



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ALEJANDRA MARÍA MARADIAGA ORTEGA

**PERSISTÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) APÓS TRATAMENTO DO
CÂNCER DO COLO UTERINO NO NORTE DO BRASIL**

BELÉM-PA

2019

ALEJANDRA MARÍA MARADIAGA ORTEGA

**PERSISTÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) APÓS TRATAMENTO DO
CÂNCER DO COLO UTERINO NO NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiola E. Villanova

BELÉM-PA

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pela
autora**

O77p Ortega, Alejandra María Maradiaga.
Persistência do Papilomavírus humano (HPV) após tratamento do câncer do colo
uterino no norte do Brasil / Alejandra María Maradiaga Ortega. — 2019.
91 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Fabiola Elizabeth Villanova
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais,
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Papilomavírus. 2. Câncer de colo uterino. I. Título.

CDD 616.99466

ALEJANDRA MARÍA MARADIAGA ORTEGA

**PERSISTÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) APÓS TRATAMENTO DO
CÂNCER DO COLO UTERINO NO NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fabiola Elizabeth Villanova

Orientadora - NMT/UFPA

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii

Membro da banca- NMT/ UFPA

Profa. Dra. Esther Iris Cristina Freifrau Von Ledebur

Membro da banca- ICB/ UFPA

Profa. Dra. Luisa Caricio Martins

Membro da banca- NMT/ UFPA

Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Suplente- NMT/ UFPA

Dedico esta dissertação aos meus pais,
por seu apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos, por ser minha luz e suporte em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais: Santiago e Julia, porque com seu amor, paciência e esforço, me ajudaram a chegar até aqui. Obrigada por nunca me deixarem desistir mesmo nos momentos mais difíceis. Acima de tudo, obrigada por me permitirem conhecer o mundo, traçar meu caminho e andar com meus próprios pés.

Aos meus irmãos: Ana, obrigada por seus conselhos e palavras de incentivo nos dias difíceis e, por estar comigo em todos os momentos importantes da minha vida. Josué, obrigada por sempre me motivar a dar o melhor de mim e por ser meu apoio incondicional. Sindy, obrigada por seus conselhos e por acreditar que sou capaz de realizar tudo o que me propor.

Ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC), à Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), agradeço a confiança depositada em mim e a oportunidade de estudar neste maravilhoso país. Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento do Projeto 459084/2014-3 sem o qual não teria sido possível este estudo.

À Universidade Federal do Pará, especialmente ao Núcleo de Medicina Tropical e a todos seus docentes e colaboradores, por me abrir as portas, me receber e me fazer sentir em casa. Obrigada pela paciência e ajuda.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Fabiola Villanova, por ter me aceitado como sua aluna, ter acreditado em mim e por ter me feito parte deste maravilhoso projeto de pesquisa. Muito obrigada pela ajuda, conselhos e, por ter compartilhado seus conhecimentos comigo, sempre com muita paciência e dedicação.

À Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii, por ter me aberto as portas de seu laboratório e ter me feito sentir em casa desde o primeiro dia. Obrigada por me ajudar, me motivar nos dias difíceis e pelo apoio emocional que muitas vezes precisei.

À Profa. Dra. Esther Von Ledebur, e a Profa. Dra. Marizelle Araújo, por seus conselhos e carinho para comigo. Obrigada por ter me acolhido como parte da equipe do laboratório de Imunopatologia.

Aos médicos, Celso Fukuda e Renato Pantoja, pela ajuda, conselhos, e por ter me dado a oportunidade e confiança de realizar esta pesquisa nas dependências de seus consultórios.

Às pacientes do Hospital Ophir Loyola, pela confiança depositada neste projeto e sem as quais a realização desta pesquisa não teria sido possível.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de imunopatologia: Roberto Júnior, Carolina Moraes, Larysse Pedroza, Jéssica Gomes, Osvaldo Neto, Mayara Miranda, Marcela Rocha, Leandro Santos, Amanda Raiol, e Laysse Garcia; pelo apoio nos momentos difíceis e por ter me escutado e ajudado sempre que precisei. Sempre me lembrarei e carregarei vocês no meu coração.

Aos melhores amigos que a vida me deu: Glenda del Cid, Joel García, Keila Ramos e Varinia Acosta, por me acompanhar nesta aventura e estar sempre perto de mim. Obrigada pelo carinho e por ser o melhor grupo de apoio nos últimos anos.

As minhas amigas Catalina Henao, Ana Cristiana Erazo e Mariangela Guanipa, por ter compartilhado comigo momentos maravilhosos nestes dois anos e, por ter preenchido meus dias de alegria.

Aos meus tios Ángel e Alodia Ortega, pelo carinho e apoio permanente ao longo dos anos.

Ao Dr. Wilfredo Sosa, por ter acreditado sempre nas minhas habilidades como microbiologista e por me motivar sempre dar o melhor de mim.

“Nem sempre você terá uma vida confortável e nem sempre você estará apta a solucionar todos os problemas do mundo de uma vez. Mas nunca subestime a sua importância, porque a história já nos mostrou que a coragem pode ser contagiosa e que a esperança pode ter vida própria.”

Michelle Obama

RESUMO

O câncer de colo uterino (CCU) é depois do câncer de mama, a principal causa oncológica de morte entre mulheres que vivem em países em desenvolvimento. O CCU é o terceiro câncer mais incidente no Brasil e sem considerar os tumores de pele não melanoma é o primeiro mais incidente na região Norte do Brasil. O vírus do *Papiloma humano-HPV* é considerado o agente causal do CCU e associado a diferentes fatores de risco inerentes a cada mulher (comportamentais, reprodutivos e socioeconômicos), determina o desenvolvimento desta doença. A infecção pelo HPV é na maioria das vezes, assintomática e transiente; porém, 10-20% das infecções causadas principalmente por genótipos de alto risco oncogênico do vírus podem persistir e levar ao CCU invasivo. O objetivo deste estudo foi investigar a persistência do HPV em amostras cervicais em mulheres com CCU, após ser tratadas com radioterapia e/ou quimioterapia concomitante, com o fim de determinar se a infecção com o vírus, pode ser um fator de risco de recorrência da doença ou estar associado a um pior prognóstico. No período de julho de 2015 a julho de 2018, foram selecionadas 44 pacientes, com idade média de 47 anos, com CCU (em estádios da doença IB1-IVB), atendidas no Hospital Ophir Loyola, centro de referência oncológica no estado de Pará. Foram coletados dados clínico-epidemiológicos e duas amostras de esfregaço de cérvix (uma anterior e outra posterior ao tratamento) totalizando 88 amostras para o diagnóstico do HPV. As amostras foram analisadas por Reação em Cadeia da Polimerase (*Nested PCR*) para detectar a presença do DNA do HPV; e foram genotipadas para 9 tipos virais (dois de baixo risco: 6 e 11, e sete de alto risco oncogênico: 16,18,31,33,35,52,58) por PCR em tempo real. Verificou-se que a maioria das pacientes foram tratadas por câncer epidermóide no estágio IIB da doença; e que antes do tratamento o HPV estava presente em 93% (41/44) das pacientes, persistindo em 75% (33/44) delas, após o término do tratamento. Sete genótipos virais foram detectados (HPV 6,16, 18, 33, 35, 52 e 58) causando tanto infecções simples quanto infecções múltiplas, sendo o HPV 16 o genótipo mais prevalente. Foi evidenciado que o tratamento com radioterapia/quimioterapia concomitante é efetivo para eliminar o vírus, porém se necessitam mais estudos para determinar se a presença do vírus influencia na resposta final ao tratamento. Tornando evidente a necessidade de implementar estratégias de prevenção e controle deste tipo de câncer, baseadas na detecção do DNA do HPV.

Palavras-chave: *Papilomavírus*. Câncer de colo uterino. Persistência viral

ABSTRACT

The cervical cancer is, after breast cancer, the leading oncologic cause of death among women living in developing countries. The cervical cancer is the third most incident cancer in Brazil and without considering non-melanoma skin tumors is the most incident in the northern region of Brazil. Human papillomavirus-HPV is considered the causal agent of cervical cancer and associated with different risk factors inherent to each woman (behavioral, reproductive and socioeconomic), determines the development of this disease. The HPV infection is most often asymptomatic and transient; however, 10-20% of infections caused mainly by genotypes of high oncogenic risk of the virus may persist and lead to invasive cervical cancer. The objective of this study was to investigate the persistence of HPV in cervical specimens in women with invasive cervical cancer after being treated with radiotherapy and / or concomitant chemotherapy in order to determine if the infection with the virus may be a risk factor for recurrence of disease or be associated with a worse prognosis. Forty four patients were selected, from July 2015 to July 2018, with a mean age of 47 years, with cervical cancer (at stages IB1-IVB of disease), attended at Ophir Loyola Hospital, an oncological reference center in the state of Pará. Clinical-epidemiological data and two cervical smear samples (one prior and one post-treatment) were collected, totaling 88 samples for the diagnosis of HPV. Samples were analyzed by Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) to detect the presence of HPV DNA; and were genotyped for 9 viral types (two low risk: 6 and 11, and seven high oncogenic risk: 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58) by real-time PCR. It was verified that the majority of the patients were treated by epidermoid cancer in stage IIB of the disease; and that prior to treatment HPV was present in 93% (41/44) of the patients, persisting in 75% (33/44) of them, at the end of treatment. Seven viral genotypes were detected (HPV 6, 16, 18, 33, 35, 52 and 58) causing both single and multiple infections, with HPV 16 being the most prevalent genotype. It has been shown that treatment with concomitant radiotherapy / chemotherapy is effective to eliminate the virus, but more studies are needed to determine if the presence of the virus influences the final response to treatment. Making evident the need to implement strategies of prevention and control of this type of cancer, based on the detection of HPV DNA.

Key words: *Papillomavirus*. Cervical cancer. Viral persistence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano 2018, exceto o câncer de pele não melanoma. | 22 |
| Figura 2- Representação espacial das taxas brutas de incidência por cada 100 mil mulheres da neoplasia maligna do colo do útero estimada para o ano 2018..... | 23 |
| Figura 3- Árvore filogenética mostrando os gêneros do Papilomavírus humano | 24 |
| Figura 4- Representação gráfica da organização genômica do Papilomavírus humano | 25 |
| Figura 5- Ciclo replicativo do HPV..... | 28 |
| Figura 6- Integração do <i>Papilomavírus humano</i> | 29 |
| Figura 7- Degradação e inativação do supressor tumoral p53 e pRb por E6 e E7 do HPV de alto risco..... | 30 |
| Figura 8- Progressão natural do câncer de colo uterino..... | 32 |
| Figura 9- Captura Híbrida para a detecção do HPV | 37 |
| Figura 10- Estadiamento do câncer uterino usando o sistema da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO)..... | 39 |
| Figura 11- Abordagem terapêutica das pacientes com câncer de colo uterino invasivo | 42 |
| Figura 12 -Produtos de amplificação da <i>Nested</i> - PCR, em gel de agarose. | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com a presença do DNA do HPV antes e depois do tratamento oncológico, atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 54 |
| Tabela 2- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características sociodemográficas, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 55 |
| Tabela 3- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características sociodemográficas, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 56 |
| Tabela 4- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com a exposição ao fumo durante a vida e o hábito de consumir bebidas alcoólicas, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 56 |
| Tabela 5- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com os antecedentes ginecológicos, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 57 |
| Tabela 6- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características sociodemográficas, hábitos de vida e antecedentes ginecológicos e a presença/ausência do DNA do HPV tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico; que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 58 |
| Tabela 7- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características do tumor e o tratamento oncológico que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 60 |
| Tabela 8- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com presença do DNA do HPV, o genótipo viral e o tipo de infecção antes e após o tratamento oncológico, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 62 |
| Tabela 9- Distribuição das 44 pacientes com câncer de colo uterino de acordo com o estágio FIGO da doença, a idade, a presença dos genótipos do HPV (antes e após o tratamento), o tempo transcorrido entre a coleta das amostras e a resposta final ao tratamento oncológico; que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 63 |
| Tabela 10- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com a modalidade terapêutica, presença de doença residual, resposta final ao tratamento, tempo transcorrido entre a coleta das amostras e a presença/ausência do DNA do HPV tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico ; que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018. | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| AT | Antes do tratamento |
| BT | Braquiterapia |
| CCU | Câncer de colo uterino |
| CH | Captura híbrida |
| CH II | Captura híbrida de segunda geração |
| CIS | Carcinoma <i>in situ</i> |
| CL | Controle local |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DT | Depois do tratamento |
| DP | Desvio padrão |
| E6-AP | <i>E6-associated protein ligase</i> |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FI | Fundamental incompleto |
| FIGO | Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia |
| FISH | <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> |
| FPTA | Fora de Possibilidade Terapêutica Atual |
| Hb | Hemoglobina |
| HOL | Hospital Ophir Loyola |
| HPV | <i>Papilomavírus humano</i> |
| HR | Histerectomia radical |
| HR-HPVs | <i>Papilomavírus humano</i> de alto risco oncogênico, do inglês <i>High Risk</i> |

| | |
|----------------|---|
| HSIL | Lesões intraepiteliais cervicais de alto grau |
| HSV-2 | <i>Vírus do herpes simples 2</i> |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |
| IFN-β | Interferon- <i>beta</i> |
| IN | Indeterminado |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| IST | Infecções Sexualmente Transmissíveis |
| JEC | Junção Escamo Colunar |
| LC | Controle local |
| LCR | Região Longa de Controle |
| LN | Linfadenectomia |
| LR-HPVs | <i>Papilomavírus humano</i> de baixo risco oncogênico do inglês <i>Low Risk</i> |
| LSIL | Lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau |
| MHC-1 | Complexo Maior de Histocompatibilidade classe I |
| N | Negativo |
| NIC | Neoplasias intraepiteliais cervicais |
| NMT | Núcleo de Medicina Tropical |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ORF | <i>Open Reading frame</i> |
| PCCU | Preventivo do Câncer de Colo Uterino |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PET | Tomografia por emissão de positrões |
| PRb | Proteína de retinoblastoma |

| | |
|--------------------------------|--|
| QT | Quimioterapia |
| RM | Ressonância magnética |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensageiro |
| RT | Radioterapia |
| TAP1 | <i>Transporter associated with antigen protein 1</i> |
| TC | Tomografia computadorizada |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TLR 9 | <i>Toll-like receptor 9</i> |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral-alpha |
| UFPA | Universidade Federal do Pará |
| URR | <i>Upstream Regulatory Region</i> |
| VLPs | <i>Virus-like particles</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------------|------------------|
| cGy | <i>CentiGrey</i> |
| cm | Centímetro |
| dl | Decilitros |
| g | Gramas |
| H₂O | Água |
| m² | Metro quadrado |
| mg | Miligramas |
| ml | Mililitros |
| °C | Graus Celsius |
| pb | Pares de bases |
| µg | Microgramas |
| µl | Microlitro |
| µM | Micromolar |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 22 |
| 2.1 Epidemiologia do câncer do colo uterino | 22 |
| 2.2 HPV: classificação e estrutura genômica | 23 |
| 2.3 O ciclo de vida do <i>Papilomavírus humano</i> | 26 |
| 2.4 Carcinogênese e mecanismo de transformação | 29 |
| 2.5 Evolução da infecção pelo HPV ao câncer do colo do útero..... | 31 |
| 2.6 Persistência da infecção pelo HPV no brasil | 34 |
| 2.7 Diagnóstico do câncer de colo uterino | 35 |
| 2.8 Procedimentos para determinar o estágio do câncer de colo uterino..... | 38 |
| 2.9 Tratamento do câncer de colo uterino segundo o estágio do tumor..... | 40 |
| 2.10 Modalidades terapêuticas utilizadas no câncer de colo uterino | 43 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 45 |
| 4. OBJETIVOS | 46 |
| 4.1 Objetivo geral..... | 46 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 46 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 5.1 Desenho do estudo | 47 |
| 5.2 Local do estudo | 47 |
| 5.3 População de estudo e amostra..... | 47 |
| 5.3.1 Critérios de inclusão | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.2 Critérios de exclusão | 48 |
| 5.4 Coleta de dados epidemiológicos..... | 48 |
| 5.5 Coleta de material biológico..... | 48 |
| 5.6 Métodos laboratoriais | 49 |
| 5.6.1 Extração de ácidos nucléicos | 49 |
| 5.6.2 PCR para β - globina..... | 49 |
| 5.6.3 Detecção do genoma do HPV | 50 |
| 5.6.4 PCR1 para a detecção do HPV com os primers MY9 e MY11 | 50 |
| 5.6.5 PCR2 (Nested) com os primers GP5 e GP6..... | 51 |
| 5.6.6 Genotipagem do HPV..... | 52 |
| 5.7 Análises estatística | 52 |
| 5.8 Avaliação ética da pesquisa | 52 |
| 5.9 Riscos e benefícios da pesquisa | 53 |
| 6. RESULTADOS..... | 54 |
| 6.1 Presença do DNA do HPV antes e após o término do tratamento..... | 54 |
| 6.2 Características das pacientes avaliadas | 54 |
| 6.2.1 Perfil das pacientes segundo o tratamento oncológico | 59 |
| 6.2.2 Genótipos virais encontrados tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico..... | 61 |
| 7. DISCUSSÃO | 66 |
| 8. CONCLUSÕES | 75 |
| REFERÊNCIAS..... | 77 |
| APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 87 |

| | |
|--|-----------|
| APÊNDICE B – FORMULARIO APLICADO ANTES DO TRATAMENTO | 89 |
| APÊNDICE C– FORMULARIO APLICADO APÓS TRATAMENTO | 90 |
| ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL..... | 91 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino (CCU) é um dos mais frequentes nas mulheres é, depois do câncer de mama, a principal causa oncológica de morte entre mulheres que vivem em países em desenvolvimento. De modo geral, o câncer de colo uterino corresponde a aproximadamente 12% de todos os tipos de câncer femininos no mundo (OMS, 2017).

A infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV) tem sido reconhecida como o principal fator etiológico para o desenvolvimento desta doença. O médico alemão Zur Hausen iniciou alguns estudos que visavam estabelecer uma relação entre a infecção pelo HPV e o câncer, impulsionado pela literatura médica que demonstrava a conversão das lesões de condiloma acuminado (lesão benigna que tem como fator etiológico os HPV 6 e 11) em carcinomas epidermóides. Por volta da década dos oitenta, o DNA do HPV 11 foi demonstrado em amostras de carcinoma cervical, e posteriormente, utilizando esse genótipo de HPV como sonda, foi possível isolar um novo DNA do HPV diretamente de biópsias de câncer do colo do útero, o HPV 16. Pouco tempo depois, o HPV 18 também foi identificado e caracterizado em biópsias de câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2009)

Hoje em dia aproximadamente 184 genótipos de HPV diferentes foram identificados, e só 40 podem infectar a região ano genital e apenas os tipos de alto risco oncogênico (entre eles os HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56) estão associados ao câncer (INTHARABURAN et al., 2012).

No entanto, a maioria das infecções por *Papilomavírus humano* (HPV) são assintomáticas e transitórias. Uma pequena porcentagem de casos progride para carcinoma invasivo do colo do útero, sendo que aspectos relacionados ao vírus, como o genótipo viral (principalmente os tipos 16 e 18), a persistência e integração do vírus ao hospedeiro, são os fatores mais importantes para a carcinogênese (ARIAS-PULIDO et al., 2006). Além de outros fatores ligados ao próprio hospedeiro, seja genéticos (como a resposta imunológica), comportamentais (uso de drogas lícitas, uso de contraceptivos, etc...), reprodutivos (número de filhos, parto vaginal, etc.) e fatores socioeconômicos, os quais são fatores de risco para a aquisição do HPV e a progressão das lesões pre-neoplásicas para o câncer. (CASTAÑEDA; TOLEDO; AGUILERA, 1998; HERNÁNDEZ et al., 2007; TREJO; ZARAGOZA; CUEVAS, 2012).

É bem conhecido que a patogênese do câncer do colo uterino começa como um processo lento onde ocorre à interrupção da diferenciação normal do epitélio pavimentoso estratificado, resultando em mudanças na sua estrutura e fisiologia (LÓPEZ et al., 2010). Devido à infecção pelo vírus, podem ocorrer displasias nas células cervicais, as quais foram classificadas como neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) de tipo 1, 2 e 3. As NIC e o carcinoma *in situ* (CIS), que é limitado ao epitélio, constituem lesões precursoras do CCU; e quando a lesão ultrapassa a lâmina basal é chamado de carcinoma invasivo (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

Dependendo da extensão da invasão e do acometimento de outros órgãos, o CCU é categorizado pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) em estágios de I a IV (SELLORS; SANKARANARAYANAN; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2004).

No câncer invasivo o planejamento do tratamento e avaliação do prognóstico, requer uma revisão detalhada da saúde geral da paciente e o estágio clínico e histológico do câncer. Assim por exemplo, quando o câncer está nos estágios mais iniciais o tratamento geralmente é a histerectomia (remoção cirúrgica do colo e corpo do útero). Nos estágios mais avançados da doença o tratamento deixa de ser cirúrgico e é realizada radioterapia, quimioterapia ou uma combinação de ambos os tratamentos (radio- quimioterapia concomitante) (INSTITUTO ONCOLOGIA, 2017).

Como afirmado anteriormente, a persistência do vírus é um dos fatores mais importantes para que a infecção evolua até o câncer, no entanto, hoje em dia são poucos os trabalhos que tem pesquisado a persistência molecular do HPV após o tratamento. Um estudo revelou uma persistência de 62,5% (10/16) em mulheres tratadas por rádio / quimioterapia (VENUTI, 2010), valor próximo ao 56,7% (55/97) detectado por NAGAI et al., (2004) em pacientes após conclusão do tratamento.

Outro trabalho mostrou que um teste de HPV positivo após a conclusão da radioterapia está fortemente associado com recorrência da doença e que as pacientes podem necessitar de testes para a detecção do HPV pelo menos durante os primeiros dois anos após a conclusão do tratamento (SONG et al., 2011a). Essas pesquisas sugerem que a detecção do HPV pode ser útil para o prognóstico das pacientes e que a persistência do DNA do HPV pode ser um preditor de recorrência da doença após o tratamento.


2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia do câncer do colo uterino

O câncer de colo do útero é considerado um problema de saúde pública devido a sua elevada incidência e alta taxa de mortalidade. Com aproximadamente 530 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é classificado como a quarta causa de câncer mais comum entre as mulheres excetuando-se os casos de pele não melanoma. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) este tipo de câncer é responsável por aproximadamente 270 mil óbitos por ano, dos quais mais de 85% são produzidos em países em desenvolvimento, principalmente da África, Ásia (meridional e central), América central e do Sul (OMS, 2015).

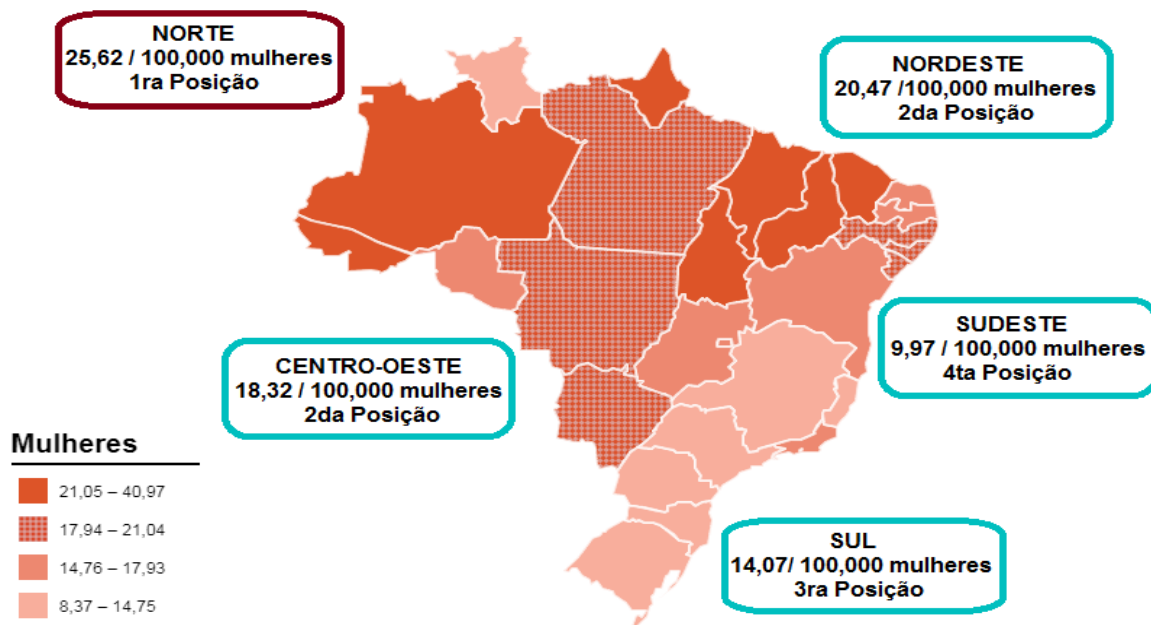
No Brasil, estimaram-se 16,370 casos novos desta doença para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, sendo o terceiro câncer mais incidente no país (Figura 1). Sem considerar os tumores de pele não melanoma o câncer de colo do útero é o primeiro mais incidente na região Norte (25,62 casos a cada 100 mil mulheres), onde só no estado de Pará, para o ano 2018 esperaram-se 860 casos novos, com 280 casos na capital de Belém. A região Nordeste, e Centro-oeste do país, ocupam a segunda posição com 20,47 casos / 100 mil mulheres e 18,32 casos / 100 mil mulheres respectivamente; enquanto a região Sul ocupa a terceira posição com 14,07 casos/ 100 mil mulheres e a região Sudeste ocupa a última posição com um número menor de casos (9,97/ 100 mil mulheres) (Figura 2).

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano 2018, exceto o câncer de pele não melanoma.

| | Localização Primária | Casos | % |
|--|-----------------------------|--------|-------|
| Mulheres  | Mama Feminina | 59.700 | 29,5% |
| | Cólon e Reto | 18.980 | 9,4% |
| | Colo do Útero | 16.370 | 8,1% |
| | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.530 | 6,2% |
| | Glândula Tireoide | 8.040 | 4,0% |
| | Estômago | 7.750 | 3,8% |
| | Corpo do Útero | 6.600 | 3,3% |
| | Ovário | 6.150 | 3,0% |
| | Sistema Nervoso Central | 5.510 | 2,7% |
| | Leucemias | 4.860 | 2,4% |

Fonte: INCA, 2018

Figura 2- Representação espacial das taxas brutas de incidência por cada 100 mil mulheres da neoplasia maligna do colo do útero estimada para o ano 2018



Fonte: Adaptado de INCA, 2018

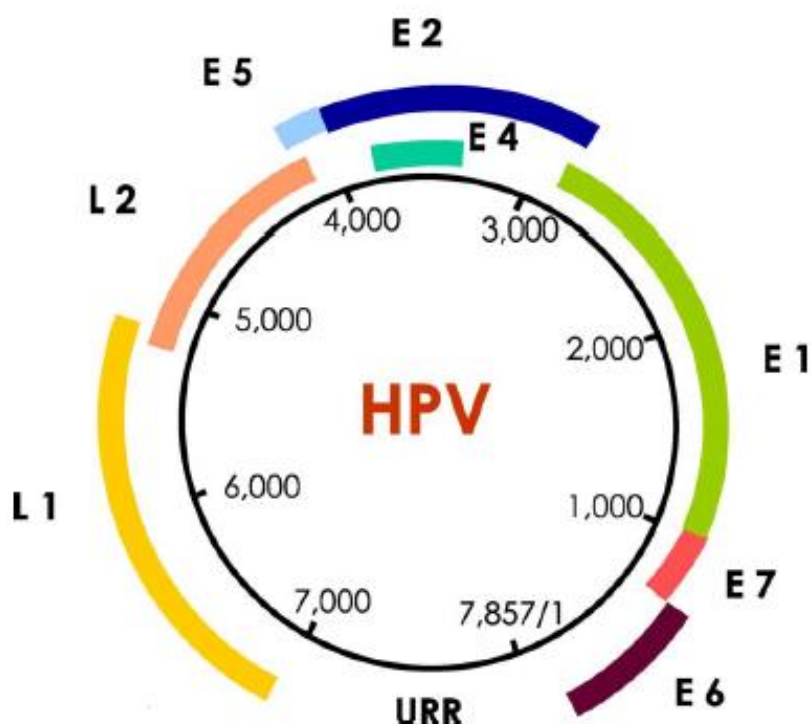
2.2 HPV: Classificação e estrutura genômica

De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), o *Papillomavírus humano* é membro da família *Papillomaviridae*, e tem sido agrupado em diferentes gêneros (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu*), de acordo com a estrutura do seu genoma viral e seu tropismo por células epiteliais (Figura 3). O gênero *Alpha* é considerado o gênero mais importante porque inclui os genótipos que foram descritos como causadores do câncer do colo uterino e suas lesões precursoras; enquanto as infecções pelos outros gêneros são geralmente associadas a lesões cutâneas e outro tipo de doenças como a *Epidermodisplasia verruciforme* (DE VILLIERS et al., 2004).

Os HPV encontrados em tumores benignos e em verrugas na pele e genitais permite classificá-los como de baixo risco oncogênico (do inglês *Low Risk* ou LR-HPVs) onde se encontram os HPV 6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 62, 64, 71, 72, 81, 83 e 84. Os tipos de alto risco oncogênico (do inglês *High Risk* ou HR-HPVs), estão associados ao câncer do colo uterino, e são os que apresentam maior risco ou probabilidade de provocar infecções persistentes; dentro deste grupo estão incluídos os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (BRENDLE; BYWATERS;

Os vírus do papiloma humano são vírus não envelopados de simetria icosaédrica, com um capsídeo composto por 72 capsômeros e um genoma de DNA dupla fita circular, com aproximadamente 8.000 pares de bases (AGUILAR; CAMPOS, 2007). O genoma do vírus é dividido em três diferentes regiões: a Região Longa de Controle ou URR, a região precoce e a tardia, como mostrado na figura 4.

Figura 4- Representação gráfica da organização genômica do Papilomavírus humano



L: proteínas tardias; **E:** proteínas precoces; **URR:** *Upstream Regulatory Region*.
Fonte: MUÑOZ et al., 2006

A Região Longa de Controle (LCR) é uma região não codificante ou URR (*Upstream Regulatory Region*), que contém elementos necessários para a replicação e regulação da transcrição do DNA viral. No HPV 16, por exemplo, existe um centro promotor chamado p97 ou p105 (no HPV 18) que permite o aumento ou silenciamento de seqüências que regulam a replicação de DNA controlando a transcrição de ORFs. Além disso, esta região contém a maior variação genética entre um tipo viral e outro (SILVA et al., 2013).

A região correspondente para as proteínas que se expressam precocemente, denominada região E (por sua abreviatura em inglês *Early*) representa o 45% do genoma total do HPV, e sua função principal é o controle da replicação viral. A região E, dependendo do tipo viral, pode conter seis ou oito

quadros de leitura aberta (ORFs, por sua abreviatura em Inglês), que são expressos a partir de mensagens policistrônicas de RNAm transcritos a partir de uma única fita de DNA (MAGÛES; GUILLERMO, 2015) . As proteínas expressas precocemente são: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, e têm diferentes funções:

A proteína **E1**, por exemplo, tem atividade de helicase, contribui para a manutenção do vírus na forma episossomal e pode estar ausente quando o DNA viral está integrado nas células do hospedeiro. Junto com E2 está envolvido na replicação viral, bem como na regulação da transcrição precoce do vírus (WILSON; FEHRMANN; LAIMINS, 2005).

