cor ou raça - característica declarada pelo próprio indivíduo de acordo com as seguintes opções: branca, preta, amarela, parda ou indígena. O Gráfico 3 representa a distribuição racial da população estudada.

Gráfico 3 - Distribuição racial da população

O grau de escolarização desta população foi informado ao registro hospitalar em 283 (69%) das pacientes, sendo 20 (7%) analfabetas, 111 (39%) cursaram o ensino fundamental, 85 (30%) cursaram o primeiro grau completo e 67 (24%) referiram segundo grau completo ou ensino superior, tal distribuição está representada no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Distribuição da escolaridade na população

Conforme reportado ao registro hospitalar, 242 (58,5%) das pacientes eram solteiras e 168 (40,6%) das pacientes eram casadas ou moravam com algum companheiro fixo.

O número de parceiros sexuais variou entre 1 e 14, sendo a média de 3 (DP=2,94). A paridade variou entre 0 e 19 filhos, sendo a média de 4,2 e a mediana de 3,0 (DP=3,22).

O índice de massa corpórea médio foi de $26,3\text{Kg/m}^2$ (DP= $5,8\text{Kg/m}^2$), variando de $13,6$ a $53,0\text{Kg/m}^2$. A hemoglobina sérica ao diagnóstico variou de $4,8\text{ mg/dL}$ a $15,8\text{ mg/dL}$, sendo a média de $12,0$ (DP= $2,2\text{ mg/dL}$), e o estado funcional da paciente ao diagnóstico conforme a escala de Karnofsky variou de 50 a 100, sendo a média de 90 (DP=10).

O uso de anticoncepcional ao longo da vida foi interrogado em 124 pacientes, sendo que 50,8% responderam que não e 49,2 responderam que sim. Pacientes encontravam-se na menopausa em 51,8% dos casos e 48,2% encontrava-se no menacme.

Dentre as imunossupressões, observamos 2,6% de pacientes HIV positivas, 1,7% de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e nenhum paciente imunossuprimida após transplante.

O consumo de tabaco foi questionado em 95,4% das pacientes, sendo que 54,8% negaram e 45,2% confirmaram.

Alguns dados clínicos de anamnese foram coletados da primeira consulta registrada no ICESP. Queixas como dor, sangramento vaginal, corrimento vaginal e emagrecimento foram as mais frequentes. Na Tabela 2, estão às porcentagens dos relatos positivos.

Tabela 2 - Frequência de queixas clínicas

	Presente, n	Ausente, n	Desconhecido, n
Corrimento vaginal	78 (18,8%)	274 (66,2%)	62 (15%)
Sangramento vaginal	274 (66,2%)	79 (19,1%)	61 (14,7%)
Dor	125 (30,2%)	229 (55,3%)	60 (14,5%)
Emagrecimento	32 (7,7%)	321 (77,5%)	61 (14,7%)

Além das queixas clínicas, foi questionada a data do último exame de citologia cérvico-vaginal realizado antes do diagnóstico de câncer do colo uterino. Em apenas 198 pacientes (47,8%) este dado estava descrito. O Gráfico 5 ilustra as respostas obtidas.

Gráfico 5 - Data da última coleta de citologia cérvico-vaginal anterior ao diagnóstico de câncer do colo uterino

O estadiamento da população está classificado conforme as normas da FIGO (2009), estadio 1 a 4 e suas subdivisões, demonstrado no Gráfico 6

Gráfico 6 - Distribuição dos estadios clínicos conforme classificação FIGO (2009)

Os tipos histológicos foram classificados em carcinoma de células escamosas (n=309), adenocarcinoma (n=89) e outros tipos histológicos (n=16). A distribuição dos tipos histológicos está demonstrada no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Distribuição dos tipos histológicos

Os parâmetros anatomopatológicos relacionados com prognóstico do carcinoma de colo uterino foram analisados conforme cada tipo histológico, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos tipos histológicos conforme parâmetros prognósticos

	Grau de diferenciação n=339			Invasão angiolinfática n=412			Metástase linfonodal n=214	
	Bem (G1)	Moderado (G2)	Pouco (G3)	Presente	Ausente	Não Avaliável	Sim	Não
CEC, n	26	171	57	45	27	236	79	71
%	10	67	22	15	9	77	53	47
ADC, n	26	38	11	16	18	54	16	38
%	35	51	15	18	20	61	26	6
Outros, n	2	1	7	1	2	13	6	4
%	20	10	70	6	13	81	60	40

CEC: Carcinoma de células escamosas; ADC: Adenocarcinoma

Grau de diferenciação x tipo histológico: $p < 0,01$

Invasão linfovascular x tipo histológico: $p = 0,02$

Metástase linfonodal x tipo histológico: $p = 0,01$

Os tipos histológicos principais, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma, foram distribuídos conforme o estadiamento FIGO (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Distribuição dos casos de carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma conforme estadiamento FIGO

O tratamento foi dividido em quatro modalidades: cirurgia exclusiva ou cirurgia com radioterapia adjuvante, radioterapia exclusiva e/ou radioterapia exclusiva com quimiossensibilização e tratamento paliativo e distribuídos conforme os diversos estadiamentos, ilustrado no Gráfico 9.

Gráfico 9 - Frequência da modalidade de tratamento adotado conforme estadiamento clínico

Os tratamentos não cirúrgicos foram analisados quanto à dose de radioterápico, tempo de duração e número de ciclos de quimiossensibilização durante o tratamento, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Duração e doses do tratamento radioterápico com ciclos de quimiossensibilização

	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo
Tempo de Radioterapia (dias)	55 (21)	53	1	162
Dose do Campo em Pelve (cGy)	4453 (296)	4500	3000	6000
Boost em região dos paramétrios (cGy)	1364 (323)	1400	200	2000
Números de ciclos de quimiossensibilização (ciclos)	6 (1)	6	1	11
Tempo de Braquiterapia (dias)	23 (17)	21	1	221
Dose da braquiterapia (cGy)	2601 (468)	2800	750	5000

As recidivas ocorreram em 169 pacientes (40,8%) e foram subdivididas em três grupos: local, regional e à distância. O Gráfico 10 apresenta a frequência das recidivas.

Gráfico 10- Local e frequência das recidivas

5.3 Genotipagem do HPV

Obtivemos 357 (86%) dos casos positivos e 57 (14%) dos casos negativos para um dos 14 genótipos de HPV testados. A presença de mais de um genótipo de HPV na amostra tumoral ocorreu em 20 casos (5%). Em 15 dos 20 casos, o HPV16 esteve presente. O Gráfico 11 demonstra a frequência dos genótipos testados nesta população. Todas as combinações encontradas entre os genótipos dos HPVs estudados estão elencadas no anexo IV.

Gráfico 11 - Frequência dos genótipos de HPV na população estudada.

Para cada genótipo do HPV estudado, foi comparada a média etária ao diagnóstico, conforme a Tabela 5. Como um grupo, houve diferença na média etária pelo teste de ANOVA ($p=0,002$).

Tabela 5 - Média etária ao diagnóstico para cada genótipo de HPV estudado

	Frequência	Média (DP)
HPV16	222	49 (14)
HPV18	39	47 (11)
HPV31	14	55 (12)
HPV33-58	26	55 (13)
HPV35-39-68	14	57 (12)
HPV45	19	44 (12)
HPV52	8	58 (18)
HPV56-59-66	14	51 (12)
HPVoutro	1	38
HPVnegativo	57	54 (13)
TOTAL	414	51 (14)

Porém, a análise Post-hoc não revelou diferença na média etária entre os genótipos. Sendo apenas a relação entre a média etária do HPV45 e o HPVnegativo o que mais se aproxima da significância estatística ($p=0,053$)

A representação gráfica da média etária ao diagnóstico e a mediana relacionadas aos genótipos dos HPVs mais frequentes encontra-se, respectivamente, no Gráfico 12 e Gráfico 13.

Gráfico 12 - Distribuição da média etária ao diagnóstico entre os genótipos mais frequentes dos HPVs estudados

Gráfico 13 - Distribuição da mediana da idade ao diagnóstico entre os genótipos mais frequentes dos HPVs estudados

Dados sociodemográficos da população estudada e o seu agrupamento entre os genótipos do HPV analisados estão representados no Quadro 2.

Quadro 2 - Dados sociodemográficos da população distribuídos conforme os genótipos de HPV estudados.