A proteína **E2** regula os níveis da expressão dos outros produtos gênicos virais (como E6 e E7) e, dependendo do sítio de ligação ocupado na LCR, atua como um repressor ou ativador transcripcional. Além disso, tem um papel crítico na transferência do genoma viral para as células filhas durante a divisão da célula hospedeira. (IARC MONOGRAPHS, 2011; LISSABET; FÉLIX, 2014).

E4 e E5 são proteínas cujas funções ainda não estão bem definidas, mas sabe-se que têm um papel importante em facilitar a amplificação do genoma viral. Estão relacionadas com a regulação das vias de sinalização do fator de crescimento e com a capacidade do vírus para evadir o sistema imunológico (MATEOS-LINDEMANN et al., 2016).

As proteínas virais **E6 e E7** desempenham um papel central na transformação maligna celular, já que atuam cooperativamente no desenvolvimento do câncer do colo uterino.

A região tardia, do Inglês «*Late: L*» codifica para as proteínas **L1** (proteína maior) e **L2** (proteína menor) que formam o capsídeo viral e são expressas apenas em queratinócitos diferenciados da camada superficial da lesão, onde as partículas virais maduras são produzidas.

2.3 O ciclo de vida do *Papilomavírus humano*

De forma geral, o ciclo de vida do HPV está ligado ao programa de diferenciação da célula hospedeira infectada, os queratinócitos, (PINIDIS et al., 2016) mas a expressão dos níveis elevados das proteínas virais e montagem viral ocorrem exclusivamente nas camadas superiores do epitélio pavimentoso estratificado (ZALDÍVAR LELO DE LARREA et al., 2012).

Os HPV infectam as células basais (células que estão em contínua divisão e fornecem um reservatório de células para as regiões supra basais), através de micro lesões presentes na superfície do epitélio. Até agora, não foi bem definido qual o receptor que permite a entrada do vírus às células epiteliais. Foram sugeridos como receptores, a integrina $\alpha 6 \beta 4$ (BELTRÁN-LISSABET, 2014) e os proteoglicanos (heparan sulfato) os quais podem atuar como receptores primários do HPV, ao interagir com a porção carboxi-terminal da proteína L1 do vírus (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005).

Os vírus inicialmente se ligam aos receptores da lâmina basal nos sítios de trauma onde o capsídeo do vírus sofre uma mudança conformacional pela ação de uma furina que cliva a proteína L2. Após a entrada do HPV na célula, o genoma viral permanece como um elemento extra cromossomal em forma de epissoma (elemento genético autoreplicativo) no núcleo da célula infectada (ÁLVAREZ ALDANA; SEPÚLVEDA ARIAS; SILLER LÓPEZ, 2012).

Na forma epissomal, o genoma do vírus se mantém a um número de cópias baixo (isto é importante para escapar da vigilância imunológica do hospedeiro).

Acredita-se que o genoma viral é mantido de 10-200 cópias por célula na camada basal durante a infecção, e que as proteínas precoces virais (E6, E7, E1 e E2) são expressas em níveis baixos. (DOORBAR, 2005; HAMID; BROWN; GASTON, 2009). E1 e E2 cooperam para iniciar a replicação do DNA viral, enquanto E6 e E7 modulam os reguladores do ciclo celular para permitir a persistência de genomas epissômicos em células indiferenciadas. (BODILY; LAIMINS, 2011).

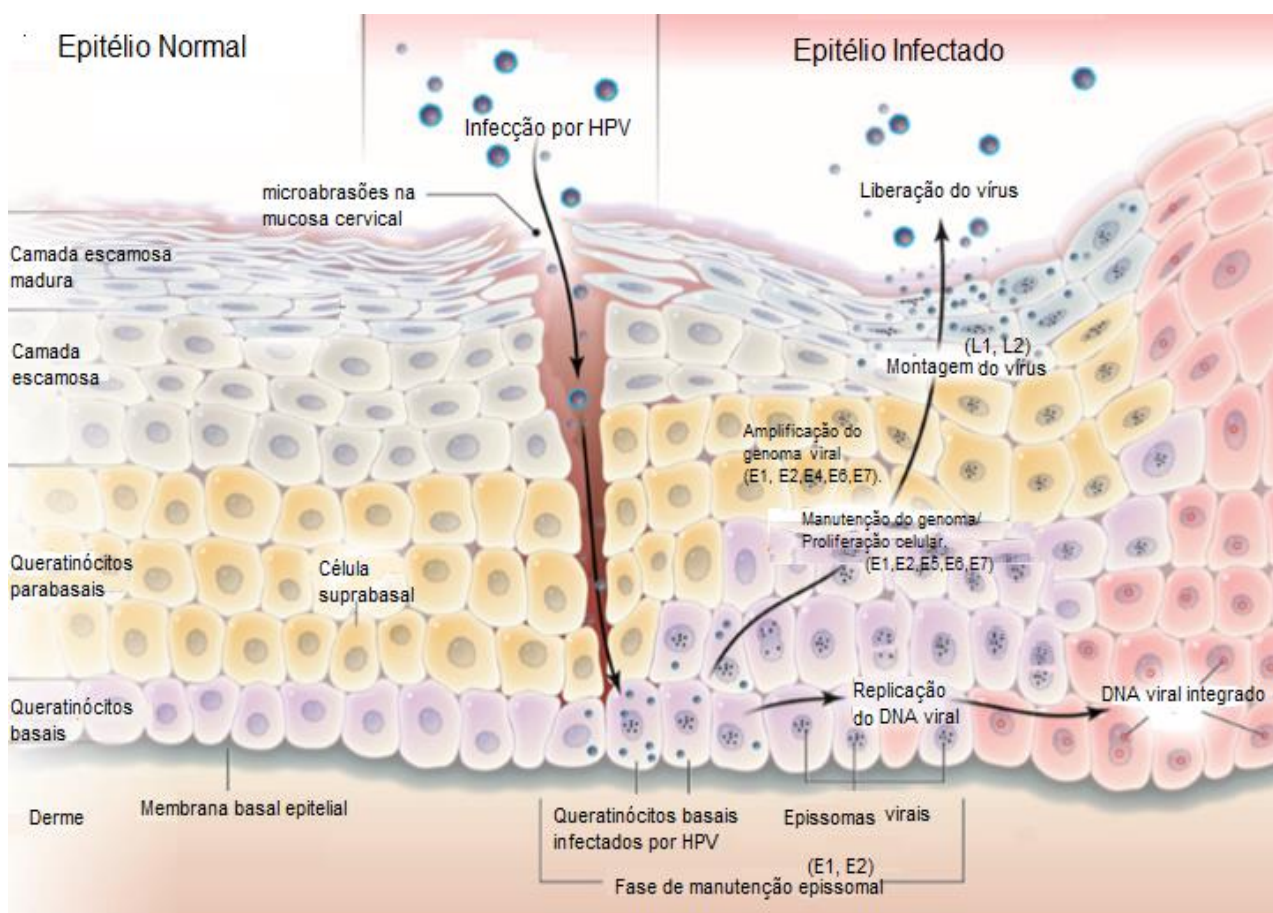
Ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Uma das células filhas migra da camada basal para as camadas superiores do epitélio e inicia o programa de diferenciação celular. Com a diferenciação, os níveis de transcrição dos genes virais aumentam (figura 5); como resultado, o número de cópias do vírus também aumenta (SENBA; MORI, 2012).

As demais células filhas continuam dividindo-se na camada basal e servem de reservatório de DNA viral para as posteriores divisões celulares. Finalmente, após a amplificação do genoma viral, as proteínas do capsídeo L1 e L2 do vírus são produzidas e os viriões são montados. Os viriões são liberados junto com as células descamadas, na ausência de lise ou necrose (os HPV não apresentam uma fase lítica) o que ajuda a evitar a resposta inflamatória (STANLEY, 2008). Como a produção das partículas víricas é restrita às camadas superiores do epitélio, as

células basais não são lisadas pela produção de novos vírus, e isto pode contribuir à permanência do vírus por longos períodos de tempo.

O ciclo de vida do HPV pode demorar de 2-3 semanas, tempo necessário para que a célula cervical migre da camada basal para a camada mais superficial do epitélio, possa amadurecer, sofrer senescência e apoptose. No entanto, para algumas infecções, principalmente com os tipos de HPV de alto risco oncogênico, as proteínas virais E6 e E7 são tão eficazes no bloqueio dos reguladores negativos do ciclo celular que as células infectadas nunca amadurecem continuando com a progressão do ciclo celular e impedindo a apoptose.

Figura 5- Ciclo replicativo do HPV



Fonte: Adaptado de KAHN, 2009

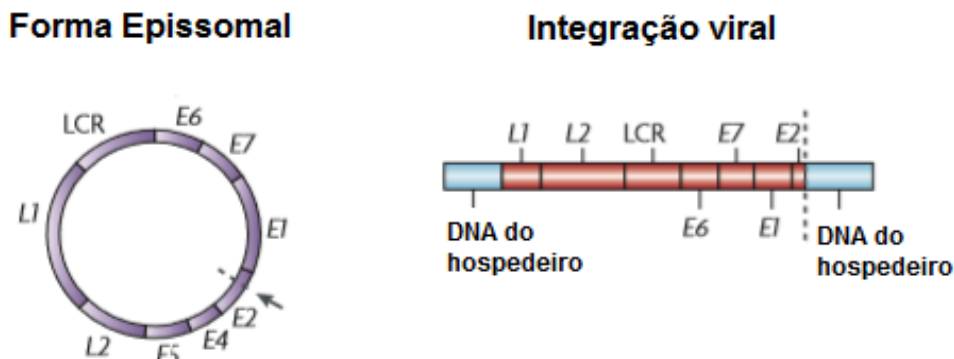
2.4 Carcinogênese e mecanismo de transformação

A infecção persistente com HPVs de alto risco oncogênico é necessária para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. Geralmente a maioria das mulheres infectadas resolve a infecção mediante diferentes mecanismos imunológicos, mas outras permanecem com infecção viral persistente, que após um longo período de latência podem chegar a desenvolver o câncer (ZUR HAUSEN, 2002).

No câncer de colo uterino, geralmente o genoma do vírus encontra-se integrado ao genoma da célula hospedeira (Figura 6). Durante o processo de integração ocorre a linearização do genoma circular, que é um passo necessário que envolve a quebra da cadeia dupla viral principalmente na região E1 / E2, sendo a região de E2 a que possui maior taxa de deleção (LÓPEZ e ARISTIZÁBAL, 2006).

Quando o vírus sofre deleção no gene E2, isso causa um aumento na transcrição dos genes E6 e E7, cruciais no processo de transformação celular.

Figura 6- Integração do *Papilomavírus humano*



Fonte: Adaptado de WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007.

Várias funções tem sido descritas para as proteínas E6 e E7; por exemplo: a síntese da proteína viral E6 permite criar um ambiente adequado para a produção de novas partículas virais ao alterar a expressão de outros genes celulares, contribuir na perda da organização epitelial, estimular a proliferação celular e inibir o processo de apoptose (MANTOVANI; BANKS, 2001). Para isto, a E6 inativa o supressor de tumor P53 celular, responsável pelos mecanismos de reparo e apoptose, caso o dano seja irreparável (MÜNGER; HOWLEY, 2002). Para inativar a P53, E6 se liga a um componente da família E3 da ubiquitina ligase, denominado E6-AP (do inglês, *E6-associated protein ligase*) e induz a formação de um complexo trimérico que

estimula a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular; na inibição da apoptose e ubiquitinação da P53 para degradação no proteassoma, como mostrado na figura 7 (VAN DOORSLAER; BURK, 2010).

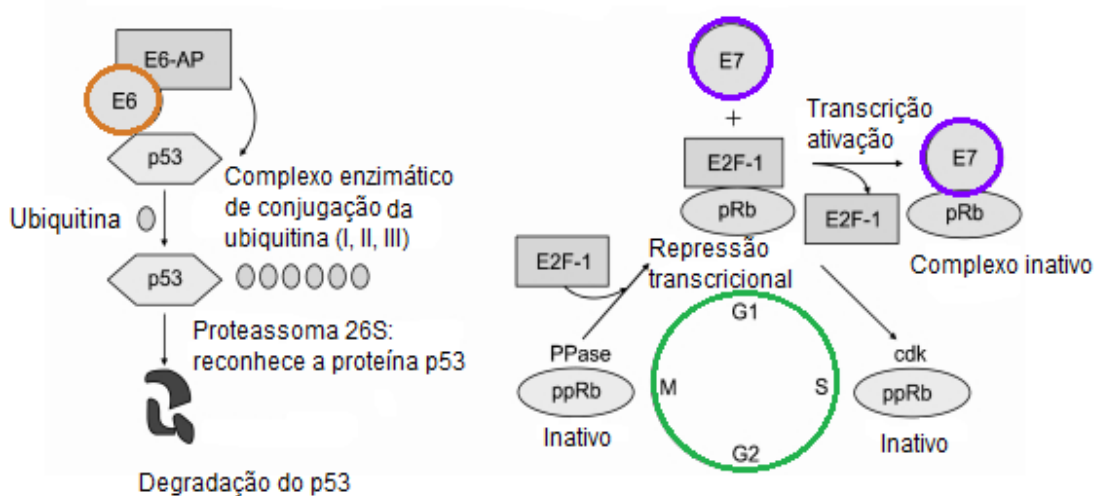
A maior agressividade dos tipos de HPV de alto risco oncogênico ocorre porque a E6 destes possui maior afinidade pela P53 do que a E6 dos HPV de baixo risco (PASSOS, ALMEIDA, *et al.*, 2008).

Outro fator negativo, também relacionado à E6 dos HR-HPVs, é a capacidade de ativar a subunidade catalítica do complexo telomerase (hTERT) estendendo o comprimento dos telômeros e assim aumentando a vida média da célula (HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2009).

A outra proteína viral importante no processo oncogênico é a E7, que inibe a proteína celular chamada de retinoblastoma- pRb, que exerce uma ação supressora sobre o fator de transcrição E2F, envolvido na expressão de diferentes genes que influem na progressão da fase G1 à fase S do ciclo celular. (LEE; RUSSO; PAVLETICH, 1998). E7 é capaz de ligar-se à forma subfosforilada da proteína supressora de tumor pRb inativando-a.

Normalmente a proteína pRb se une ao fator de transcrição E2F e forma um complexo (pRb/E2F), e quando E7 interatua com pRb conduz à dissociação deste complexo, à degradação de pRb e à subsequente ativação de E2F, o que conduz à transcrição de diferentes genes requeridos pela célula para poder entrar à fase S favorecendo a progressão do ciclo celular (VALLEJO-RUIZ *et al.*, 2015).

Figura 7- Degradação e inativação do supressor tumoral p53 e pRb por E6 e E7 do HPV de alto risco



Fonte: Adaptado de YIM; PARK, 2005.

Quanto aos efeitos destas oncoproteínas virais sobre a resposta imunológica, foi verificado que E6 e E7 do HPV 16, podem inibir (por um mecanismo ainda não esclarecido), a expressão de TLR 9, um membro da família de receptores do tipo *toll* - TRL, envolvido no reconhecimento de sequências específicas de DNA de fita dupla de vírus e bactérias. A E6 compromete a apresentação antigênica ao reduzir os níveis de E-caderina na superfície de queratinócitos (evitando assim a adesão entre queratinócitos e células apresentadoras de antígenos). E6 também tem a capacidade de se combinar com o IRF- (interferon Regulatory Factor-3), e bloquear seus efeitos de ativação transcricional, evitando assim a regulação positiva do promotor IFN- β , quem é ativado em resposta a infecções virais. Enquanto que, E7 é capaz de reduzir a expressão de TAP1 (*transporter associated with antigen protein 1*), um componente importante na via de processamento de antígeno, interferindo significativamente na atividade citotóxica linfocitária dependente de apresentação de antígeno por MHC-1 (PEREIRA DE LIMA, LIMA DA SILVA e BAREM RABENHORST, 2013).

Em lesões cancerígenas cervicais, o HPV também parece regular negativamente a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α , ao passo que estimula a expressão de interleucina-10 que desempenha um papel contrário à primeira, isto é, anti-inflamatório, concorrendo para inibir a resposta imunológica local (GHITTONI et al., 2010).

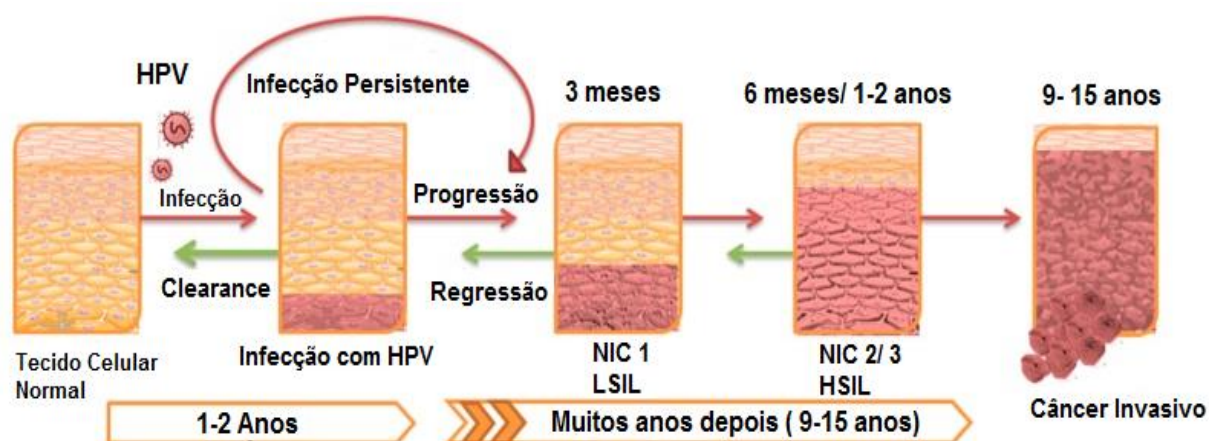
2.5 Evolução da infecção pelo HPV ao câncer do colo do útero

A maioria dos indivíduos sexualmente ativos estão expostos e adquirem a infecção viral em alguma fase da sua vida sendo mais prevalente em adultos jovens (25-35 anos). A infecção com o HPV pode ser transitória e não detectável clinicamente, mas também pode ocasionar verrugas genitais e uma variedade de lesões anogenitais pré-malignas e malignas do colo do útero, que podem ser classificadas como lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) (que estão mais associadas aos HPVs de baixo risco); e as lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) que geralmente são causadas pelos HPVs de alto risco e são consideradas como as lesões precursoras do câncer de colo uterino (CASTELLSAGUÉ, 2008) (SOUZA et al., 2015).

A história natural do câncer de colo uterino estende-se por um período de 15 a 20 anos, incluindo a infecção do epitélio por um ou mais genótipos de HPV, a

persistência da infecção, a progressão para lesões precursoras e finalmente o desenvolvimento do câncer invasor (Figura 8).

Figura 8- Progressão natural do câncer de colo uterino



Fonte: SRINIDHI SHANMUGASUNDARAM; JIANXIN YOU, 2017

Geralmente 70% das infecções com o vírus regredem de forma espontânea no primeiro ano e até 90% o fazem em até dois anos. Mas aproximadamente 10-20% das infecções persistem, ocasionando as lesões neoplásicas, que se não tratadas podem evoluir para o câncer. (PIRTEA et al., 2016). A persistência do HPV é comumente definida como ter dois ou mais testes de DNA positivos para o HPV realizados em dois momentos diferentes; ter o mesmo genótipo ou genótipos de HPV em duas visitas consecutivas; ou considerando o tempo de eliminação da infecção (onde as infecções persistentes são aquelas que duram mais que a média). (FOR THE INC HPV STUDY GROUP et al., 2009; KOSHIOL et al., 2008)

Porém, nestas circunstâncias, a distinção entre uma infecção persistente de uma transitória é muito difícil, porque vai depender da sincronização das amostras em relação com a história natural da infecção e o intervalo em que as amostras são coletadas (quanto menor seja o intervalo entre os testes de DNA para o HPV, maior é a probabilidade da infecção ser definida como persistente) (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por HPV e as neoplasias intraepiteliais de baixo grau são frequentemente reversíveis. Nas mulheres com NIC1, a lesão geralmente desaparece espontaneamente em 60% dos casos e raramente progride para câncer (1%); por outro lado, nas mulheres que apresentam

lesões de alto grau como NIC 2 e NIC 3 a regressão espontânea da lesão é mais difícil, e ocorre em um 40% e 33% respectivamente, apresentando maior porcentagem de evolução para câncer do colo se não tratadas (5% para NIC 2 e > 12% para NIC 3) (DUNNE; PARK, 2013).

Isso torna evidente que a probabilidade de um epitélio atípico se tornar invasivo aumenta com a gravidade da atipia (OSTÖR, 1993). Ainda não está bem definido porque algumas mulheres que apresentam uma neoplasia intraepitelial cervical demoram mais ou menos tempo para desenvolver um câncer invasivo, e se os fatores de virulência do patógeno e/ou os fatores imunológicos inerentes do próprio hospedeiro são decisivos na velocidade do processo oncogênico.

A ativação da resposta imunológica do hospedeiro parece ser o ponto determinante entre a resolução da infecção pelo HPV ou a progressão para a doença da cérvix ou do trato anogenital. As células T helper, células T citotóxicas e mecanismos da resposta imunológica inata podem ajudar a resolução da infecção (DINIZ, 2009; FONSECA, 2012).

Porém o HPV é considerado um imunógeno pobre devido a várias características, como por exemplo: a maioria das proteínas do HPV são expressas em níveis muito baixos no epitélio basal (que é a zona mais acessível ao sistema imunológico do hospedeiro); o vírus infecta apenas células da pele ou mucosa e não induz a morte celular, isso se reflete na ausência de inflamação, consequência da não liberação de citocinas pró-inflamatórias, que são importantes para a ativação e migração das células apresentadoras de antígenos. Da mesma forma, não há fase de viremia e apenas pequenas quantidades do vírus são expostas às defesas imunológicas, de modo que o vírus é invisível para o hospedeiro. Como resultado de todo isso, o HPV é eficaz em evitar a detecção imunológica e invoca apenas uma resposta imunológica lenta e fraca pelo hospedeiro (FRAZER, 2007).

Além disso, as oncoproteínas E6 e E7 dos HPV de alto risco, como já foi mencionado anteriormente, alteram a expressão de genes reguladores do ciclo celular e de outros genes envolvidos na resistência do hospedeiro à infecção; isso permite que o vírus permaneça por longos períodos de tempo sem ser reconhecido, o que atrasa a ativação da resposta imunológica adaptativa.

Apesar dos mecanismos do vírus para escapar das defesas do hospedeiro, uma resposta imunológica mediada por anticorpos pode ser gerada e direcionada contra as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral, os quais podem ser efetivos para

limitar a infecção, mas não tem efeitos de regressão sobre infecções já estabelecidas. Hoje em dia, existem vacinas profiláticas (bivalentes e quadrivalentes) contra o HPV, que são sintetizadas com partículas semelhantes a vírus, conhecidas como *virus-like particles* (VLPs), formadas a partir de proteínas L1 automontadas. As VLPs previnem de forma efetiva as infecções pelo vírus com um alto nível de anticorpos de tipo específico (anticorpos dirigidos principalmente contra o HPV 16 e 18, os genótipos mais oncogênicos). No entanto, pode haver algum grau de proteção cruzada entre os HPV filogeneticamente próximos. Tem sido relatada proteção cruzada contra a infecção pelos tipos 31, 33 e 45 do HPV após vacinação bivalente contra o HPV (BROTHERTON, 2017; DE VINCENZO et al., 2013).

2.6 Persistência da infecção por HPV no Brasil

Atualmente são poucos os estudos que avaliam a detecção do HPV como método preditivo da evolução da doença. Geralmente o que se tem no Brasil são estudos que dão seguimento às mulheres tratadas por NIC (por meio de conização cervical ou cirurgia), onde se analisam as taxas de cura ou recidiva, dando-se ênfase à importância da detecção do DNA do HPV de alto risco nessas pacientes. Existe pouca informação acerca da persistência do HPV após o tratamento oncológico nos casos de câncer invasivo mediante o uso de rádio/quimioterapia. São mais frequentes estudos pesquisando a persistência viral em lesões precursoras do câncer de colo. Em um desses estudos foram avaliadas 78 mulheres com lesões intraepiteliais de colo uterino (NIC 1, 2 e 3) submetidas a conização. As amostras cervicais foram avaliadas por captura híbrida II (CH II) e citologia oncológica antes da conização e 4 meses após finalizado a intervenção. Observou-se que antes da excisão, 67 (86%) mulheres apresentavam DNA de HPV de alto risco oncogênico (positivo por CH II), e destas, só 22 (33%) persistiram com a infecção após o tratamento. Embora neste estudo a detecção do DNA viral associou-se significativamente com a presença das alterações citológicas, não teve associação com a doença residual ou recidiva histológica (FIGUEIRÊDO et al., 2003).

Em outro estudo, onde foram avaliadas 94 mulheres com NIC 2 e 3 e submetidas a conização observou-se que no momento da conização, a CH II foi positiva em 92% das mulheres e que 6- 12 meses depois apenas 25% das mulheres mantinham infecção viral persistente. Neste último estudo, a presença do vírus detectável ao longo do seguimento esteve significativamente associada com

persistência ou recidiva da NIC, agindo como fator preditivo para doença histológica após o tratamento das neoplasias (ZANATTA SARIAN, 2003).

2.7 Diagnóstico do câncer de colo uterino

Geralmente o câncer do colo do útero é detectado no exame Preventivo do Câncer de Colo Uterino (PCCU) também chamado exame de Papanicolau, ou quando a lesão no colo é macroscopicamente visível. A técnica do Papanicolau tem sido a técnica padrão para a detecção de lesões pré-malignas e câncer desde o ano 1941, sendo que a idade recomendada para o primeiro esfregaço é aos 25 anos (às vezes aos 20 anos, se existem fatores de risco) e deve continuar até os 65 anos (ROUZIER; LEGOFF, 2007). O intervalo entre os exames deve ser anual ou com intervalo de três anos após dois exames consecutivos negativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Embora a citologia cervical tenha sido muito eficaz durante muitos anos nos programas de triagem para câncer de colo do útero, a técnica não é confirmatória e deve ser sempre confirmada por exames histopatológicos. Uma biopsia deve ser feita de qualquer lesão suspeita, e deve preferencialmente, ocorrer sob visualização colposcópica (visualização ampliada do colo do útero, vagina e vulva por um sistema óptico), para uma coleta mais precisa no local da lesão (MORFFIZ; HIRIARTH, 2011; WAGGONER, 2003).

O PCCU pode ter uma taxa de falsos negativos de aproximadamente 30%, e isto pode estar influenciado por diversos fatores, desde uma amostragem inadequada até erros na leitura das lâminas por parte dos patologistas que analisam as amostras. É por isso que a sensibilidade do PCCU é muito variável, mas pode ser considerada em torno de 70% e quando associada à colposcopia, ela pode chegar até 80% de sensibilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2002).

Recentemente, técnicas de biologia molecular tem sido utilizadas para detectar o DNA do HPV em amostras cervicais que, em combinação com o PCCU e a colposcopia, visam identificar mulheres infectadas com o HPV que poderiam estar em risco de desenvolver CCU. A maioria destas técnicas são utilizadas principalmente para fins de pesquisa. Dentre as técnicas de biologia molecular mais utilizadas se encontram:

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): É considerada a técnica mais sensível na identificação do DNA do HPV; possui uma alta sensibilidade e especificidade e é capaz de detectar entre 10 e 200 cópias do genoma viral por amostra. Na PCR o DNA alvo é detectado utilizando iniciadores oligonucleotídicos ou *primers* que complementam especificamente as regiões flanqueadoras do DNA a ser amplificado, através de ciclos sucessivos de desnaturação, hibridação e extensão. O DNA é amplificado muitas vezes até ser obtida um amplicom facilmente visível em géis de agarose corados com brometo de etídio (PCR convencional), ou quantificado pelo aumento de fluorescência (PCR em tempo real) (OLIVEIRA, 2016).

Atualmente, oligonucleotídeos iniciadores para diferentes genes do HPV tem sido projetados, porém, os mais utilizados são os que amplificam parte do gene L1 (que é a região mais conservada no genoma dos diferentes tipos de HPV, codificando uma proteína do capsídeo viral). Os iniciadores mais utilizados são MY09-MY11 e GP5-GP6 (DO CARMO e FIORINI, 2007; ASTUDILLO GONZÁLEZ, FLORES MONTESINOS e ESPINOZA SALAMEA, 2014).

A vantagem da PCR é que possui uma alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, e maior velocidade na análise. No entanto, é uma técnica cara e laboriosa, e é essencialmente uma ferramenta de pesquisa, não adequada para ser aplicada como um teste de triagem em grandes populações.

Captura Híbrida (CH): Técnica que utiliza células esfoliadas obtidas tanto do trato genital feminino como do masculino (inclusive, podendo ser realizado em material de biópsia). Na Captura Híbrida se produzem sinais luminosos diretamente proporcionais à quantidade de DNA do HPV presente na amostra; é um ensaio seguro e reprodutível, com muita especificidade e que fornece a tipagem viral por grupos de HPV, além de permitir a estimativa da carga viral (CAVAZZA e CORRENTI, 2004).

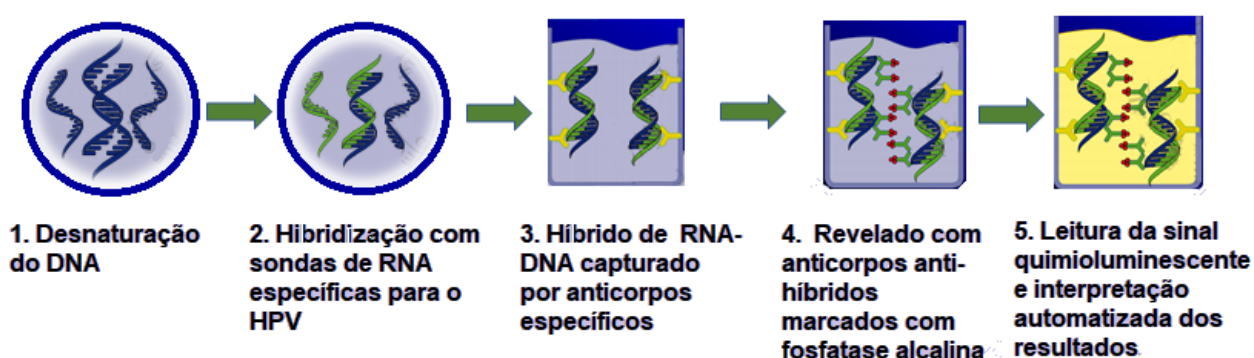
Esta técnica tem a aprovação da FDA (Food and Drug Administration) do E.U.A, e é um ensaio que utiliza sondas de RNA complementares à área específica do genoma que se está pesquisando. Na presença de partículas virais, se formam os híbridos que estão constituídos por DNA viral e as sondas específicas. (ALVARENGA ROCHA e MELO, 2010).

Os híbridos são capturados na parede do tubo de reação que estão recobertos com anticorpos específicos, marcados com fosfatase alcalina.

Seguidamente é realizada uma leitura com quimioluminescência (são emitidos sinais luminosos aproximadamente proporcionais à quantidade de DNA de HPV presente na amostra), como mostrado na figura 9.