	Genótipo HPV								
	HPV negativo	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33-58	HPV39-68-35	HPV45	HPV52	HPV59-56-66
Raça, n									
Branca	37	163	25	12	18	11	13	6	10
Preta	3	14	0	0	1	1	0	0	0
Parda	15	41	12	2	5	2	6	1	4
Amarela	2	4	2	0	1	0	0	1	0
TOTAL	57	222	39	14	25	14	19	8	14
Escolaridade, n									
Analfabeta	3	10	2	1	1	0	0	0	3
Fundamental	23	62	10	3	6	1	3	2	1
1º.grau completo	12	48	8	2	4	6	1	2	1
2º. grau ou superior completo	6	37	8	4	1	3	6	0	2
TOTAL	44	157	28	10	12	10	10	4	7
Região de nascimento, n									
Norte	3	5	4	0	1	0	0	0	0
Nordeste	13	87	14	4	9	4	7	3	11
Centro-Oeste	0	4	0	0	0	0	0	0	0
Sul	2	9	2	2	2	1	0	0	1
Sudeste	38	116	19	8	14	9	12	5	2
TOTAL	57	222	39	14	26	14	19	8	14
Situação conjugal n									
Com companheiro	26	92	14	4	12	5	8	2	5
Sem companheiro	31	128	23	10	14	9	11	6	9
TOTAL	57	220	37	14	26	14	19	8	1

O número total de pacientes incluídas em cada variável não é uniforme devido ausência de informação no registro hospitalar

Antecedentes pessoais (tabagismo e uso de anticoncepcional oral), ginecológicos (número de parceiros e estado menopausal) e obstétricos (paridade), foram correlacionados com os genótipos dos HPVs estudados no Quadro 3.

Quadro 3 - Antecedentes pessoais da população estudada distribuídos conforme os genótipos de HPV estudados.

	Genótipo HPV								
	HPV negativo	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33-58	HPV39-68-35	HPV45	HPV52	HPV59-56-66
Tabagismo									
<i>não, n</i>	34	96	21	8	15	11	13	4	5
<i>sim, n</i>	17	100	14	6	11	2	6	4	7
TOTAL	51	19	35	14	26	13	19	8	12
Uso de ACo									
<i>não, n</i>	9	25	5	5	6	3	2	2	1
<i>sim, n</i>	3	30	7	1	5	0	7	0	3
TOTAL	12	55	12	6	11	3	9	2	4
Parceiros									
<i>1, n</i>	8	10	2	2	4	2	1	0	1
<i>2, n</i>	2	14	0	1	0	0	1	0	0
<i>3-4, n</i>	3	7	0	0	0	0	1	0	0
<i>5-14, n</i>	1	4	5	0	0	0	3	1	0
TOTAL	14	35	7	3	4	2	6	1	1
Paridade									
<i>0-1, n</i>	21	87	11	1	5	4	7	1	5
<i>2-3, n</i>	26	31	6	2	5	1	2	3	2
<i>4-6, n</i>	10	56	10	8	10	7	7	4	3
<i>7-19, n</i>	0	27	7	3	6	1	3	0	3
TOTAL	57	201	34	14	26	13	19	8	13
Menopausa									
<i>pré, n</i>	35	102	16	9	17	10	5	6	6
<i>pós, n</i>	22	105	19	5	9	4	14	2	7
TOTAL	57	207	35	14	26	14	19	8	13

O número total de pacientes incluídas em cada variável não é uniforme devido ausência de informação no registro hospitalar. A paridade e o número de parceiros foram agrupados conforme os intervalos interquartis de cada variável.

Os tipos histológicos carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma, responsáveis por 96% dos casos, foram classificados conforme os genótipos dos HPVs estudados (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Distribuição proporcional dos tipos histológicos mais frequentes conforme cada genótipo de HPV estudado.

Aproximadamente 75% dos adenocarcinomas estavam relacionados ao HPV16, HPV18, HPV45 ($p < 0,001$). Os genótipos HPV33-58 e HPV31 não estiveram relacionados com casos de adenocarcinoma.

No Gráfico 15, observa-se a proporção entre adenocarcinoma/carcinoma de células escamosas com o passar dos anos no grupo de pacientes infectadas com o genótipo do HPV16 ($p < 0,3$).

Gráfico 15 - Distribuição temporal dos tipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas nas pacientes infectadas pelo HPV16

Ao analisarmos os genótipos mais frequentes (HPV16, HPV18, HPV33-58, HPV31, HPV45, HPVnegativo e HPVoutros) em relação aos: tipos histológicos (carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma), grau de diferenciação celular, invasão linfovascular e metástase linfonodal, somente o tipo histológico associação com os diferentes genótipos do HPV estudados ($p < 0,001$). Todas as associações entre os parâmetros enumerados estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados dos tipos histológicos carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma e suas variáveis, distribuídos entre os genótipos de HPV mais frequentes.

	Genótipo HPV						
	HPV negativo	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33-58	HPV45	HPVoutro
Tipo histológico n=397							
<i>CEC, n(%)</i>	34(63)	171(80)	20(56)	26(100)	14(100)	12(63)	32(80)
<i>ADC, n(%)</i>	20(37)	42(20)	16(44)	0	0	7(37)	4(20)
TOTAL, n(%)	54(100)	213(100)	36(100)	26(100)	14(100)	19(100)	36(100)
Grau de diferenciação n=339							
<i>bem (G1), n(%)</i>	9(18)	38(21)	8(25)	2(18)	7(29)	5(26)	6(22)
<i>moderado (G2), n(%)</i>	30(62)	109(61)	20(65)	8(43)	14(58)	14(74)	15(56)
<i>pouco (G3), n(%)</i>	9(18)	32(18)	3(10)	1(9)	3(13)	0	6(22)
TOTAL, n(%)	48(100)	179(100)	31(100)	11(100)	24(100)	19(100)	27(100)
Invasão vascular n=396							
<i>ausente</i>	7(13)	21(10)	5(14)	3(21)	3(12)	3(16)	3(9)
<i>presente</i>	6(11)	34(16)	8(22)	2(14)	4(15)	4(21)	3(9)
<i>não avaliável</i>	41(75)	157(74)	23(64)	9(64)	19(73)	12(63)	29(83)
TOTAL	54(100)	212(100)	36(100)	14(100)	26(100)	19(100)	35(100)

CEC: Carcinoma de células escamosas; ADC: Adenocarcinoma

Tipo histológico x genótipos mais frequentes: $p < 0,01$

Grau de diferenciação x genótipos mais frequentes: $p = 0,8$

Invasão vascular x : genótipos mais frequentes $p = 0,7$

Metástase linfonodal x genótipos mais frequentes: $p = 0,8$

O estadiamento do câncer do colo uterino da população estudada foi realizado conforme as normas da FIGO (2009), sendo os estadios de 1 a 4 (sem os seus subgrupos) associados com os genótipos do HPV mais frequentes, conforme a Tabela 7 ($p=0,019$). No Gráfico 16, observa-se que o HPV45 não está presente no estadiamento 4 e o HPV52 se encontra em menor porcentagem no estadiamento inicial.

Tabela 7 - Distribuição dos genótipos mais frequentes dos HPVs estudados conforme estadiamento

Estadio	HPV							TOTAL
	HPV-	HPV16	HPV18	HPV33-58	HPV31	HPV45	HPVoutros	
1, n(%)	26 (14)	102 (53)	23 (12)	10 (5)	7 (4)	9 (5)	15 (8)	192 (100)
2, n(%)	16 (10)	99 (62)	9 (6)	8 (5)	6 (4)	8 (5)	14 (9)	160 (100)
3, n(%)	11(26)	13 (30)	6 (14)	7 (16)	0 (0)	2 (5)	4 (9)	43 (100)
4, n(%)	4 (21)	8 (42)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	0 (0)	4 (21)	19 (100)
TOTAL	57 (14)	222 (54)	39 (9)	26 (6)	14 (3)	19 (5)	37 (9)	414 (100)

Estadiamento clínico x genótipos mais frequentes: $p=0,019$

Gráfico 16 – Distribuição dos genótipos de HPV conforme o estadiamento do câncer do colo uterino de acordo com as normas da FIGO (2009).

Os genótipos do HPV mais frequentes (HPV16, HPV18, HPV33-58, HPV31, HPV45, HPVnegativo e HPVoutros) foram associados a outras variáveis: tamanho do tumor ao exame físico, acometimento parametrial, taxa e local de recidiva da doença, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição dos genótipos mais frequentes dos HPVs estudados conforme tamanho do tumor, acometimento parametrial, metástase linfonodal, taxa e local de recidiva

	Genótipo HPV						
	HPV negativo	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33-58	HPV45	HPVoutro
Tamanho do tumor no colo n=314							
<4cm, n(%)	16(47)	81(44)	17(53)	8(73)	8(29)	5(29)	14(52)
≥4cm, n(%)	18(53)	102(56)	15(47)	3(27)	14(64)	12(71)	13(48)
TOTAL	34(100)	183(100)	32(100)	11(100)	22(100)	17(100)	27(100)
Acometimento parametrial n=354							
não	19(42)	82(43)	19(56)	4(33)	10(42)	6(35)	12(40)
sim	26(58)	110(57)	15(44)	8(67)	14(58)	11(65)	18(60)
TOTAL	45(100)	192(100)	34(100)	12(100)	24(100)	17(100)	30(100)
Metástase linfonodal, n=204							
ausente	12(52)	62(52)	10(55)	5(83)	7(47)	5(56)	8(53)
presente	11(47)	56(47)	8(44)	1(17)	8(53)	4(44)	7(47)
TOTAL	23(100)	118(100)	18(100)	6(100)	15(100)	9(100)	15(100)
Recidiva n=413							
não, n(%)	34(59)	130(59)	20(53)	12(86)	16(62)	11(57)	21(58)
sim, n(%)	24(41)	92(41)	18(47)	2(14)	10(38)	8(42)	15(41)
TOTAL	58(100)	222(100)	38(100)	14(100)	26(100)	19(100)	36(100)
Local da recidiva n=169							
local, n(%)	4(16)	15(16)	1(6)	0(0)	0(0)	3(38)	1(6)
regional, n(%)	8(33)	28(30)	5(28)	1(50)	3(30)	2(25)	7(47)
à distância, n(%)	12(50)	49(53)	12(67)	1(50)	7(70)	3(38)	7(47)
TOTAL	24(100)	92(100)	18(100)	2(100)	10(100)	8(100)	15(100)