A Captura híbrida de primeira geração (CH I), pesquisa os HPV oncogênicos (16, 18, 33, 35, 45, 51, 52 e 56), e a de segunda geração (CH II), pesquisa quatro tipos adicionais (39, 58, 59 e 68), além de cinco tipos de HPV de baixo risco oncogênico (6, 11, 42, 43, 44). (MEDINA; MEDINA; MERINO, 2012).

Figura 9- Captura Híbrida para a detecção do HPV



Fonte: Adaptado de (CAVAZZA; CORRENTI, [s.d.]

Hibridação *in situ*: É uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA em cortes de tecido ou preparados citológicos; onde se utiliza uma sequência complementar de ácidos nucleicos marcados com sondas. Sob condições apropriadas, ocorre a hibridação da sonda com a sequência-alvo do DNA viral, que pode ser visualizada através de marcadores fluorescentes ou radioativos, que são ligados às sondas permitindo a detecção e localização de sequências de ácidos nucleicos do HPV em material citológico e histológico (DO CARMO e FIORINI, 2007). Mas este último método é caro, demorado e laborioso e foi superado pela Reação em Cadeia da Polimerase a captura híbrida (DE LA FUENTE-VILLARREAL et al., 2010).

Embora todas essas técnicas não sejam usadas rotineiramente para a detecção do CCU, devemos destacar suas vantagens em comparação com a citologia ou a inspeção visual do colo do útero:

- a) São técnicas com alta sensibilidade e permitem confirmar não só a infecção pelo HPV assim como detectar tipos virais de alto risco oncogênico.

- b) Estes testes de DNA do HPV identificam não só mulheres com doença cervical, assim como também aquelas com risco de desenvolver a doença. Isto é particularmente importante para países em desenvolvimento que podem não ter recursos suficientes para avaliar todas as mulheres em intervalos de 5 a 10 anos, mas podem ter recursos para avaliar um pequeno subconjunto de mulheres positivas para HPV de alto risco, em intervalos de tempo mais frequentes.
- c) A interpretação destes testes é objetiva e não possui a subjetividade inerente dos métodos de detecção visual ou citologia cervical.

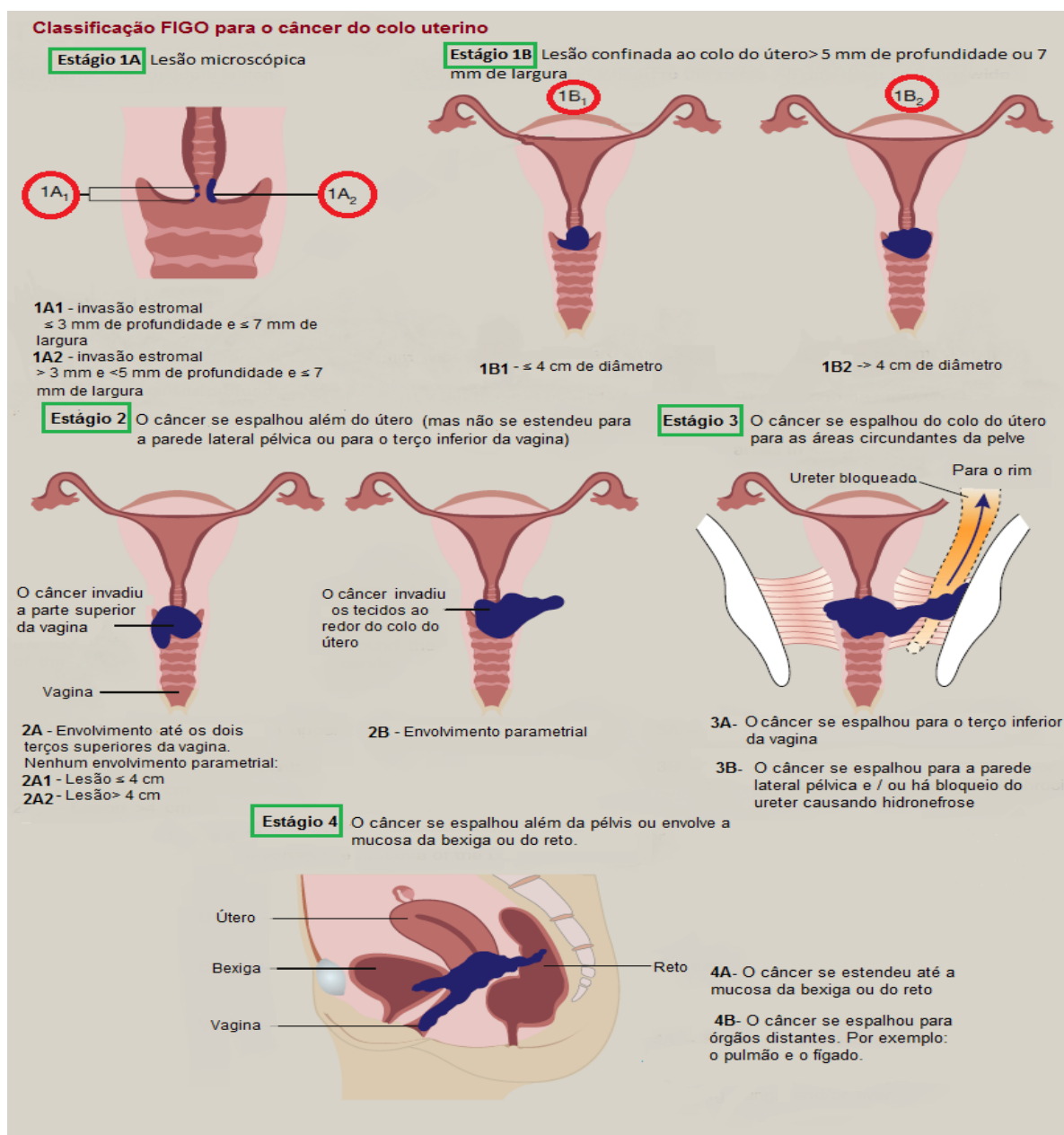
Também é importante mencionar que ao combinar testes de DNA do HPV com a citologia, aquelas mulheres que obtenham resultados negativos com os dois métodos podem ter um nível muito alto de segurança, de que não correrão risco de desenvolver câncer do colo uterino por muito tempo (possivelmente nos próximos 10 anos) (BHATLA; MODA, 2009).

2.8 Procedimentos para determinar o estágio do câncer de colo uterino

O estadiamento do tumor é fundamental para o início da modalidade terapêutica apropriada. Para isso é realizado o estadiamento clínico, realizado pelo ginecologista oncologista e confirmado com o estadiamento histológico (de peça de biópsia) e pós-cirúrgico quando a histerectomia-traquelectomia-linfadenectomia são realizadas.

O estadiamento clínico é realizado usando o sistema da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). O estadiamento FIGO (Figura 10), baseia-se no exame clínico realizado sob anestesia local para determinar o tamanho do tumor, envolvimento parametrial, ou se o tumor se espalhou para outros órgãos (NEWTON; MOULD, 2017). No entanto, com o estadiamento clínico às vezes há dificuldades para determinar as dimensões do tumor, principalmente a avaliação de metástase linfonodal, por isso, são utilizadas outras técnicas complementares que vão ajudar no estadiamento das pacientes, entre elas: a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM), ou a tomografia por emissão de positrões (PET) (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Figura 10- Estadiamento do câncer uterino usando o sistema da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO)



Fonte: Adaptado de NEWTON; MOULD, 2017.

A partir do ano 2009 a FIGO recomenda, sempre que seja possível, uma avaliação por ressonância magnética (RM) em pacientes com estágio clínico IB ou maior (LÓPEZ-CARBALLEIRA, BALEATO-GONZÁLEZ, *et al.*, 2016).

A RM apresenta uma precisão de cerca de 90% para avaliar fatores prognósticos, tais como o tamanho do tumor, invasão parametrial na parede pélvica, da bexiga e do reto, bem como a presença de metástases dos nódulos linfáticos. (LI; WU; CHENG, 2016b).

Recentemente, a tomografia por emissão de positrões (PET) está se tornando comum no exame pré-operatório e diagnóstico do câncer de colo uterino metastático. E neste contexto uma combinação de PET-TC tem demonstrado uma maior precisão no diagnóstico para avaliar os nódulos linfáticos, caso estejam envolvidos, e se houver invasão local (HERRERA; PRIOR, 2013).

2.9 Tratamento do câncer de colo uterino segundo o estágio do tumor

Como foi mencionado anteriormente, estabelecer o estágio do câncer é fundamental para determinar os procedimentos terapêuticos mais adequados a seguir, e poder avaliar de uma maneira melhor o prognóstico da paciente. Um esquema ilustrativo das opções terapêuticas segundo o estágio do câncer é mostrado na figura 11 e é detalhado a seguir (destacando que todas estas modalidades terapêuticas são realizadas no Hospital Ophir Loyola, seguindo as diretrizes do INCA):

Estágio 1A1: Neste estágio uma conização com bisturi ou laser pode representar uma opção terapêutica (para as mulheres que querem preservar a fertilidade). Também pode ser feita uma histerectomia total (onde o útero e o colo do útero são removidos, mas os ovários e as trompas de Falópio permanecem intactos), se a paciente não deseja engravidar.

Estágio 1A2: Neste estágio é indicada a histerectomia radical modificada II (com remoção da metade dos paramétrios e útero-sacos com ressecção do terço superior da vagina), no entanto, se a paciente deseja engravidar, uma traquelectomia radical com linfadenectomia pélvica pode ser feita (ou seja, o colo do útero, tecido e linfonodos próximos, bem como a parte superior da vagina são removidos). Se não houver tumor residual, nenhum outro tratamento é necessário, mas se houver linfonodos comprometidos, a radioterapia externa é necessária.

Estágio IB – IIA: O tratamento radioterápico (radioterapia externa e braquiterapia) e o tratamento cirúrgico (histerectomia radical e linfadenectomia pélvica) têm resultados semelhantes quanto à sobrevivência da paciente. A escolha entre essas formas de tratamento vai depender muito das condições clínicas da paciente.

As Indicações da radioterapia associada ou não à quimioterapia (pós-operatória) vai depender (no caso das lesões menores do que quatro cm) de se a

paciente apresenta, por exemplo: metástase ovariana, metástase para linfonodos pélvicos ou invasão do tecido parametrial, entre outros.

Para as lesões maiores do que 4 cm a radio/quimioterapia concomitante é indicada, ou uma radioterapia exclusiva, quando houver contraindicação ao uso de agentes quimioterápicos.

Estágios IIB, IIIA, IIIB e IVA: A radio/quimioterapia concomitante é indicada nestes estágios. As pacientes IVA com fistula vésico- vaginal ou retovaginal podem ser candidatas para exenteração pélvica ou receber radioterapia paliativa.

Estágio IVB: O tratamento nesta fase é principalmente paliativo, controlar os sintomas e melhorar a qualidade de vida deve ser o objetivo principal (MARTÍN ANGULO et al., 2009). Muitas vezes pode ser feita uma quimioterapia, radioterapia e cirurgia (consideradas paliativas) e indicadas de acordo com cada caso. Também se deve avaliar a necessidade da radioterapia anti-hemorrágica (modalidade de radioterapia paliativa com a finalidade específica de controlar os sangramentos).

No caso das pacientes que apresentam doença recorrente ou recidiva local, o tratamento vai depender principalmente do tratamento primário, tamanho da lesão e local de recidiva:

Recidiva central na cúpula vaginal: As mulheres inicialmente tratadas com cirurgia devem ser consideradas para radioterapia. Se o tratamento inicial foi com radioterapia (e se recebeu a radiação total), pode ser realizada uma exenteração pélvica (que é a única opção potencialmente curativa com sobrevivência em cinco anos de 50%), ou pode ser feito uma histerectomia simples/ radical dependendo da extensão da doença. (GARRIDO SÁNCHEZ et al., 2014; INCA, 2018)

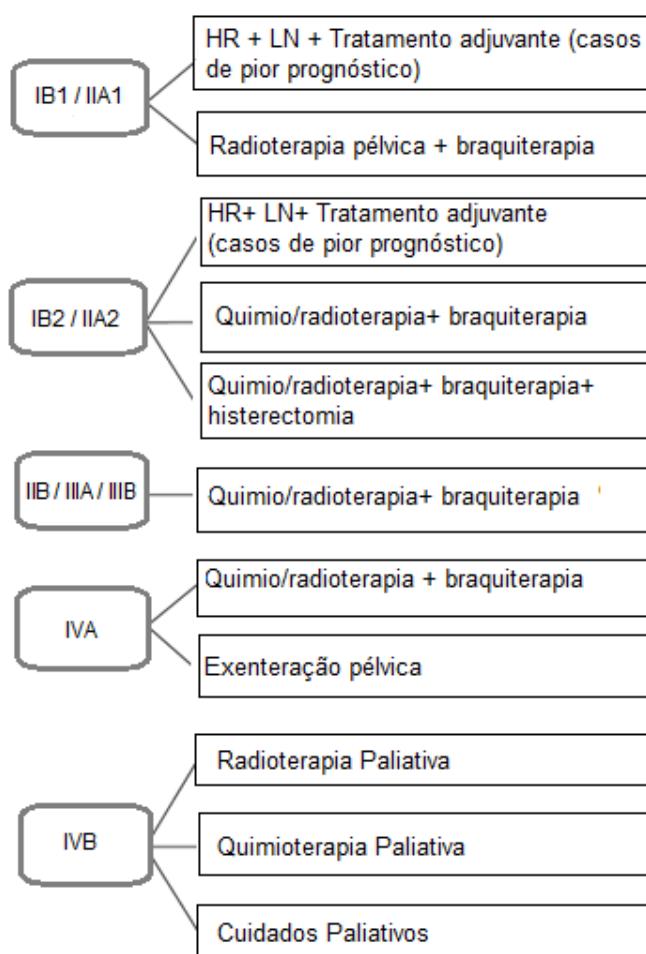
Recidiva pélvica não central ou linfonodal: Se a cirurgia radical foi o tratamento primário, indica-se radioterapia e quimioterapia que é curativa em 40 e 50% dos casos (KYRGIU; SHAFI, 2010). Se a radioterapia foi o tratamento inicial a paciente pode fazer quimioterapia paliativa, caso tenha esgotado a dose de radioterapia.

Quando existe evidência de obstrução uretral e deterioração da função renal, normalmente anuncia a fase terminal. A quimioterapia paliativa com cisplatina deve ser limitada aos casos que não sejam considerados curáveis com outras opções de tratamento. Isto pode aumentar a expectativa de vida por alguns meses, mas isso deve ser equilibrado com a qualidade de vida da paciente (o manejo da dor, o apoio psicológico e emocional é fundamental na fase terminal).

Quando se tem uma recidiva a distância, geralmente o tratamento é paliativo (com abordagem similar ao estágio IVB) e deve considerar-se a possibilidade de paciente Fora de Possibilidade Terapêutica Atual (FPTA).

As taxas de sobrevivência são muito empregadas para ajudar a compreender melhor a probabilidade de um tratamento ser bem-sucedido, geralmente se refere à porcentagem de pacientes que vivem pelo menos cinco anos após o diagnóstico da doença. A taxa de sobrevida em cinco anos para mulheres com câncer de colo do útero no estágio IA é de aproximadamente 93%, para o estágio IB é de 80%, no estágio IIA a taxa é de cerca de 63%, para o estágio IIB é de 58%, estágio IIIA é de cerca de 35%, para o estágio IIIB o 32% e para o estágio IV é de 15% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Figura 11- Abordagem terapêutica das pacientes com câncer de colo uterino invasivo



HR: Histerectomia radical; **LN:** linfadenectomia

Fonte: Adaptado de FILHO; LOPES, 2009

2.10 Modalidades terapêuticas utilizadas no câncer de colo uterino

Como foi mostrado, os tumores em estágios iniciais do câncer de colo uterino são tratados cirurgicamente, mas quando o câncer é muito avançado prefere-se a abordagem terapêutica da radioterapia radicalmente curativa, que consiste em três elementos: radioterapia externa do tumor primário com linfonodos pélvicos e para-aórticos (até uma dose total de 4.500-5.000 *CentiGrey-cGy*), braquiterapia intracavitária, e quimioterapia concomitante com cisplatina com doses semanais de 40 mg / m² (VORDERMARK, 2016).

Este padrão foi estabelecido após uma série de ensaios randomizados avaliando quimiorradiação combinada versus terapia de radiação isolada, cujos resultados foram relatados pela primeira vez em 1999. A combinação destes dois tratamentos pode interagir aumentando o índice de morte celular, a sobrevivência das pacientes e reduzindo a metástase à distância (HOFFMAN et al., 2014).

A implementação de ambos os tratamentos, vai depender muito das características de cada paciente, por exemplo, da idade (não é recomendada a realização da quimioterapia em mulheres com mais de 65 anos) (WEDDING et al., 2007), e algumas mulheres ao ter muito sangramento podem desenvolver anemia, pelo que um tratamento com quimioterapia pode agravar mais seu estado; então o tratamento tem que ser personalizado de acordo com as características de cada paciente.

A radioterapia externa ou também chamada de teleterapia, permite a redução do tumor (melhorando as condições locais para a braquiterapia), promove a diminuição do sangramento e da dor pélvica, e permite a recuperação do estado geral da paciente. Geralmente é feita diariamente (25-28 tratamentos, com 5.000 cGy) e não deve ser administrada no mesmo dia da braquiterapia (INCA/MS, 2000; KAMRAVA; BANERJEE, 2014).

A quimioterapia, quando é realizada de forma concomitante, é iniciada no dia um da radioterapia. Sempre o fármaco utilizado para a quimioterapia deve ser administrado antes da radiação, no dia em que a paciente recebe ambos os tratamentos e não deve ser administrada nos mesmos dias que a braquiterapia (KAMRAVA; BANERJEE, 2014).

A radiação interna, também chamada de braquiterapia, consiste em colocar um implante radioativo dentro ou perto do tumor, e constitui uma etapa importante

do tratamento do câncer uterino, pois permite a liberação de dose tumoricida ao colo e tecidos para-cervicais. Pode ser realizada em regime de baixa taxa de dose (com 4.000 cGy) usando uma fonte de Césio 137, ou a alta taxa de dose (700 cGy cada inserção) com fonte de Irídio 192 operada por controle remoto e comandada por computador. Geralmente começa na semana 3 do tratamento o depois da teleterapia acabar, e é aplicada cada semana, durante 4 semanas (INCA, 2000).

3. JUSTIFICATIVA

Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de colo do útero é o terceiro tumor maligno mais frequente na população feminina (atrás do câncer de mama e do colón e reto), e é a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. A região Norte do país apresenta as maiores taxas de incidência desta doença, assim como as maiores taxas de mortalidade. A população de risco, são principalmente mulheres com baixa escolaridade e baixa renda, provenientes de lugares onde a cobertura do exame do Preventivo (PCCU) é muito baixa e onde os programas de prevenção desse câncer não estão sendo eficazes.

A infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV) é considerada o principal fator etiológico para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. Avaliar a persistência viral após tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia pode ser uma ferramenta útil de predição de evolução da doença ou poderia ser um fator de risco de recorrência da doença ou estar associado a um pior prognóstico.

Identificar a prevalência do vírus, a sua diversidade genética, os fatores de risco mais comuns associados a esta doença e implementar a detecção do DNA viral após o tratamento oncológico na região norte do país, principalmente na cidade de Belém (que conta com um hospital de referência oncológica que atende pacientes oriundas de todo o estado do Pará) poderia contribuir com o aprimoramento dos programas de diagnóstico, prevenção e vigilância para este tipo de câncer.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a persistência do *Papilomavírus humano* (HPV) em amostras cervicais em mulheres com câncer invasivo do colo uterino após tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia atendidas no Hospital Ophir-Loyola, centro de referência oncológica do Estado do Pará.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Traçar o perfil clínico e epidemiológico da população estudada;
- ✓ Determinar a presença e/ou persistência do genoma viral pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) antes e após tratamento;
- ✓ Identificar os genótipos de HPV nas amostras positivas para o vírus;
- ✓ Correlacionar o estágio da doença e o tratamento oncológico, com a persistência do HPV nas pacientes;
- ✓ Verificar se houve remissão completa do tumor após o tratamento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo analítico, com desenvolvimento longitudinal, prospectivo.

5.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Serviço de Ginecologia do Hospital Ophir Loyola, centro de referência em câncer de colo uterino do Estado do Pará, que atende pacientes oriundas de todo o estado.

O Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) foi responsável pelo desenvolvimento do estudo e pela realização dos métodos laboratoriais, análise dos formulários epidemiológicos e análises estatísticas.

5.3 População de estudo e amostra

A amostragem foi não probabilística por conveniência, e foram incluídas 44 mulheres com câncer invasivo de colo uterino atendidas por demanda espontânea (durante o período de julho de 2015 a julho de 2018), que aceitaram participar do estudo e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

5.3.1 Critérios de inclusão

Grupo antes do tratamento: Mulheres com câncer invasivo de colo uterino nos estádios da doença 1B1-IV, maiores de 18 anos com vida sexual iniciada, faculdades mentais preservadas, com indicação de tratamento radioterápico e/ou quimioterápico que não foram tratadas previamente e que aceitaram participar do estudo após assinatura do TCLE (Apêndice A).

Grupo após do tratamento: as mesmas mulheres depois de completado o tratamento, quando retornaram para o controle.

5.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas as pacientes que não aceitaram participar do estudo ou não se enquadraram nos critérios de inclusão; que não tinham completado o tratamento radio-quimioterápico, que tinham lesões intraepiteliais de baixo ou alto grau e tinham realizado tratamento prévio para essas lesões; mulheres que tinham realizado histerectomia ou que apresentaram outras neoplasias malignas do aparelho reprodutor feminino.

5.4 Coleta de dados epidemiológicos

Os dados necessários para poder traçar o perfil clínico epidemiológico das pacientes que aceitaram participar do estudo, foram obtidos mediante uma entrevista, onde as pacientes responderam um formulário com perguntas objetivas, que foi aplicado em dois momentos: antes do início do tratamento e depois de finalizado o tratamento.

As variáveis idade, grau de escolaridade, estado civil, idade de início da atividade sexual, número de parceiros sexuais, paridade, história prévia de outras infecções sexualmente transmissíveis (IST), uso de anticoncepcionais, tabagismo, alcoolismo, tratamento oncológico (radioterapia, braquiterapia ou quimioterapia), foram avaliadas (Apêndices B e C). Além disso, o prontuário médico foi revisado para verificar se houve remissão completa do tumor após o tratamento.

5.5 Coleta de material biológico

Para a realização dos exames de biologia molecular com o objetivo de verificar a presença de DNA viral, foram coletadas amostras de células cervicais antes de iniciar o tratamento e após tratamento (quando as pacientes retornaram para o controle), através de descamação, obtida com a escova Campos da Paz, da endocérvice, ectocérvice, fundo de saco e paredes laterais da vagina, que foi imersa em um micro tubo de polietileno de 15 ml com 1 ml de RNA/ater® Stabilization Solution (Ambion, Life Technologies) e enviada ao final do dia em que foi realizada a coleta, para o laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, onde foi congelada em freezer a -20°C.

5.6 Métodos laboratoriais

5.6.1 Extração de ácidos nucleicos

O material biológico foi descongelado a temperatura ambiente e a partir de 200ul de células suspensas no RNAlater® foi extraído o DNA, utilizado o kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit de extração de DNA (Invitrogen, Thermofisher) seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 400 ul de água destilada/deionizadas e mantido à -20 °C até sua utilização.

5.6.2 PCR para β - globina

Como controle de qualidade da extração de DNA das amostras foi realizada uma reação de amplificação em cadeia da polimerase ou PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando oligonucleotídeos iniciadores F (*forward* 5´- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC -3´) e R (*reverse* 5´- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3´) para amplificação do gene da β globina humana em um segmento de DNA de 226 pares de bases (pb).

As reações foram colocadas no termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) e submetidas a seguinte ciclagem: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação de PCR, sendo que cada ciclo consistiu em 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão final do DNA amplificado a 72°C por 3 minutos. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (1µg/ml) e submetidas à eletroforese a 100 V durante 30 minutos em TBE 1X.

As amostras foram consideradas positivas quando o produto da PCR em gel de agarose apresentou uma banda de 226 pb à visualização sob luz ultravioleta e captura fotográfica no Gealiance 200 (Imaging System através do software GeneSnap- PerkinElmer®). Nos casos em que o DNA não foi detectado nas amostras, o processo de extração foi repetido até obter um resultado positivo na PCR. As amostras que não amplificaram foram descartadas.

5.6.3 Detecção do genoma do HPV

Para a detecção de DNA do HPV foi utilizada a técnica de biologia molecular conhecida como “*Nested-PCR*”. Essa técnica é uma reação em cadeia de polimerase (PCR) realizada em duas etapas, o que permite a amplificação em milhões de vezes de um determinado trecho de DNA.

Uma vez confirmada a presença do DNA do genoma humano (β -globina) nas amostras extraídas, foram realizadas duas reações de PCR para a detecção da presença do HPV. Foi usado o par de iniciadores oligonucleotídicos externos (ou *primers*) MY09 / MY11 e o par de iniciadores internos GP5 + / GP6 +, que amplificam a região L1 do genoma viral.

5.6.4 PCR1 para a detecção do HPV com os primers My9 e My11

Os iniciadores universais MY9 e MY11 são capazes de detectar os diferentes tipos de HPV devido ao seu anelamento em uma área conservada do genoma viral (L1) e amplificarão na reação de PCR um segmento de 450 pares de bases (Figura 12).

Na primeira reação de PCR foram utilizados 1 μ l de DNA da amostra extraída em um volume final de reação de 20 μ L contendo: 10 μ l do *mix GoTaq Green Master Mix* (Promega, Brasil), 1 μ l da solução dos oligonucleotídeos iniciadores degenerados MY09 5' - CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' e MY11 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG- 3' a 20 μ M, e 8 μ l de H₂O milliQ autoclavada ou livre de nucleases.

Além das amostras a ser testadas sempre foi colocado um controle positivo, com DNA de uma amostra sabidamente positiva para HPV e um controle negativo, com água em vez de DNA.

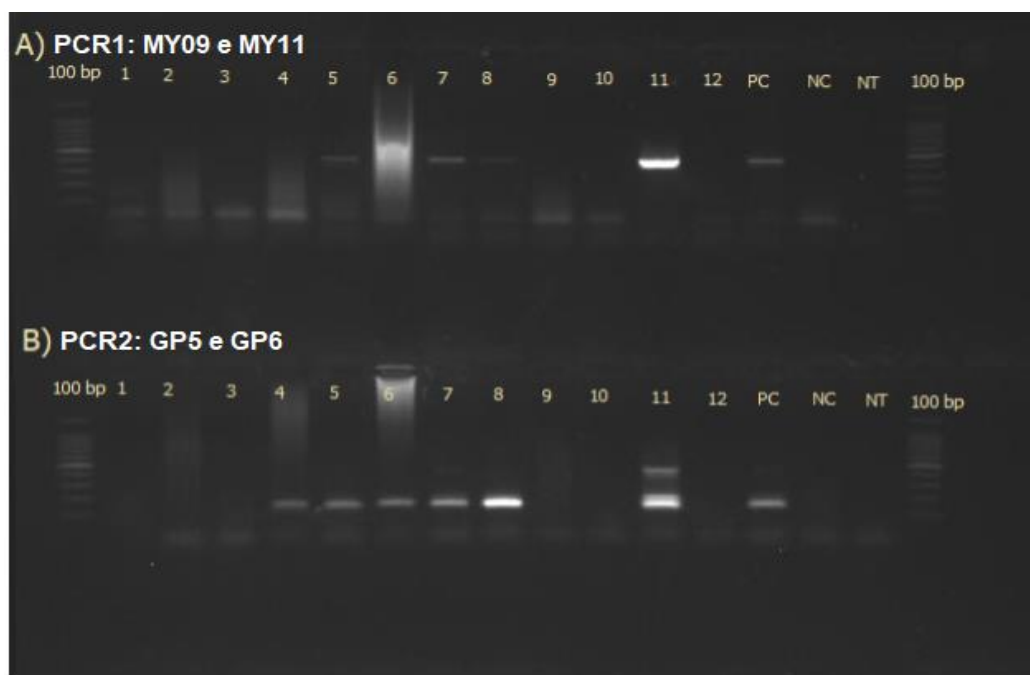
O programa de amplificação consistiu em um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a: 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorreu à 72°C por 3 minutos, e a reação foi estabilizada a 4 °C. Os produtos resultantes de amplificação da primeira PCR foram utilizados para realizar uma segunda PCR e somente aplicados no gel de agarose após a finalização da PCR 2.

5.6.5 PCR 2 (Nested) com os primers GP5 e GP6

A segunda PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores internos aumenta a sensibilidade da técnica na detecção do DNA viral. Para esta PCR foi preparada uma reação com volume final de 25 µl, utilizado 1 µl do produto amplificado na primeira reação; 1 µl da solução de oligonucleotídeos internos GP05 (5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC- 3') e GP06 (5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3') na concentração de 10 µM; 12,5 µl do *mix GoTaq Green* (Promega, Brasil) e 10,5 µl de H₂O milli-Q.

Posteriormente as reações foram colocadas no termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) e submetidas à ciclagem como descrito a seguir: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, e 30 ciclos da amplificação. Cada ciclo da amplificação ocorreu a 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, e a extensão final a 72°C por 3 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese como descrito anteriormente. As amostras positivas amplificaram uma banda de 150 pares de bases (pb), como mostrado na figura 12.

Figura 12 -Produtos de amplificação por *Nested-PCR* do genoma do HPV em amostras cervicais de mulheres com câncer do colo uterino aplicados em gel de agarose 1%.



A) Primeira Reação em cadeia da Polimerase amostras amplificadas com os iniciadores My09 e MY11. Tamanho esperado de 450 pares de bases (pb); B) *Nested-PCR* com os iniciadores GP5 e GP6 mostrando os produtos de 150 pb. 100pb: marcador de peso molecular de 100pb; 1 a 12: amostras testadas; PC: controle positivo; NC: controle negativo 1; NT: controle negativo 2

Fonte: Autor.

5.6.6 Genotipagem do HPV

As amostras positivas para HPV foram avaliadas para nove tipos virais: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58 utilizando o sistema de sondas *PrimeTime* marcadas com os fluoróforos VIC e FAM específicas para cada tipo viral (*IDT-Integrated DNA Technologies*). Para a genotipagem foi utilizado 4,9 ul de DNA, 0,1 ul de sonda e 5 ul de *mix* (*SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix*), completando um volume final de 10 ul. As reações foram incubadas no termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Thermofisher) e executados 45 ciclos a 95°C por 3 minutos e 60°C por 3 segundos. Os resultados foram analisados pelo programa do Step One Plus (Applied Biosystems, Thermofisher) que realiza a detecção das diferentes sondas.

Em cada reação de genotipagem viral realizada, foram usados controles positivos, utilizando amostras com genótipo viral já conhecido e controles negativos de reação, com água destilada/deionizada em vez de DNA.

5.7 Análises estatística

Os dados obtidos durante as entrevistas (sociais e clínico-epidemiológicos) e os resultados dos experimentos laboratoriais, foram armazenados em planilhas eletrônicas (tabelas dinâmicas) no programa Microsoft Office Excel 2016. Todos os dados foram confrontados com os resultados de HPV antes e após o tratamento oncológico, utilizando os testes não paramétricos (Qui-quadrado e Exato de Fisher), considerando valor de significância menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$).

5.8 Avaliação ética da pesquisa

O presente trabalho seguiu todas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos CEP do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, recebendo aprovação sob o parecer CAAE 46042415.5.3001.5550 (ANEXO A).