Tamanho do tumor x genótipos mais frequentes: p=0,3

Acometimento parametrial x genótipos mais frequentes: p=0,8

Metástase linfonodal x genótipos mais frequentes: p=0,8

Recidiva x genótipos mais frequentes: p=0,6

Local da recidiva x genótipos mais frequentes: p=0,6

5.4 Análise de sobrevida

A situação dos pacientes ao final do estudo, em dezembro de 2015, é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - *Status vital* dos pacientes ao final do estudo

<i>Status Vital em 12/2015</i>	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Vivo	194	62,0
Óbito	119	38,0
Total	313*	100,0

*n=313 - incluídas apenas as pacientes com diagnóstico a partir de 2008.

5.4.1 Curvas de sobrevida

Curvas de sobrevida e de intervalo livre de doença foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste Log-rank para a análise da sobrevida global e recidiva do conjunto de pacientes com câncer do colo uterino incluídas neste estudo associado com as variáveis explanatórias.

5.4.2 Sobrevida global

A mediana do tempo de sobrevida global desta coorte de pacientes com câncer do colo uterino foi de 37 meses [12-53 meses]. A sobrevida global acumulada em 5 anos após o diagnóstico de câncer do colo uterino foi de 55% (Gráfico 17).

Gráfico 17 - Curva de sobrevida global para pacientes com câncer do colo uterino estudadas.

A presença do DNA de um dos 14 genótipos pesquisados no tecido tumoral não influenciou a sobrevida global das populações HPVnegativo (HPV-) e HPVpositivo (HPV+) ($p=0,19$), conforme o Gráfico 18.

Gráfico 18- Curva de sobrevida global conforme a presença ou ausência de um dos 14 HPVs genotipados

Log-rank=1,744 p=0,19

A presença de um único genótipo de HPV (HPV+ único) na amostra tumoral se associou a melhor sobrevida quando comparada à detecção de mais de um genótipo de HPV (HPV+ múltiplo), conforme o Gráfico 19.

Gráfico 19- Curva de sobrevida global conforme a presença de um único ou múltiplos genótipo de HPV na amostra tumoral.

Log-rank=4,436 p=0,035

n= 275 (12% das amostras genotipadas apenas com os agrupamentos P1, P2 e P3 não foram incluídas nesta análise).

Não se observou diferenças entre as curvas de sobrevida global para as pacientes infectadas com os genótipos de HPV mais frequentes (HPV16, 18, 33-58, 31 e 45) e as infectadas pelos HPVoutros e HPV- (Gráfico 20).

Gráfico 20- Curva de sobrevida para pacientes conforme os genótipos dos HPVs mais frequentes.

Log Rank: 9,420 p=0,15

No Gráfico 21 nota-se que a sobrevida média das pacientes foi maior nas infectadas com o HPV16 (58,6 meses), e menor nas infectadas pelos outros HPVs menos frequentes, denominados HPVoutros (34,3 meses) ($p=0,03$).

Gráfico 21 - Curva de sobrevida para pacientes conforme os genótipos dos HPV16 e o agrupamento dos HPVoutros (HPV35-39-68, HPV52 e HPV56-59-66)

Log Rank: 4,554 $p=0,03$

Ao analisar a taxa de sobrevida em 5 anos para cada genótipo de HPV mais frequente, observa-se uma tendência a maior sobrevida entre as pacientes infectadas pelo HPV18 (média de 70 meses) e tendência a menor sobrevida entre as pacientes infectadas pelos outros HPV (média de 37 meses), $p=0,15$ (Tabela 10).

Tabela 10 - Sobrevida global e taxa de sobrevida em 5 anos (em meses) para os HPV-, os HPVs dos genótipos mais frequentes (HPV16, 18, 33-58, 31, 45) e HPVoutros

Tempo de sobrevida (meses)				
HPV	Média sobrevida global	Sobrevida global		% sobrevida em 5 anos
		Intervalo de confiança de 95%		
		Limite inferior	Limite superior	
HPV-	49,7	37,2	62,2	52,9
HPV16	58,6	53,1	64,1	54,6
HPV18	52,9	42,6	63,1	70,3
HPV33-58	46,8	33,4	60,1	49,7
HPV31	55,9	43,8	68,0	68,6
HPV45	45,7	35,1	56,4	57,4
HPVoutros	34,3	24,1	43,8	37,1
Geral	56,9	52,7	61,1	52,9

* $p=0,15$

As curvas de sobrevida individuais para cada HPV estudado e seu respectivo teste Log-rank se encontram no anexo V.

Ao analisar as curvas de sobrevida da população infectada pelo genótipo do HPV16 ou HPV 18, também não se observa diferença entre os grupos ($p=0,17$), conforme o Gráfico 22.

Gráfico 22- Curva de sobrevida global conforme a presença do HPV16 ou HPV18

Log Rank: 3,512 p=0,17

Fatores de risco determinados previamente para o câncer do colo uterino, como, idade ao diagnóstico, estadió clínico da doença, tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, embolização linfovascular, estado dos linfonodos regionais, tamanho do tumor, tratamento e tabagismo, foram avaliados com curvas individuais de sobrevida construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste Log-rank para a análise da sobrevida global.

Conforme as quatro faixas etárias constituídas para a análise da sobrevida global, ≤ 30 anos, 31-50 anos, 51-70 anos e >70 anos, observou diferença significativa entre os quatro grupos ($p=0,01$). No Gráfico 23, observa-se que as piores taxas de sobrevida média encontram-se nos extremos das faixas etárias, ≤ 30 anos (40 meses) e >70 anos (37 meses), quando comparados a população global (57 meses).

Gráfico 23- Curva de sobrevida global conforme a distribuição entre as fixas etárias

Log Rank: 10,391 $p=0,01$

Como um dos principais fatores prognósticos, o estadiamento clínico, conforme as normas preconizadas pela FIGO (2009), traduziu-se em curvas de sobrevida para a população estudada com diferença estatística ($p < 0,001$), conforme o Gráfico 24.

Gráfico 24 - Curva de sobrevida global conforme os estadiamentos 1, 2, 3 e 4 (FIGO)

Log-rank= 124,922 $p < 0,001$

Os tipos histológicos, a presença da invasão linfovascular, a presença de metástase linfonodal e o tamanho do tumor relacionaram-se com curvas de sobrevida com significância estatística, respectivamente, Gráfico 25, Gráfico 26, Gráfico 27 e Gráfico 28, com $p < 0,001$, $p = 0,02$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente. As curvas de sobrevida e o teste Log-rank para o grau de diferenciação tumoral não demonstraram significância estatística ($p = 0,20$), conforme o Gráfico 29.

Gráfico 25 - Curva de sobrevida global conforme os tipos histológicos

Log-rank= 17,721 $p < 0,001$

Gráfico 26 - Curva de sobrevida global conforme a presença ou ausência da invasão vascular, ou não avaliável na amostra

Gráfico 27 - Curva de sobrevida global conforme o a presença ou ausência da metástase linfonodal

Log-rank=23,049 $p<0,001$

Gráfico 28 - Curva de sobrevida global conforme o tamanho do tumor.

Log-rank= 21,680 $p < 0,001$

Gráfico 29 - Curva de sobrevida global conforme o grau de diferenciação tumoral

Log-rank=3,195 p=0,20

As curvas de sobrevida da população conforme o tratamento adotado, cirurgia exclusiva, cirurgia e radioterapia adjuvante (Cir+Rdt), radioterapia exclusiva com ou sem quimiossensibilização (Rdt ou Rdt+Qt) e tratamento paliativo, também demonstraram significância estatística ($p < 0,001$), conforme o Gráfico 30.

Gráfico 30 - Curva de sobrevida global conforme o tratamento submetido a paciente.

Log-rank= 120,564 $p < 0,001$

O tabagismo não teve impacto nas curvas de sobrevida da população estudada, $p=0,72$, conforme o Gráfico 31.

Gráfico 31 - Curva de sobrevida global conforme o consumo de tabaco.

Log-rank=0,125 $p=0,72$

5.4.3 Modelo de regressão de Cox

Foram construídos modelos de regressão de Cox univariados e múltiplos de sobrevida global para as pacientes com câncer do colo uterino.