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A), utilizado nesta pesquisa, foi esclarecido de forma verbal a cada paciente. A utilização do material biológico, as características do exame, o sigilo dos dados obtidos e a livre decisão de participação, foram explicados de forma clara a cada participante.

Todas as pacientes autorizaram a sua participação no estudo através da assinatura, para dar prosseguimento na coleta dos dados.

Os pesquisadores se comprometeram em manter o sigilo da identidade das pacientes, visto que, os dados foram coletados mantendo a privacidade durante a entrevista e resguardando as informações dos dados fornecidos, sendo usado um código em substituição ao nome da paciente, impossibilitando a sua identificação.

Os resultados encontrados somente serão apresentados de forma conjunta em publicações científicas.

5.9 Riscos e benefícios da pesquisa

Riscos: As pacientes puderam sentir desconforto, ou ter pequenos sangramentos durante/após a coleta da amostra, os que sempre foram minimizados ao ser realizados por profissionais treinados.

Benefícios: Os resultados referentes à detecção molecular do HPV foram anexados aos prontuários das pacientes; e com isso será possível (em posteriores estudos) acompanhar a evolução da paciente (livre de doença, com recidiva local ou com metástase) e estabelecer se a persistência molecular do HPV após tratamento poderia ser utilizada como fator prognóstico.

6. RESULTADOS

Foram selecionadas 44 pacientes com câncer de colo do útero atendidas no serviço de Ginecologia do Hospital Ophir Loyola (HOL). Destas pacientes, foram coletadas duas amostras, uma anterior ao tratamento e uma posterior ao tratamento, assim totalizando 88 amostras de esfregaço de cérvix.

6.1 Presença do DNA do HPV antes e após o término do tratamento oncológico

Quando testado o DNA viral antes e após o tratamento oncológico, verificou-se que antes do tratamento o HPV estava presente em 93% (41/44) das pacientes, e que após este, o 73% (30/41) destas, persistiram com a infecção. A presença do DNA viral também foi detectada nas três amostras que previamente tinham dado negativo, obtendo uma positividade do vírus de 75% (33/44) após o término do tratamento (como mostrado na tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com a presença do DNA do HPV antes e depois do tratamento oncológico, atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| | DNA HPV | DNA HPV | Odds ratio | |
|-----------------------------|----------|----------|---------------------|---------|
| | Positivo | Negativo | IC 95% | p-valor |
| Antes do tratamento | 41 | 3 | 4,5 | 0,041 * |
| Depois do tratamento | 33 | 11 | IC 95% (1,17-17,68) | |

Fonte: Autor. *valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui quadrado

6.2 Características das pacientes avaliadas

A idade das pacientes que procuraram assistência médica variou entre 29 a 75 anos, sendo a média de 47 anos (DP \pm 13,3).

Em relação à situação conjugal, 45% (20/44) das participantes se declararam casadas ou com relação estável, 32% (14/44) solteiras, 14% (6/44) viúvas e 9% (4/44) separadas ou divorciadas. Quanto à escolaridade podemos destacar que a maioria das pacientes (61%) não tinha completado o ensino fundamental ou eram analfabetas, e apenas uma delas tinha completado o ensino superior. Os dados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características sociodemográficas, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| VARIÁVEIS | n (%) | p-valor |
|-------------------------|---------|-----------|
| Estado civil | | |
| Casada/ companheiro | 20 (45) | 0,0019* |
| Solteira | 14 (32) | |
| Viúva | 6 (14) | |
| Separada/divorciada | 4 (9) | |
| Escolaridade | | |
| Analfabeta/FI | 27 (61) | < 0,0001* |
| Fundamental completo | 4 (9) | |
| Ensino médio incompleto | 3 (7) | |
| Ensino médio completo | 9 (21) | |
| Ensino superior | 1 (2) | |

Fonte: Formulário de pesquisa 2015-2018 e prontuários médicos do HOL. Dados são expressos em valores absolutos e em porcentagem; **FI:** fundamental incompleto. *Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui quadrado de aderência.

O início da atividade sexual das pacientes ocorreu em média aos 14 anos ($DP \pm 6,67$) sendo que 50% (22/44) delas relataram ter se relacionado com um a quatro parceiros na vida, 25% (11/44) com cinco ou mais, e 25% (11/44) não lembrava o número exato de parceiros sexuais; mas em geral, a média de parceiros sexuais das pacientes foi de três ($DP \pm 4,5$).

Como forma de prevenção da gravidez, 16% (7/44) das pacientes fazia uso de contraceptivo de barreira (camisinha) e o 84% (37/44) restante, declarou que nunca tinha usado.

Com relação à história reprodutiva, as participantes tiveram de um a treze filhos, sendo a média de cinco ($DP \pm 2,8$); e dez das 44 participantes (23%) relataram ter sofrido aborto (os dados são mostrados na Tabela 3).

Tabela 3- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características sociodemográficas, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| VARIAVEIS | n (%) | Média ± DP | p-valor |
|---|---------|------------|-----------|
| Parceiros sexuais na vida | | | |
| 1-4 | 22 (50) | | |
| ≥5 | 11 (25) | 3 ± 4,5 | 0,0639 |
| Não lembrou | 11 (25) | | |
| Uso de contraceptivo de barreira | | | |
| Sim | 7 (16) | | |
| Não | 37 (84) | | < 0,0001* |
| Número de partos | | | |
| 1-4 | 24 (55) | 5 ± 2,8 | |
| ≥5 | 20 (45) | | 0,5465 |
| Abortos | | | |
| Sim | 10 (23) | | 0,0003* |
| Não | 34 (77) | | |

Fonte: Formulário de pesquisa 2015-2018 e prontuários médicos do HOL. Dados são expressos em valores absolutos e em porcentagem. *Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui quadrado de aderência.

Quanto aos hábitos de vida, 57% (25/44) das participantes relataram exposição ao fumo em algum momento da vida (levando em consideração as pacientes que fumavam atualmente, as que conviviam com pessoas fumantes e as ex-fumantes). Sobre a ingestão de bebidas alcoólicas, só o 18% (8/44) declarou que ingeria bebidas alcoólicas. Os dados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com a exposição ao fumo durante a vida e o hábito de consumir bebidas alcoólicas, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| VARIÁVEIS | n (%) | p-valor |
|---|---------|----------|
| Exposição ao fumo durante a vida | | |
| Sim | 25 (57) | 0,3657 |
| Não | 19 (43) | |
| Consumo de álcool | | |
| Sim | 8 (18) | <0,0001* |
| Não | 36 (82) | |

Fonte: Formulário de pesquisa 2015-2018 e prontuários médicos do HOL. Dados são expressos em valores absolutos e em porcentagem. *Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui quadrado de aderência.

Quanto aos antecedentes ginecológicos, 46% (20/44) das participantes relatou que o preventivo onde foi detectado o câncer de colo do útero, era o primeiro da sua vida, 27% (12/44) não o fazia faz muito tempo, 16% (7/44) o tinha feito várias vezes (mas não era constante), e 11% (5/44) fazia o PCCU cada ano. Só uma das pacientes relatou ter padecido previamente outra IST: sífilis. Os dados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com os antecedentes ginecológicos, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| VARIAVEIS | n (%) | p-valor |
|---------------------------|---------|----------|
| PCCU na vida | | |
| Primeiro na vida | 20 (46) | 0,0068* |
| Não fazia faz muito tempo | 12 (27) | |
| Fazia regularmente | 7 (16) | |
| Fazia cada ano | 5 (11) | |
| História de IST | | |
| Sim | 1 (2) | <0,0001* |
| Não | 43 (98) | |

Fonte: Formulário de pesquisa 2015-2018 e prontuários médicos do HOL. Dados são expressos em valores absolutos e em porcentagem. **PCCU:** Preventivo do Câncer do Colo Uterino; **IST:** Infecções sexualmente transmissíveis. *Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui quadrado de aderência.

Foi calculado o teste de Qui quadrado de aderência para todos estes fatores de risco, para determinar se os resultados observados nas nossas pacientes concordam com os esperados nas mulheres afetadas por esta doença.

Quando analisadas as variáveis: idade da paciente, escolaridade, estado civil, idade do início da atividade sexual, número de parceiros sexuais na vida, número de partos, tabagismo, realização do preventivo e uso de contraceptivos de barreira (considerados todos estes fatores de risco); quanto a sua contribuição para a infecção pelo HPV, nenhuma variável mostrou associação estatística quando comparada à presença de DNA antes e após o tratamento oncológico (Tabela 6).

Tabela 6- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características sociodemográficas, hábitos de vida e antecedentes ginecológicos e a presença/ausência do DNA do HPV tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico; que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| Variáveis | Antes do tratamento | | Depois do tratamento | | p-valor |
|---|---------------------|-----------|----------------------|-----------|---------|
| | DNA HPV + | DNA HPV - | DNA HPV + | DNA HPV - | |
| Idade | | | | | |
| 29-50 | 27 | 3 | 24 | 6 | 0,52 |
| >50 | 14 | 0 | 9 | 5 | |
| Escolaridade | | | | | |
| Analfabeta | 26 | 1 | 18 | 9 | 0,439 |
| Alfabetizada | 15 | 2 | 15 | 2 | |
| Estado Civil | | | | | |
| Casada/companheiro | 17 | 3 | 17 | 3 | 0,38 |
| Solteira/divorciada/viúva | 24 | 0 | 16 | 8 | |
| Idade da primeira relação sexual | | | | | |
| ≤15 | 20 | 2 | 16 | 6 | 0,979 |
| >15 | 21 | 1 | 17 | 5 | |
| Parceiros sexuais na vida | | | | | |
| 1-4 | 20 | 2 | 16 | 6 | |
| ≥5 /não lembrou o número exato | 21 | 1 | 17 | 5 | 0,979 |
| Número de Partos | | | | | |
| 1-4 | 23 | 1 | 19 | 5 | 0,89 |
| ≥5 | 18 | 2 | 14 | 6 | |
| Exposição ao fumo | | | | | |
| Sim | 24 | 1 | 16 | 9 | 0,38 |
| Não | 17 | 2 | 17 | 2 | |
| Realização do PCCU | | | | | |
| Primerio na vida | 19 | 1 | 15 | 5 | 0,93 |
| Já tinha feito anteriormente | 22 | 2 | 18 | 6 | |
| Uso de contraceptivo | | | | | |
| Sim | 5 | 2 | 6 | 1 | |
| Não | 36 | 1 | 27 | 10 | 0,52 |

Fonte: Autor. *valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui-quadrado; Teste exato de Fisher. +: positivo; -: negativo; **PCCU:** Preventivo do Câncer de Colo Uterino

6.2.1 Perfil das pacientes segundo o tratamento oncológico

O 91% (40/44) das pacientes foi tratada por câncer de colo uterino tipo histológico epidermóide e o 9% por adenocarcinoma, sendo que o estágio da doença mais predominante entre as pacientes foi o IIB (26/44), seguido dos estágios IIIB (9/44), 1B2 (3/44), e IVA (2/44). Os estágios 1B1, IIA, IVB e o cirúrgico não oncológico, foram os estágios menos predominantes, com uma paciente para cada estágio respectivamente (Tabela 7).

Quanto ao tratamento oncológico, 65% (29/44) das pacientes foram tratadas com radioterapia pélvica, braquiterapia e quimioterapia concomitante; 30% (13/44) foram tratadas com radio/quimioterapia concomitante, e apenas 5% (2/44) com radioterapia pélvica exclusiva. Das 44 pacientes que receberam tratamento oncológico, 27% (12/44) tiveram doença residual após o término do tratamento, pelo que foram submetidas a tratamentos de resgate (quimioterapia, radioterapia ou cirurgia) e outras foram encaminhadas para cuidados paliativos. Posteriormente foi verificado na revisão dos prontuários médicos do HOL, que 9% (4/44) das pacientes apresentaram metástase (Tabela 7) afetando o fígado em duas pacientes, o pulmão em outra e uma última mulher com provável metástase óssea).

Aquelas pacientes que ao concluírem o tratamento com radio/quimioterapia concomitante tiveram uma boa resposta e conseguiram regredir o tumor por completo (inclusive aquelas que apresentaram recidiva local, mas após tratamento de resgate conseguiram regredir o tumor), foram classificadas como pacientes com resposta completa ao tratamento (26/44).

Foram consideradas como pacientes com resposta parcial ao tratamento oncológico (12/44) aquelas que:

- Apresentaram doença residual no colo do útero (e que no final do tratamento de resgate não conseguiram regredir o tumor);
- As que apresentaram metástase;
- Pacientes que foram encaminhadas para cuidados paliativos;
- Casos fora de possibilidades terapêuticas ou que ainda estavam em tratamentos adjuvantes ou de resgate.

Sendo que 14% (6/44) das pacientes morreram (Tabela 7).

Tabela 7- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com as características do tumor e o tratamento oncológico que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| Variáveis | n (%) |
|-------------------------------|--------------|
| Tipo histológico de CA | |
| Epidermóide | 40 (91) |
| Adenocarcinoma | 4 (9) |
| Estágio FIGO da doença | |
| 1B1 | 1 (2) |
| 1B2 | 3(7) |
| IIA | 1 (2) |
| IIB | 26 (59) |
| IIIB | 9 (21) |
| IVA | 2 (5) |
| IVB | 1 (2) |
| Cirúrgico não oncológico | 1 (2) |
| Tipo de tratamento | |
| RT+QT+BT | 29 (65) |
| RT+QT | 13 (30) |
| RT exclusiva | 2 (5) |
| Doença residual | |
| Sim | 12 (27) |
| Não | 32 (73) |
| Metástase | |
| Sim | 4 (9) |
| Não | 40 (91) |
| Resposta ao tratamento | |
| Completa | 26 (59) |
| Parcial | 12 (27) |
| Óbito | 6 (14) |

Fonte: Formulário de pesquisa 2015-2018 e prontuários médicos do HOL. Dados são expressos em valores absolutos e em porcentagem. **RT:** radioterapia; **QT:** Quimioterapia; **BT:** braquiterapia.

6.2.2 Genótipos virais encontrados tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico

Antes do tratamento:

Nas 41 amostras cervicais onde foi detectado o HPV antes do tratamento (Tabela 1) também foi pesquisado o genótipo viral. Dos nove tipos virais avaliados o genótipo mais frequente encontrado antes do tratamento foi o HPV 16, seguido pelo HPV 18, 33, 35 e 52, (as frequências são mostradas na tabela 8).

Os subtipos 6, 11, 31 e 58 não foram detectados na nossa amostragem prévia ao tratamento.

As infecções simples foram observadas em 90% (37/41) das amostras, e 10% (4/41) apresentaram infecções múltiplas (com dois ou mais tipos virais). Porém, em nove amostras positivas para a presença do HPV, não foi possível detectar o genótipo viral dentro dos nove avaliados, pelo que foram designadas como "genótipo indetectável".

Depois do tratamento:

Após o término do tratamento oncológico o genótipo mais frequente foi também o HPV 16, seguido pelo HPV 18, 35, e 52 (as frequências são mostradas na tabela 8), e os HPV 6, 33, 58 foram os genótipos menos frequentes com uma amostra respectivamente. Porém em quatorze amostras positivas para a presença do HPV, não foi possível detectar o tipo viral, pelo que foram reportadas como "genótipo indetectável".

As infecções simples, após o tratamento oncológico foram observadas em 88% (29/33) das pacientes, e as infecções múltiplas (com dois ou mais tipos virais) foram observadas em 12% (4/33) delas.

Os genótipos 11 e 31, não foram detectados em nenhuma das pacientes (tanto antes quanto depois do tratamento).

O tempo transcorrido entre a primeira coleta (antes do tratamento) e a segunda (após tratamento) foi em média de 16 meses. Na tabela 9, pode-se verificar um resumo das características mais relevantes das pacientes (incluídos os genótipos encontrados em cada uma das 44 pacientes).