A Tabela 11 apresenta os valores de *hazard ratio* (HR) para as características epidemiológicas e clínicas relacionados à taxa de sobrevida em 5 anos. Conforme as quatro faixas etárias que a população foi distribuída, observou-se pior prognóstico entre as mais jovens (≤ 30 anos) e as mais idosas (> 70 anos). Pacientes em estadiamento inicial apresentaram melhor sobrevida quando comparados com pacientes em estadiamento mais avançado. Tumores menores do que 4 cm também apresentaram um melhor prognóstico quando comparados aos tumores maiores ou iguais a 4 cm, o mesmo ocorrendo com a ausência de linfonodos acometidos quando comparados com a presença de linfonodos acometidos. O tabagismo não imputou maior risco à população analisada.

Tabela 11 - Análise univariada para sobrevida em 5 anos, considerando os seguintes fatores de risco: faixa etária ao diagnóstico, estadiamento clínico, tamanho do tumor, metástase linfonodal e tabagismo

Fatores prognósticos	Sobrevida em 5 anos		Hazard Ratio	95% intervalo de	
	n	%	(HR)	confiança	p
Faixa etária, anos					
=<30 anos	16	51,6	2,066	1,136-3,756	0,021
31-50 anos	92	70,2	1,0	-	-
51-70 anos	71	58,7	1,420	0,934-2,160	0,108
>70 anos	15	51,7	2,280	1,235-4,207	0,015
Estadiamento FIGO					
1A1	27	90,0	1,0	-	-
1A2	4	100	0,0	0,000-1,999	0,961
1B1	55	83,3	1,451	0,405-5,201	0,570
1B2	27	87,1	1,143	0,256-5,108	0,862
2A	10	50	5,435	1,495-19,753	0,012
2B	58	43,7	4,861	1,514-15,609	0,008
3A	3	37,5	7,060	1,687-29,549	0,007
3B	7	19,7	13,918	4,171-46,435	<0,001
4A	1	8,3	32,696	8,934-119,657	<0,001
4B	2	20,4	20,735	4,594-93,588	<0,001
Tamanho do tumor					
<4 cm	90	83,3	1,0	-	-
>= 4 cm	83	54,6	3,194	1,901-5,368	<0,001
Metástase linfonodal					
Ausente	60	83,3	1,0	-	-
Presente	45	50,0	4,057	2,181-7,546	<0,001
Tabagismo					
Não	97	63,0	1,0	-	-
Sim	86	61,0	1,068	0,740-1,542	0,721

As Tabela 12 e Tabela 13 apresentam, respectivamente, os valores de *hazard ratio* (HR) para as características anatomopatológicas e os genótipos de HPV, relacionados à taxa de sobrevida em 5 anos.

Os tipos histológicos mais frequentes encontrados na população, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma, apresentaram uma melhor taxa de sobrevida quando comparados com os outros tipos histológicos mais raros. A presença da invasão linfovascular indicou um pior prognóstico quando comparado com a ausência de invasão linfovascular, mas apresenta um melhor prognóstico do que o encontrado nos tumores nos quais a invasão vascular não foi avaliável devido tamanho do fragmento de biópsia ou necrose tumoral. O grau de diferenciação tumoral não influenciou a sobrevida da população analisada (Tabela 12).

Os genótipos do HPV não demonstraram associação com pior prognóstico, exceto os casos de infecção por múltiplos HPVs, os quais demonstraram um pior prognóstico quando comparados com a população HPV- ou a infectada apenas por um único HPV (Tabela 13).

Tabela 12 - Análise univariada para sobrevida em 5 anos, considerando os seguintes fatores de risco: tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, invasão vascular

Fatores prognósticos	Sobrevida em 5 anos		Hazard Ratio	95% intervalo de	
	n	%	(HR)	confiança	p
Tipo histológico					
Carcinoma de células escamosas	127	55,6	1,0	-	-
Adenocarcinoma	44	68,8	0,670	0,404-1,113	0,125
Outros	4	22,5	3,007	1,599-5,652	0,010
Grau de diferenciação					
G1	26	66,7	1,0	-	-
G2	95	62,5	1,306	0,714-2,388	0,380
G3	34	57,6	1,783	0,908-3,504	0,098
Invasão vascular (IV)					
Ausente	24	80,0	1,0	-	-
Presente	28	70,0	1,695	0,644-4,460	0,281
Não avaliável	139	58,4	2,701	1,184-6,159	0,020

Tabela 13 - Análise univariada para sobrevida em 5 anos, considerando a presença do DNA HPV no tumor e o número de genótipos na mesma amostra, e a presença do HPV16, HPV18, HPVoutros e HPV-.

Fatores prognósticos	Sobrevida em 5 anos		Hazard Ratio	95% intervalo de	p
	n	%	(HR)	confiança	
HPV DNA					
+ único	145	65,9	1,0	-	-
negativo	22	55,0	1,587	0,946-2,662	0,080
+ múltiplo	7	43,8	2,021	1,011-4,038	0,046
Genótipo HPV					
HPV18	20	74,1	1.0	-	-
HPV16	108	63,2	1,358-	0,622-2,966	0,443
HPVoutros	44	58,7	1,700	0,748-3,863	0,205
HPVnegativo	22	55,0	1,982	0,826-4,755	0,125

Na Tabela 14 são apresentados os resultados do Modelo I de regressão de Cox ajustado para sobrevida global (faixa etária ao diagnóstico, estadiamentos 1, 2, 3 e 4 pela FIGO – 2009, tipo histológico e invasão linfovascular) de acordo com a presença de um único genótipo ou de múltiplos genótipos no tecido tumoral. Observa-se pior prognóstico relacionado ao genótipo múltiplo do HPV ($p=0,001$).

Tabela 14 – Modelo I de regressão de Cox múltiplo para sobrevida global¹

Fatores prognósticos	Sobrevida em 5 anos		Hazard Ratio	95% intervalo de	p
	N	%	(HR)	confiança	
Faixa etária, anos					
=<30 anos	16	51,6	1,464	0,737-2,908	0,277
31-50 anos	92	70,2	1,0	-	-
51-70 anos	71	58,7	1,111	0,677-1,822	0,678
>70 anos	15	51,7	1,607	1,607-0,794	0,187
Estadiamento FIGO					
1	113	86,3	1,0	-	-
2	68	54,0	4,541	2,368-8,708	<0,001
3	10	26,3	10,859	5,119-23,034	<0,001
4	3	16,7	34,098	14,381-80,851	<0,001
Tipo histológico					
Carcinoma de células escamosas	127	55,6	1,0	-	-
Adenocarcinoma	44	68,8	1,237	0,708-2,162	0,454
Outros	4	22,5	2,716	1,370-5,385	0,004
Invasão vascular (IV)					
Ausente	24	80,0	1,0	-	-
Presente	28	70,0	2,477	0,863-7,113	0,092
Não avaliável	139	58,4	1,611	0,670-3,877	0,287
HPV DNA					
+ único	145	65,9	1,0	-	-
negativo	22	55,0	1,245	0,693-2,237	0,464
+ múltiplo	7	43,8	3,457	1,673-7,144	0,001

¹Ajustado por faixa etária ao diagnóstico, estadiamentos 1, 2, 3 e 4 pela FIGO – 2009, tipo histológico e invasão vascular.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados do Modelo II de regressão de Cox ajustado para sobrevida global (faixa etária ao diagnóstico, estadiamentos 1, 2, 3 e 4 pela FIGO – 2009, tipo histológico e invasão vascular) de acordo com a presença do HPV16, HPV18, HPVoutros ou HPV-. A ausência de HPV ou a presença do HPV16, 18 ou outros HPVs não foram preditores de sobrevida.

Tabela 15 - Modelo II de regressão de Cox múltiplo para sobrevida global¹

Fatores prognósticos	Sobrevida em 5 anos		Hazard Ratio (HR)	95% intervalo de confiança	p
	n	%			
Faixa etária, anos					
=<30 anos	16	51,6	1,674	0,678-4,132	0,292
31-50 anos	92	70,2	1,0	-	-
51-70 anos	71	58,7	0,908	0,492-1,676	0,998
>70 anos	15	51,7	1,296	0,414-4,056	0,254
Estadiamento FIGO					
1	113	86,3	1,0	-	-
2	68	54,0	2,639	1,101-6,326	0,030
3	10	26,3	5,499	1,923-15,724	0,001
4	3	16,7	12,514	4,009-39,059	<0,001
Tipo histológico					
Carcinoma de células escamosas	127	55,6	1,0	-	-
Adenocarcinoma	44	68,8	1,149	0,670-1,970	0,686
Outros	4	22,5	1,461	1,290-5,002	0,007
Invasão vascular (IV)					
Ausente	24	80,0	1,0	-	-
Presente	28	70,0	2,593	0,953-7,055	0,060
Não avaliável	139	58,4	1,577	0,671-3,706	0,325
Genótipo HPV					
HPV18	20	74,1	1,0	-	-
HPV16	108	63,2	1,341	0,596-3,016	0,520
HPVoutros	44	58,7	1,397	0,594-3,290	0,412
HPV-	22	55,0	1,543	0,623-3,820	0,300

¹Ajustado por faixa etária ao diagnóstico, estadiamentos 1, 2, 3 e 4 (FIGO – 2009), tipo histológico e invasão vascular

6 DISCUSSÃO

6.1 Genótipos do HPV

Este estudo identificou os genótipos dos HPVs mais frequentes nas amostras parafinadas de material tumoral de câncer do colo uterino em 414 mulheres atendidas no ICESP entre os anos de 2008 e 2012 e correlacionou-os com outros fatores de risco já conhecidos para o desenvolvimento do câncer do colo uterino. Obtivemos 357 (86%) casos HPVpositivos e 57 (14%) de casos HPVnegativos para um dos 14 genótipos de HPV testados. Os casos HPVpositivos distribuíram-se em ordem decrescente pelos seguintes genótipos: HPV16 (54%), HPV18 (9%), HPV33-58 (6%), HPV45 (5%), HPV31 (3%), HPV39-68-35 (3%), HPV59-56-66 (3%) e HPV52 (2%), confirmando a contribuição universal dos oito tipos HPV mais comuns (HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58) em amostras de câncer do colo uterino.⁸ Ao analisarmos a presença de mais de um genótipo na amostra, obtivemos 5% de infecções múltiplas, 69% de infecções única e 14% HPVnegativo.

Estudos realizados no Brasil mostraram que o HPV16 é o tipo mais comum no câncer do colo uterino. O segundo genótipo mais comum é o HPV18^{4,22,110,111}, com exceção da região Central, onde o segundo genótipo mais prevalente é HPV33.⁷² Outra diferença observada na prevalência do genótipo do HPV entre as diferentes regiões brasileiras é verificada para o HPV58, que é o terceiro mais frequente na região Nordeste, mas mostra uma contribuição menor em outras regiões do país. Estudos avaliaram os genótipos de HPV em algumas áreas distintas, como Estado de Minas Gerais, a região Nordeste, cidade de Cruz Alta (Rio Grande do Sul), Estado de

São Paulo, os quais mostraram um predomínio do HPV16, seguido de diferentes genótipos, como o HPV18, 33 e 31, em diferentes proporções.¹⁸⁻²²

O presente estudo é o maior até o momento que empregou o ensaio Onclarity BD™ para genotipagem do HPV a partir de material parafinado e é o pioneiro no Brasil. Estudo comparativo entre quatro métodos de genotipagem do HPV em 60 amostras de material parafinado de câncer do colo do útero, entre eles o ensaio Onclarity BD™, observou que a prevalência global de HPV em material parafinado varia entre 80 a 95%.¹⁰⁹ Prevalência de HPV similar (80,4%) foi reportada em 55 amostras de material parafinado de câncer do colo do útero por Rabelo-Santos *et al.* 80,4%⁷². No presente estudo, foi detectado um ou mais genótipos de HPV em 86% das neoplasias do colo do útero através da análise de material tumoral parafinado. Estudos anteriores descreveram o ensaio Onclarity BD™ para genotipagem do HPV na citologia cervical em meio líquido e em material histológico fresco de lesões NIC2 e obtiveram sensibilidade de 90,4% e especificidade de 77%.⁶⁵ Um amplo estudo que comparou sete métodos de genotipagem em amostras de citologia cervical mostrou que o ensaio Onclarity BD™ apresentou sensibilidade de 95% para a detecção de HPV em amostras de biópsia de colo do útero com neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC3).¹¹² Desta forma, apesar do câncer do colo do útero estar associado à infecção crônica pelo HPV em quase 100% dos casos, os diferentes métodos podem não detectar a presença do vírus em uma baixa porcentagem dos casos. A não detecção de HPV em carcinomas do colo do útero pode ser devido a falha do método (falsos-negativos) ou representar resultados verdadeiro-negativos. Os resultados falsos-negativos ocorrem devido à sensibilidade insuficiente das técnicas utilizadas, deleções ou rearranjos do gene do HPV que está sendo testado, presença de um tipo de HPV não detectado pelo sistema que está sendo utilizado, amostra inadequada ou

adenocarcinoma endometrial classificado erroneamente.^{8,113} Resultados verdadeiro-negativos podem ser devido a um mecanismo “*hit-and-run*” que leva à perda do genoma do HPV ou desenvolvimento tumoral por uma via HPV independente.¹¹³

6.2 Idade ao diagnóstico

No presente estudo, a média etária ao diagnóstico foi de 50,8 anos (DP=13,8 anos), similar àquela reportada por De Sanjosé *et al.* quando avaliou 10575 amostras de câncer do colo uterino provenientes dos cinco continentes.⁸ A média etária mundial reportada por este estudo foi de 51,4 anos (DP=13,3 anos). Pacientes provenientes da Europa apresentam a média etária mais alta (54,2 anos), seguida da América do Norte e Ásia (51,1 anos), América Central e do Sul (50,6 anos), África (50,4 anos), e Oceania (49,3 anos). Apesar da média etária dessas pacientes ser em torno de 50 anos, países como a Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela apresentam média etária inferior a 50 anos de idade.⁸ A diferença regional de média etária pode refletir, entre outros motivos, a eficácia dos programas de rastreamento do câncer do colo do útero. Em países com bom rendimento dos programas de rastreamento, a média etária tende a ser maior e o estadio do câncer mais precoce.

A média etária do presente estudo também se assemelha a estudos brasileiros previamente publicados. Estudos realizados previamente em diferentes regiões mostraram que o câncer do colo uterino acometeu mulheres ao redor de 50 anos: região Sudeste, representada por São Paulo (52-53 anos)^{22,110}, região Norte, representada por Belém (51,5 anos)¹¹⁴, Região Centro-Oeste, representada por Goiânia (49 anos)⁷². A região Nordeste, representada por Natal, apresentou média etária ao diagnóstico um pouco inferior (47 anos)¹¹⁵, a qual se assemelha à

encontrada em outros países da América Latina, como Paraguai (47 anos)¹¹⁶ e Venezuela (45 anos).¹¹⁷

Aproximadamente 8,7% (n=36) das pacientes avaliadas no presente estudo tinham idade igual ou menor que 30 anos, distribuídas entre os estadiamentos como se segue: 27,7% (1A1, e 1B1), 52,7%(1B2, 2A e 2B) e 11% (3A, 3B, 4B). Apenas 44% das pacientes com idade menor que 30 anos haviam feito algum exame de prevenção primária antes do diagnóstico do câncer do colo ute, apesar de 83% delas já terem pelo menos uma gestação prévia. Tal dado chama a atenção para a idade ideal de início do rastreo primário do câncer do colo uterino no Brasil, e da importância de fazê-lo mesmo durante o pré-natal.

Menor faixa etária ao diagnóstico de câncer do colo uterino associada ao HPV16 ou HPV18 foi descrita previamente.^{15,118,119} Nosso estudo revelou menor idade ao diagnóstico de câncer do colo uterino com o HPV18 e o HPV45 (< 50 anos), quando comparado aos demais genótipos estudados. De Sanjosé *et al.* e Vinokurova *et al.* relataram que os genótipos do HPV 16, 18 e 45 são provavelmente integrados ao genoma humano mais rapidamente do que os outros genótipos do HPV, e os tumores decorrentes destes genótipos podem se manifesta em idades mais jovens.

Este achado também é consistente com os resultados de estudos prospectivos de mulheres com infecções por HPV16 e HPV18 que tiveram um risco muito maior de desenvolver lesões cervicais de alto grau, dentro de um curto seguimento, do que as mulheres infectadas com outros genótipos.¹²⁰ O HPV 45 é raro em mulheres com citologia normal ou lesões de baixo grau (0·4% e 3·7%, respectivamente) comparado com HPV16 (2·5% e 20%, respectivamente); no entanto, globalmente é considerado o terceiro genótipo mais comum entre os HPVs de alto risco para o câncer do colo uterino. A maioria das lesões pré neoplásicas progridem rapidamente para lesões

mais graves, o que apoia a hipótese de integração precoce (ou maior atividade oncogênica) desses tipos de HPV no genoma humano.

Esta variação de idade é relevante para a racionalização das políticas recentemente propostas de rastreio e protocolos de gerenciamento de pacientes com alto risco de desenvolverem o câncer do colo uterino.

Wheeler *et al.*, sugeriram que o rastreio do câncer do colo uterino fosse realizado com maior periodicidade nos casos da presença do HPV45 no esfregaço cervical já que se observa o diagnóstico de casos de câncer do colo uterino em pacientes com idade mais jovens neste grupo, indicando um menor intervalo de tempo para progressão do câncer invasivo, com ou sem transição pelos estágios pré-invasivo.⁹⁶

6.3 Tipo histológico

Na população estudada, o tipo histológico mais frequentemente observado foi o carcinoma de células escamosas (75%). O adenocarcinoma foi observado em 21%. Estudo avaliando os genótipos de HPV distribuídos pelo mundo e suas correlações com os tipos histológicos de câncer do colo uterino, descreveu uma taxa de adenocarcinoma no Brasil semelhante à observada na Croácia (11,4%), Itália (12,7%), Algéria (15,4%), Uganda (15,5%), Líbano (14,2%), Israel (11,1%), Turquia (17,3%) e Austrália (12,3%)⁸. Na meta-análise realizada por Li *et al.* em 2011), a proporção de adenocarcinoma variou por região, sendo que a mais baixa (3,8%) foi encontrada na Ásia e a mais alta na América do Norte (23,7%)¹³, semelhante à encontrada no presente estudo.

Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil apresentam taxas menores de adenocarcinoma: na cidade de São Paulo observou-se 4,5% no ano de 1994¹¹⁰, em Recife 6,8% no ano de 2000¹²¹, em Belém foi descrito taxa de 3,2% no ano de 1999¹¹⁴, em Goiânia, 7,1% no ano de 2003⁷². No entanto, análises mais recentes encontraram uma maior prevalência de adenocarcinoma entre os tipos histológicos estudados, aproximadamente 15%, (2010 em Natal)¹¹⁵ e (2013 no Estado de São Paulo)²², sugerindo que a presença do adenocarcinoma está aumentando entre os cânceres do colo uterino no Brasil. Neste estudo, apesar de observarmos um aumento da porcentagem de adenocarcinoma entre as pacientes HPV16 positivas, ano de 2009 13% de casos de casos (ano de 2009), 17% de casos (2010) e 30% dos casos (ano de 2011), tais dados não foram estatisticamente significativos.

Estudos demonstram que o aumento das taxas de sobrepeso e obesidade na população brasileira e mundial estão relacionados com maiores taxas de câncer, principalmente relacionado com as taxas de adenocacinoma¹²². Porém, neste estudo obtivemos índices de massa corpórea semelhantes entre a população com adenocarcinoma (IMC=30,55) e a população com carcinoma de células escamosas (IMC=30,36).

6.4 Impacto na sobrevida

Dentre os possíveis fatores prognósticos anatomopatológicos e clínicos que podem ser levados em consideração na sobrevida de pacientes com carcinoma de colo uterino, submetidas a tratamento, estão: idade, tipo histológico, grau de diferenciação, invasão do espaço linfovascular, metástase linfonodal, distância da margem cirúrgica, profundidade de invasão do tumor, presença de necrose, maior

diâmetro do tumor e estadiamento clínico ao diagnóstico. Em tumores de estadio precoce, invasão vascular e invasão do estroma (> 10mm de profundidade ou acometimento maior que > 70% invasão) estão associados com pior prognóstico. Além disso, quando comparados os tipos histológicos mais frequentes no câncer do colo uterino, o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma, observa-se um pior prognóstico relacionado ao adenocarcinoma.^{123,124}

De Cremoux *et al.* relataram que genótipos do HPV de alto risco foram associados com reduzida taxa de sobrevida livre de doença em comparação com os genótipos de risco intermediário¹⁵.

Lai *et al.* relataram uma melhor taxa de sobrevida em 5 anos para HPV58 e os genótipos taxonomicamente associados (HPV52 e HPV33), em comparação com o HPV16 e 31, e os HPV18 e 68.⁶⁹ Huang *et al.* relataram que o HPV31 e os genótipos relacionados (HPV33-35 e HPV67) poderiam prever uma melhor taxa de sobrevida.¹²⁵ Lau *et al.* avaliou a mesma agrupação dos, HPVs, e identificou apenas na análise univariada um pior prognóstico no grupo infectado pelos HPVs alfa-9 excluindo o HPV16.⁵

Co-infecção por vários genótipos de HPV é observada mais frequentemente entre as mulheres mais jovens e entre aquelas com alguma imunodeficiência. Poucos estudos descreveram a associação de várias infecções por HPV e câncer de colo do útero, e seus resultados não são consistentes. Destes, alguns estudos sugeriram um possível papel para infecções por múltiplos HPVs no desenvolvimento ou progressão da neoplasia^{126,127}, enquanto outros mostraram que o risco de lesões cervicais pré-invasivas ou câncer invasivo em mulheres infectadas com vários tipos de HPV não foi maior do que naquelea com um único genótipo do HPV.^{45,128}

Estudo que comparou a taxa de sobrevida das pacientes com um único ou múltiplos genótipos de HPV detectado no material tumoral do colo uterino não demonstrou diferença estatística entre os grupos.⁵ No presente estudo evidenciou-se pior taxa de sobrevida entre pacientes com múltiplos genótipos de HPV, este achado está de acordo com o estudo de Trottier *et al.*¹²⁶ A associação entre infecção múltipla e pior prognóstico sugere a influência da imunidade na carcinogênese no câncer do colo uterino.

No presente trabalho, não se observou um pior prognóstico do câncer do colo uterino relacionado aos genótipos do HPV (HPV16, 18, 33-58, 31, 45, 51, 52, 56-59-66 e 35-39-68) quando analisados individualmente ou agrupados, o que está de acordo com estudos prévios.^{16,129} Por outro lado, a análise de sobrevida global da presente casuística mostrou associação de pior prognóstico com tradicionais fatores prognósticos da literatura.^{105,106}

7 CONCLUSÕES

O presente estudo detectou alta porcentagem de HPV (86%) em material parafinado de câncer do colo do útero de pacientes atendidas no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

A distribuição dos genótipos de HPV foi concordante com a literatura: HPV16, 18, 33-58, 31 e 45.

A distribuição da idade ao diagnóstico, tipo histológico e estadiamento diferiu conforme os genótipos do HPV.

O genótipo do HPV não se relacionou com a taxa de sobrevida global da população e prognóstico do câncer do colo uterino. Porém, a presença de múltiplos genótipos de HPV no material tumoral se associou à pior prognóstico.

ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Genotipagem do Papilomavírus Humano nos casos de câncer de colo uterino do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de 2008 a 2012.

Área Temática:

Pesquisador: JESUS PAULA CARVALHO

Versão: 2

Instituição: Fundação Faculdade de Medicina - ICESP

CAAE: 03350012.2.0000.0065

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 34718

Data da Relatoria: 06/06/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

conforme parecer anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer anterior

Recomendações:

Conforme parecer anterior

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências resolvidas adequadamente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Com a resolução das pendências apontadas no parecer anterior o projeto tem condições de ser aprovado no que diz respeito aos aspectos de natureza ética.

ANEXO II – CARTA DE COLABORAÇÃO DO IMT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
www.imt.usp.br
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA
Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 2º andar
Pinheiros, São Paulo – SP, CEP 05430-000
Fone (11) 3061 8666 Fax 3063 2659

São Paulo, 02 de Abril de 2012.

Ref. Protocolo de Pesquisa “Genotipagem do Papilomavírus Humano nos casos de câncer de colo uterino do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de 2008 a 2012.”

Venho por meio desta oficializar minha ciência e total apoio ao projeto de doutorado de Maria Luiza Nogueira Dias Genta. Como co-orientador deste trabalho asseguro que a aluna terá pleno acesso ao nosso laboratório e apoio na realização de seus experimentos.

Sem mais,

Atenciosamente,

Dr. José Eduardo Levi
CRBio 23.407/01-D
IMT-USP - Universidade de São Paulo

Dr. José Eduardo Levi
dudilevi@usp.br

ANEXO III – QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DOS DADOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Nome: _____ Idade: _____

Data de Nascimento: __/__/__ Natural de: _____

RG HC: _____ Raça: ☐ Branca ☐ Mulata ☐ Amarelo ☐ Preta ☐ Pardo

Escolaridade: ☐ Analfabeto ☐ Fundamental ☐ 1 Grau incompleto ☐ 1 Grau completo ☐ 2

Grau incompleto ☐ 2 Grau completo ☐ Superior incompleto ☐ Superior Completo

Estado Conjugal: ☐ Sem companheiro ☐ Com companheiro

Data do diagnóstico: __/__/__ Estadiamento FIGO: _____

Tamanho do tumor ao exame físico _____mm ou 0=colposcópico N/A=não
avaliável/sem exame de estadiamento

Vagina 0=não avaliada 1= livre 2=acometida 3=sem exame de estadiamento

Paramétrios 0=não avaliada 1= livre 2=acometida 3=sem exame de estadiamento

Linfonodos pélvicos: 0=não avaliada 1= livre 2=acometida 3=sem exame de
estadiamento

Linfonodos paraórticos: 0=não avaliada 1= livre 2=acometida 3=sem exame de
estadiamento

Tipo histológico: ☐ CEC ☐ Adenocarcinoma ☐ Outros

Grau de diferenciação: ☐ 1 ou Baixo ☐ 2 ou Moderado ☐ 3 ou Alto

Invasão vascular: ☐ Presente ☐ ausente ☐ Não Avaliado

Material disponível para análise: ☐ Sim ☐ Não Tipo de material: ☐ Biópsia ☐ Cirúrgico

Número de identificação do material estudado: _____. Local:

☐ ICESSP ☐ HC

Revisão do Patologista: ☐ OK ☐ material inadequado/insuficiente

Genotipagem: _____ Data: __/__/__

Tratamento:

Cirurgia: ☐ sim ☐ não

1. Data: __/__/__
2. 1=cone 2= Histerectomia total 3=WMeigs 4=Histerectomia subtotal e linfadenectomia pélvica 5= Salpingooforectomia bilateral 6= Histerectomia pós-tratamento
3. Via: A=abdominal L=laparoscópica V=vaginal
4. Tamanho do tumor ao AP ____mm 0=não avaliado
5. Profundidade de invasão ____mm 0=não avaliado
6. Linfonodos removidos: ____Direita ____Esquerda 0=não avaliado
7. Linfonodos acometidos: ____Direita ____Esquerda
8. Paramétrio 0=não avaliado 1=acometido 2=livre
9. Margens 0=não avaliado 1=acometido 2=livre

Radioterapia: 0=não realizada 1=primária 2=paliativa/recidiva 3=adjuvante

1. Data início: __/__/__ Data do término: __/__/__
2. Dose: ____cGy
3. Boost: ____cGy
4. Braquiterapia: ____ cGy
5. Data início: __/__/__ Data do término: __/__/__
6. QTX concomitante à RTX 1=CDDP 0=não ou nome da droga exceto CDDP
7. Número de ciclos: ____

Quimioterapia:

1. QTX neoadjuvante 0= não ou nome da droga
2. Número de ciclos: ____
3. Progressão de doença: __/__/__
4. Local=L, Loco regional=LR, Distância = D

5. QTX paliativa 1a linha 0=não ou nome da droga ____ CDDP = cisplatina AUC= carboplatina

6. Número de ciclos: ____

7. QTX paliativa 2a linha 0=não ou nome da droga ____

8. Número de ciclos: ____

Data da última consulta: ____/____/____

Data do óbito: ____/____/____

Relacionado com a doença =1, outras causas=2, não sabido=0

Peso ao diagnóstico: ____ Altura ____ IMC: ____

KPS ao diagnóstico: ____ HB ao diagnóstico: ____

Paridade: ____ NA = sem dado no prontuário

Parceiros: ____ NA=sem dado no prontuário

Uso de ACO 0= não 1= sim 2= sem dados no prontuário

Menopausa: 1=pós menopausa 2 = pré-menopausa

Tabagismo: 1= sim 0= não

LES: 1= sim 0=não 2 = não conta no prontuário

HIV: 1= sim 0=não 2 = não conta no prontuário

Hepatite C: 1= sim 0=não 2 = não conta no prontuário

Papanicolaou: ultimo PAPA ml 1=até 1 ano anterior ao diagnóstico 2= entre 1ano e 5

anos 3=nunca fez exame ginecológico 4= há mais de 5 anos 5= N/descrito

Dor: 1=Sim Sangramento: 1=sim

Emagrecimento: 1=sim

Corrimento: 1=sim

Segundo Primário: 1= Sim Local: ____

ANEXO IV – QUADRO DE FREQUÊNCIA DE TODOS OS GENÓTIPOS DO HPV NA POPULAÇÃO ESTUDADA

Genótipo HPV	Frequencia, n	Porcentagem, %
HPV11,62	1	0,2
HPV16	207	50,0
HPV16,18	2	0,5
HPV16,18,59-56-66	1	0,2
HPV16,31	3	0,7
HPV16,31,59-56-66	1	0,2
HPV16,33-58,45	1	0,2
HPV16,33,58	1	0,2
HPV16,35	1	0,2
HPV16,39-68-35	1	0,2
HPV16,39-68-35,52	1	0,2
HPV16,42	1	0,2
HPV16,45	1	0,2
HPV16,59-56-66	1	0,2
HPV18	36	8,7
HPV18,31	1	0,2
HPV18,33-58,39-68-35	1	0,2
HPV18,52	1	0,2
HPV31	14	3,4
HPV33	2	0,5
HPV33-58	24	5,8
HPV39-68-35	14	3,4
HPV45	19	4,6
HPV51,59-56-66	1	0,2
HPV52	8	1,9
HPV59	1	0,2
HPV59-56-66	12	2,9
HPVnegativo	57	13,8
Total	414	100,0

ANEXO V - CURVAS DE SOBREVIDA GLOBAL PARA CADA HPV ESTUDADO

Figura 1A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV16 positivas e HPV16 negativas

Log-rank=0,862 p=0,353

Figura 2A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV18 positivas e HPV18 negativas

Log-rank=1,832 p=0,176

Figura 3A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV33-58 positivas e HPV33-58 negativas

Log-rank= 0.934 p=0.334

Figura 4A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV31 positivas e HPV31 negativas

Log-rank= 1,654 p=0.198

Figura 5A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV45 positivas e HPV45 negativas

Log-rank=0,112 p=0,738

Figura 6A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV35-39-68 positivas e HPV35-39-68 negativas

Log-rank=0,814 p=0.367

Figura 7A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV56-59-66 positivas e HPV56-59-66 negativas

Log Rank=2,103 p=0.147

Figura 8A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV52 positivas e HPV52 negativas

Log-rank=0,510 p=0,475

Figura 9A - Curva de sobrevida global para pacientes HPV51 positivas e HPV51 negativas

Log-rank=1,385 p=0,239

Figura 10A - Curva de sobrevida para as pacientes com estadiamento FIGO (2009) completo

Log-rank=133,145 $p < 0,001$

REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado MP, Piñeros M. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 11:L1-15.
2. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K1-16.
3. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12 - 19.
4. Ayres AR, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2010;44(5):963-974.
5. Lau YM, Cheung TH, Yeo W, et al. Prognostic implication of human papillomavirus types and species in cervical cancer patients undergoing primary treatment. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122557.
6. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2014;135(2):453-466.
7. Meanwell CA, Kelly KA, Wilson S, et al. Young age as a prognostic factor in cervical cancer: analysis of population based data from 10,022 cases. *BMJ*. 1988;296(6619):386-391.
8. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048-1056.
9. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(19):1361-1368.
10. Lai C-H, Chang C-J, Huang H-J, et al. Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *J Clin Oncol*. 2007;25(24):3628-3634.
11. Yang SH, Kong SK, Lee SH, Lim SY, Park CY. Human papillomavirus 18 as a poor prognostic factor in stage I-IIA cervical cancer following primary surgical treatment. *Obstet Gynecol Sci*. 2014;57(6):492-500.

12. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):303-315.
13. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011;128(4):927-935.
14. Baalbergen A, Smedts F, Ewing P, Snijders PJ, Meijer CJ, Helmerhorst TJ. HPV-type has no impact on survival of patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2013;128(3):530-534.
15. de Cremoux P, de la Rochefordière A, Savignoni A, et al. Different outcome of invasive cervical cancer associated with high-risk versus intermediate-risk HPV genotype. *Int J Cancer.* 2009;124(4):778-782.
16. Tong SY, Lee YS, Park JS, Namkoong SE. Human papillomavirus genotype as a prognostic factor in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(6):1307-1313.
17. Zampronha RA, Freitas-Junior R, Murta EF, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 and the prognosis of patients with stage I cervical cancer. *Clinics.* 2013;68(6):809-814.
18. Amaro-Filho SM, Golub JE, Nuovo GJ, et al. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort. *PLoS One.* 2013;8(3):e57810.
19. Rocha VR, Schuffner Rde O, Soares, II, et al. Cervical uterine lesions: an epidemiological and molecular investigation in midwestern Minas Gerais, Brazil. *J Med Virol.* 2013;85(5):860-865.
20. Chagas BS, Batista MV, Guimaraes V, Balbino VQ, Crovella S, Freitas AC. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. *Gynecol Oncol.* 2011;123(2):284-288.
21. Coser J, da Rocha Boeira T, Simon D, Kazantzi Fonseca AS, Ikuta N, Lunge VR. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. *Genet Mol Res.* 2013;12(4):4276-4285.
22. de Oliveira CM, Fregnani JH, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer.* 2013;13:357.

23. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;88(1):63-73.
24. Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518 - 527.
25. Matsukura T, Sugase M. Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology*. 2001;283(1):139-147.
26. Antonsson A, Hansson BG. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virol*. 2002;76(24):12537-12542.
27. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol*. 2000;74(24):11636-11641.
28. de Villiers EM. Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother*. 1998;52(1):26-33.
29. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991;60(6):1445-1456.
30. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003;22(33):5201-5207.
31. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010;40(1):1-13.
32. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
33. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-79.
34. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005;366(9490):991-998.

35. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F55-70.
36. Bosch FX, Broker TR, Forman D, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013;31 Suppl 7:H1-31.
37. Franceschi S, Plummer M, Clifford G, et al. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. *Br J Cancer*. 2009;101(5):865-870.
38. Husain RS RV. Global variation of human papillomavirus genotypes and selected genes involved in cervical malignancies. *Ann Glob Health*. 2015;81(5):675-683.
39. Bravo IG, Felez-Sanchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health*. 2015;2015(1):32-51.
40. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer*. 2002;2(5):342-350.
41. Boccardo E, Manzini Baldi CV, Carvalho AF, et al. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):521-531.
42. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. 2001;82(1):15-33.
43. Moscicki A-B, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006;24, Supplement 3(0):S42-S51.
44. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338(7):423-428.
45. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-265.
46. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol*. 2000;151(12):1158-1171.
47. Susanne K. Kjær KF, Christian Munk, Thomas Iftner. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human

- papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(19):1478-1488.
48. Campos NG, Burger EA, Sy S, et al. An updated natural history model of cervical cancer: derivation of model parameters. *Am J Epidemiol.* 2014;180(5):545-555.
 49. Crow JM. HPV: The global burden. *Nature.* 2012;488(7413):S2-S3.
 50. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 Available at: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>.
 51. Franceschi S, Denny L, Irwin KL, et al. Eurogin 2010 roadmap on cervical cancer prevention. *Int J Cancer.* 2011;128(12):2765-2774.
 52. Papanicolaou GN. Cytological evaluation of smears prepared by the tampon method for the detection of carcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1954;7(6):1185-1190.
 53. Koss LG, Durfee GR. Cytological changes preceding the appearance of in situ carcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1955;8(2):295-301.
 54. RM R. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973;8:301-328.
 55. Villa LL, Denny L. Chapter 7: Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynecol Obstet.* 2006;Suppl 1:S71-80.
 56. Dyson N HP, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243(4893):934-937.
 57. Boyer SN WD, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996;56(20):4620-4624.
 58. Sano T OT, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1741-1748.
 59. Klaes R FT, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92(2):276-284.

60. Guimarães MC GM, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(4):509-516.
61. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ.* 2015;350:h2372.
62. Mayrand M-H, Duarte-Franco E, Rodrigues I, et al. Human papillomavirus dna versus papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1579-1588.
63. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1(1386-6532 (Print)):S43-51.
64. Denny L, Adewole I, Anorlu R, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in invasive cervical cancer in sub-Saharan Africa. *Int J Cancer.* 2014;134(6):1389-1398.
65. Wright TC, Jr., Stoler MH, Agreda PM, et al. Clinical performance of the BD Onclarity HPV assay using an adjudicated cohort of BD SurePath liquid-based cytology specimens. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(1):43-50.
66. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J. Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):449-459.
67. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-459.
68. Brito EB MS, Menezes RC. Human Papillomavirus in Amerindian women from Brazilian Amazonia. *Epidemiol Infect.* 2002;128:485-489.
69. Lai H-C, Sun C-A, Yu M-H, Chen H-J, Liu H-S, Chu T-Y. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papilloma virus type 58 and related types. *Int J Cancer.* 1999;84(6):553-557.
70. da Silva MC, Martins HP, de Souza JL, et al. Prevalence of HPV infection and genotypes in women with normal cervical cytology in the state of Parana, Brazil. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286(4):1015-1022.
71. Camara GN CD, Oliveira AP, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesion in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(7):879-883.

72. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(2):181-184.
73. Levi J. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*. 2004;92(1):225-231.
74. Queiroz C TA, Studart E, Araújo Filho JB, Sarmo CK, Pinheiro CC. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(5):356-362.
75. Carvalho MO, Carestiato FN, Perdigao PH, et al. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*. 2005;9(5):398-404.
76. Tozetti IA SI, Kowski VL, Ferreira AW, Levi JE. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2006;10(5):309-310.
77. Pereira CR RM, Vasconcelos GA, Faria PC, Cavalcanti SM, Oliveira LH. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(3):651-660.
78. Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(5):297-301.
79. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-1145.
80. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil 2014. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
81. Arbyn M, Castellsague X, de Sanjose S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*. 2011;22(12):2675-2686.
82. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
83. Dizon DS, Mackay HJ, Thomas GM, et al. State of the science in cervical cancer: where we are today and where we need to go. *Cancer*. 2014;120(15):2282-2288.

84. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-2917.
85. Waxman AG. Guidelines for cervical cancer screening: history and scientific rationale. *Clin Obstet Gynecol*. 2005;48(1):77-97.
86. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006;24, Supplement 3(0):S63-S70.
87. Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C, et al. Trends in mortality from major cancers in the Americas: 1980-2010. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1843-1853.
88. Albrow R, Kitchener H, Gupta N, Desai M. Cervical screening in England: the past, present, and future. *Cancer Cytopathol*. 2012;120(2):87-96.
89. INCA. Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. In: Saúde Md, ed. Rio de Janeiro 2011.
90. Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SF, et al. [Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer]. *Rev Saude Publica*. 2008;42(1):123-130.
91. Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K53-61.
92. Guan P, Howell-Jones R, Li N, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(10):2349-2359.
93. Kim KS, Park SA, Ko KN, Yi S, Cho YJ. Current status of human papillomavirus vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014;3(2):168-175.
94. Brotherton JM. Human papillomavirus vaccination: where are we now? *J Paediatr Child Health*. 2014;50(12):959-965.
95. Brasil. Ministério da Saude. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Informativa n. 149. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2015.
96. Wheeler CM. HPV genotypes: implications for worldwide cervical cancer screening and vaccination. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1013-1014.
97. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1085-1092.

98. Roteli-Martins CM, Longatto Filho A, Hammes LS, et al. Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29:580-587.
99. Harris TG, Kulasingam SL, Kiviat NB, et al. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Epidemiol.* 2004;159(9):834-842.
100. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Steven E. SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(12):868-873.
101. Meeuwis KA, van Rossum MM, van de Kerkhof PC, Hoitsma AJ, Massuger LF, de Hullu JA. Skin cancer and (pre)malignancies of the female genital tract in renal transplant recipients. *Transp Int* 2010;23(2):191-199.
102. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Clarke AE. Malignancy in systemic lupus erythematosus: what have we learned? *Best Pract Res Clin Rheum.* 2009;23(4):539-547.
103. La Vecchia C, Boccia S. Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(2):110-112
110.1097/CEJ.0000000000000000.
104. Gadducci A, Barsotti C, Cosio S, Domenici L, Riccardo Genazzani A. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27(8):597-604.
105. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):103-104.
106. Tavares MBAC, Sousa RB, Silva TOe, et al. Prevalence of prognostic factors for cancer of the uterine cervix after radical hysterectomy. *Sao Paulo Med J.* 2009;127(3):145-149.
107. Ho KC, Wang CC, Qiu JT, et al. Identification of prognostic factors in patients with cervical cancer and supraclavicular lymph node recurrence. *Gynecol Oncol.* 2011;123(2):253-256.
108. Huang HJ, Huang SL, Lin CY, et al. Human papillomavirus genotyping by a polymerase chain reaction-based genechip method in cervical carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy plus radical surgery. *Intl J Gynecol Cancer.* 2004;14(4):639-649.

109. Castro FA, Koshiol J, Quint W, et al. Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods. *BMC Infect Dis.* 2015;15:544.
110. Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 1994;69(1):114-119.
111. Rama CH, Villa LL, Pagliusi S, et al. Seroprevalence of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in young primiparous women in Sao Paulo, Brazil. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20(8):1405-1410.
112. Wright AA, Howitt BE, Myers AP, et al. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer.* 2013;119(21):3776-3783.
113. Herrington CS. Do HPV-negative cervical carcinomas exist?--revisited. *J Pathol.* 1999;189(1):1-3.
114. Noronha V, Mello W, Villa L, et al. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:235-240.
115. Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MG, et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. *BMC Res Notes.* 2010;3(1):96.
116. Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, et al. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J Med Virol.* 2012;84(10):1628-1635.
117. Sanchez-Lander J, Cortinas P, Loureiro CL, et al. Human papillomavirus in invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 in Venezuela: a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(5):e284-287.
118. Munoz N, Bosch F, Castellsague X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004;111(2):278 - 285.
119. Wheeler C, Hunt W, Joste N, Key C, Quint W, Castle P. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(7):475 - 487.
120. Zsemlye M. High-grade cervical dysplasia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2008;35(4):615-621; ix.

121. Lorenzato F, Ho L, Terry G, et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer*. 2000;10(2):143-150.
122. Benedetto C, Salvagno F, Canuto EM, Gennarelli G. Obesity and female malignancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015;29(4):528-540.
123. Fujiwara K, Monk B, Devouassoux-Shisheboran M. Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: Why Is it Different? *Curr Oncol Rep*. 2014;16(12):1-9.
124. Noh JM, Park W, Kim YS, et al. Comparison of clinical outcomes of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in uterine cervical cancer patients receiving surgical resection followed by radiotherapy: a multicenter retrospective study (KROG 13-10). *Gynecol Oncol*. 2014;132(3):618-623.
125. Huang LW, Chao SL, Hwang JL. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer*. 2004;100(2):327-334.
126. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(7):1274-1280.
127. Levi JE, Fernandes S, Tatenno AF, et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*. 2004;92(1):225-231.
128. Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
129. Pilch H GS, Schäffer U, Tanner B, Brockerhoff P, Maeurer M, Höckel M, Hommel G, Knapstein PG. The presence of HPV DNA in cervical cancer-correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic. *Int J Gynecol Cancer*. 2001;11(1):39-48.