Tabela 8-Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com presença do DNA do HPV, o genótipo viral e o tipo de infecção antes e após o tratamento oncológico, que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018

| VARIAVEL | Antes do tratamento | Depois do tratamento |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| DNA-HPV positivo | (%) | (%) |
| Sim | 41 (93) | 33 (75) |
| Não | 3 (7) | 11 (25) |
| Genótipos de HPV | | |
| 6 | | 1 (3) |
| 11 | | |
| 16 | 27 (66) | 14 (42) |
| 18 | 3 (7) | 2 (6) |
| 31 | | |
| 33 | 3 (7) | 1 (3) |
| 35 | 3 (7) | 2 (6) |
| 52 | 2 (5) | 3 (9) |
| 58 | | 1 (3) |
| HPV indetectável | 9 (22) | 14 (42) |
| Tipo de Infecção | | |
| Simples | 37(90) | 29 (88) |
| Múltipla | 4 (10) | 4 (12) |

Fonte: Autor. Dados são expressos em valores absolutos e em porcentagem.

Tabela 9- Distribuição das 44 pacientes com câncer de colo uterino de acordo com o estágio FIGO da doença, a idade, a presença dos genótipos do HPV (antes e após o tratamento), o tempo transcorrido entre a coleta das amostras e a resposta final ao tratamento oncológico; que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| Tratamento | Estágio FIGO | Idade | Genotipo HPV | | Meses transcorridos entre a coleta AT/DT | Resposta ao tratamento | |
|------------|--------------|-------|--------------|-------------|--|------------------------|----------|
| | | | AT | DT | | | |
| RT/QT/BT | IB1 | 66 | 16 | IN | 36 | Completa | |
| | 1B2 | 68 | 16 | N | 8 | Completa | |
| | IIB | 39 | 16 | 16 | 16 | 24 | Completa |
| | | 51 | 16/ 33 | 16/ 33 | 12 | ÓBITO | |
| | | 62 | 16 | N | 12 | ÓBITO | |
| | | 37 | 16/33/35 | 16 | 8 | Completa | |
| | | 41 | IN | N | 36 | Parcial | |
| | | 45 | 16 | IN | 6 | Completa | |
| | | 49 | 16 | IN | 16 | Completa | |
| | | 34 | 16/35 | IN | 11 | Completa | |
| | | 50 | 16 | 58/35 | 12 | Completa | |
| | | 49 | 16 | N | 12 | Completa | |
| | | 47 | 16 | 16 | 12 | Completa | |
| | | 41 | 18 | N | 8 | Completa | |
| | | 45 | 16 | IN | 9 | ÓBITO | |
| | | 63 | 16 | IN | 7 | ÓBITO | |
| | | 29 | 16/18/52 | 52 | 11 | Completa | |
| | | 44 | IN | IN | 8 | Completa | |
| | | 37 | 16 | IN | 9 | Parcial | |
| | | 37 | N | IN | 24 | Parcial | |
| | | 74 | 16 | 16 | 24 | Parcial | |
| | | 36 | 52 | 16 | 6 | Completa | |
| | | 75 | IN | N | 6 | Completa | |
| | | 52 | 16 | N | 6 | Completa | |
| | | 31 | IN | N | ? | Completa | |
| | | 48 | N | IN | 36 | Completa | |
| | IIIB | 54 | IN | IN | 36 | Completa | |
| | | 36 | 16 | 52/35/ 6 | 36 | Completa | |
| | IVB | 46 | 16 | 16 | 18 | Parcial | |
| | | ? | 16 | 16 | 18 | Completa | |
| | 1B2 | 48 | N | IN | 36 | Parcial | |
| | IIA | 53 | 33 | 16 | 7 | Completa | |

| | | | | | | |
|-------|---------------|----|----|-------|----|----------|
| RT/QT | IIB | 41 | 16 | N | 24 | Parcial |
| | | 66 | 16 | 16 | 12 | Parcial |
| | | 55 | IN | N | 4 | Completa |
| | | 53 | 16 | IN | 24 | Completa |
| | IIIB | 44 | 16 | IN | 24 | Parcial |
| | | 38 | 16 | 16 | 5 | Completa |
| | | 42 | 35 | 52 | 36 | Parcial |
| | | 41 | IN | N | 8 | ÓBITO |
| | | 48 | IN | 16 | 8 | ÓBITO |
| | | 40 | 16 | 16/18 | 6 | Parcial |
| RT | CIRURGIC O | 70 | IN | 16 | 36 | Completa |
| | IIIB | 50 | 18 | 18 | 11 | Parcial |

Fonte: Autor. **AT:** antes do tratamento; **DT:** depois do tratamento; **RT:** radioterapia; **QT:** quimioterapia; **BT:** braquiterapia; **IN:** indetectável; **N:** negativo.

Quando analisadas as variáveis: estágio FIGO, modalidade terapêutica, doença residual, resposta ao final do tratamento e o tempo transcorrido entre a coleta da primeira amostra (antes do tratamento) e a segunda (depois do tratamento); quanto a sua contribuição para a persistência da infecção viral, nenhuma variável mostrou associação estatística quando comparada à presença de DNA antes e após o tratamento oncológico (os dados são mostrados na tabela 10).

Tabela 10- Distribuição das pacientes com câncer de colo uterino de acordo com a modalidade terapêutica, presença de doença residual, resposta final ao tratamento, tempo transcorrido entre a coleta das amostras e a presença/ausência do DNA do HPV tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico ; que foram atendidas no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém-Pará no triênio 2015-2018.

| Variáveis | Antes do tratamento | | Depois do tratamento | | p-valor |
|---|---------------------|----------|----------------------|-----------|---------|
| | DNA HPV+ | DNA HPV- | DNA HPV+ | DNA HPV - | |
| Modalidade terapêutica | | | | | |
| RT/QT/BT | 27 | 2 | 21 | 8 | 0,842 |
| RT/QT e RT exclusiva | 14 | 1 | 12 | 3 | |
| Doença Residual | | | | | |
| Sim | 10 | 2 | 8 | 4 | |
| Não | 31 | 1 | 25 | 7 | 0,98 |
| Resposta ao tratamento | | | | | |
| Completa | 25 | 1 | 19 | 7 | 0,76 |
| Parcial/óbito | 16 | 2 | 14 | 4 | |
| Tempo transcorrido na coleta (AT/DT) | | | | | |
| 4-8 meses | 16 | 0 | 9 | 7 | 0,2880 |
| 9-36 meses | 25 | 3 | 24 | 4 | |

Fonte: Autor. *valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes; Teste Qui-quadrado. **AT:** antes do tratamento; **DT:** depois do tratamento; **RT:** radioterapia; **QT:** quimioterapia; **BT:** braquiterapia; **+**: positivo; **-:** negativo

7. DISCUSSÃO

A persistência do HPV desempenha um papel fundamental na progressão das lesões pré-neoplásicas e no desenvolvimento do câncer de colo uterino (KOSHIOL et al., 2008; SRINIDHI SHANMUGASUNDARAM; JIANXIN YOU, 2017).

Tem sido descritos diferentes fatores de risco que podem influenciar na persistência do HPV e contribuir na progressão da infecção para o CCU, incluindo os ambientais ou exógenos, os associados ao hospedeiro e os virais (SERRANO, 2004).

Diferentes estudos tem demonstrado que a infecção pelo vírus ocorre mais comumente em indivíduos jovens (com pico mais altos de prevalência em mulheres ≤ 25 anos) devido ao início precoce da atividade sexual; e um segundo pico de infecção menos pronunciado pode ocorrer em mulheres idosas (com 55 anos ou mais), o qual pode ser devido a alterações hormonais associadas à menopausa que podem induzir a reativação da infecção latente pelo HPV, ou pode ser atribuído a mudanças no comportamento sexual das mulheres e seus parceiros na meia idade (CHAN et al., 2010; FRANCESCHI et al., 2006). O câncer de colo uterino, tende a ocorrer na meia idade e é mais frequentemente diagnosticado em mulheres entre 35-44 anos, no entanto, aproximadamente o 15% dos casos são encontrados em mulheres com mais de 65 anos (The American Cancer Society, 2018). Neste estudo, observamos que a idade média das pacientes diagnosticadas com CCU, foi de 47 anos (com uma variação de 29-75 anos).

As pacientes neste estudo tiveram um início precoce da atividade sexual (em média aos 14 anos), e a maioria delas relataram ter se relacionado com múltiplos parceiros sexuais na vida (com uma média de três), o que aumenta o risco de infecção com o vírus do HPV (ROSA et al., 2008). A gravidez também é considerada um importante fator de risco, pois as mudanças hormonais induzidas por esta condição podem manter a junção escamo colunar (JEC) ou zona de transformação do colo uterino na ectocérvice o que facilita a direta exposição ao HPV; a exteriorização da JEC também ocorre após múltiplos partos por via vaginal (CRUZ e MELO, 2010); este fator de risco se viu refletido em nossas pacientes, onde a maioria delas tinham tido múltiplas gestações (com uma média de cinco filhos por parto vaginal).

O uso de contraceptivos orais por longos períodos de tempo aumenta o risco de CCU em mulheres que são positivas para o DNA do HPV; mas o uso consistente

e correto de contraceptivos de barreira reduz o risco de contrair infecções pelo HPV (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Porém, embora as pacientes neste estudo não usavam contraceptivos orais, a maioria delas também não faziam uso de contraceptivos de barreira, aumentando assim a chance de infecção pelo vírus.

Fatores socioeconômicos tais como baixa escolaridade ou baixa renda, contribuem para o desconhecimento por parte das mulheres tanto desta infecção sexualmente transmissível como da necessidade de fazer periodicamente o PCCU, e a falta de informação ou de instrução pode influenciar com que a paciente tenha dificuldades para vencer tabus relacionados com exames ginecológicos e não procure assistência médica mesmo apresentando sintomas (CORRAL, CUEVA, *et al.*, 1996). Neste estudo foi possível observar que a maioria das pacientes eram analfabetas ou com ensino fundamental incompleto e um pouco menos da metade, nunca tinham feito o PCCU anteriormente.

Mais da metade das pacientes neste estudo estiveram expostas ao tabaco, o qual possui componentes que têm sido reportados como promotores de carcinogênese e tumorigênese (NÚÑEZ-TROCONIS, 2017). Porém a maioria das participantes, segundo autorrelato, não consumiam álcool (o qual contém acetaldéido, que pode causar danos ao DNA, impedindo o funcionamento normal das células), nem estiveram expostas a outros agentes infecciosos diferentes ao HPV, e é importante destacar que a infecção por outros microorganismos como *Chlamydia trachomatis* pode causar cervicite, que é uma infecção crônica das células endocervicais da zona de transformação, a qual pode predispor à mulher a outras ISTs, incluindo infecção por HPV genital (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018; MADELEINE *et al.*, 2007).

Quando avaliados todos estes fatores de risco previamente citados, com o teste de aderência, observamos que alguns dos resultados concordam com os esperados nas pacientes com câncer de colo uterino, como por exemplo: a maioria das pacientes tinham uma baixa escolaridade, não faziam uso de contraceptivos de barreira, e um pouco menos da metade nunca tinha feito anteriormente o exame de preventivo. Porém outros dos fatores de risco, deram resultados diferentes ao esperados, como por exemplo: a maioria das pacientes eram casadas (e se esperaria um maior número de casos de CCU em mulheres sem parceiro sexual estável); e o grupo de mulheres com câncer que relataram não ter sofrido aborto,

não consumir álcool, nem ter padecido previamente outra infecção sexualmente transmissível, foi maior.

Até hoje são poucos os estudos que se tem sobre a detecção da persistência viral após o tratamento oncológico com radio/quimioterapia. No estudo de VENUTI, 2010, onde foram tratadas 18 mulheres com radio/quimioterapia o DNA do HPV foi detectado em 84% (16/18) das pacientes antes do tratamento, persistindo em 62,5% (10/16) delas após finalizado o tratamento; o que pode ser devido à presença de todo o genoma do vírus, fragmentos de células tumorais degradadas ou resíduos celulares que ficam depois do tratamento. Estes resultados são similares com os obtidos neste estudo, onde o DNA do HPV foi detectado em 93% das pacientes e persistiu em 73% delas.

No estudo de NAGAI et al., 2004, também se observou uma taxa de persistência similar do HPV (56,7%), em pacientes tratadas com radioterapia onde a persistência viral estava associada com altas taxas de recidiva local e menor sobrevida ; e no estudo de SONG et al., 2011, o vírus persistiu em 18,6% (29/156) das pacientes tratadas com radio/quimioterapia concomitante, onde a alta taxa de eliminação da infecção por HPV, possivelmente se deva a que a maioria das pacientes foram tratadas com radio/quimioterapia concomitante; resultados parecidos com os nossos, onde a maioria das pacientes foram tratadas com esta modalidade terapêutica.

NAGAI et al., 2004, observaram, que o rendimento diagnóstico do teste de HPV para detecção de recidiva pós-radioterapia foi maior em 3 meses, e que o DNA do HPV pode ser persistentemente detectado após a radioterapia em tumores de grande tamanho (porque os fragmentos de DNA do HPV podem estar presentes nas células tumorais degradadas, mesmo depois que todas as células cancerosas morrerem). Eles advertem que a detecção de uma pequena quantidade de DNA do HPV pode ser falsamente interpretada como uma ablação inadequada de células tumorais, pelo que sugerem que os testes positivos do HPV no período após a radioterapia devem ser tomados com cautela e devem ser meticulosamente acompanhados (sempre os associando a outras evidências clínicas que sugiram a presença de doença localmente persistente ou recorrente). Neste estudo, no entanto, podemos afirmar que a positividade do teste do DNA viral em todas as pacientes, não foi devido a falsos positivos (por fragmentos de DNA do HPV nas

células mortas), porque o tempo médio transcorrido entre a finalização do tratamento com radioterapia, e a detecção do HPV pós-tratamento foi de 16 meses.

Como foi mostrado, a maioria das nossas pacientes foram tratadas por câncer de colo uterino epidermóide, o tipo histológico mais predominante que representa três quartas partes deste tipo de câncer no mundo (VINH-HUNG et al., 2007); e a maioria delas foram tratadas com radio/quimioterapia concomitante, que é o tratamento padrão para a doença em estágios avançados.

Embora o tratamento principal incluía a radioterapia, existe pouca informação sobre uma possível relação entre a história natural da infecção por HPV e a resposta à radiação nos tumores de colo uterino. Aproximadamente 30-40% das pacientes com fatores prognósticos semelhantes não respondem igualmente a esse tratamento, o que pode ser devido a uma subpopulação de células tumorais resistentes ao tratamento (MORENO-ACOSTA et al., 2017). Porém, o fenômeno biológico subjacente e as razões para a variabilidade de uma pessoa para outra ainda são desconhecidas.

Até hoje, estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que os tumores do câncer de colo uterino caracterizam-se por ter um metabolismo altamente hipóxico e uma alta taxa de glicólise, o que conduz a uma resistência à radio/quimioterapia (MORENO-ACOSTA et al., 2016). Como consequência do crescimento tumoral, as células localizadas no interior da massa tumoral ficam menos expostas à irrigação sanguínea e, conseqüentemente ao oxigênio (e para que os radicais livres produzidos pela radiação possam causar dano à célula tumoral, precisam de oxigênio). Existe também, uma relação direta entre a diminuição dos níveis de hemoglobina (Hb) e a diminuição da oxigenação do tumor (os níveis de Hb <11 g / dl estão diretamente associados com a hipóxia do tumor).

Por outro lado, como mencionado anteriormente, a radioterapia é um tratamento que é fracionado e administrado em pequenas doses, o que permite a recuperação de tecidos normais e previne reações tóxicas graves; mas isso pode levar a que a célula tumoral sobrevivente tenha o tempo suficiente para se multiplicar (repopulação celular). Em certos tipos de câncer (incluindo o câncer de colo uterino) a taxa de controle do tumor diminui quando a duração total do tratamento é prolongada além do previsto (YANG et al., 2014). Essa demora pode influenciar na resposta adequada ao tratamento, e pode acontecer se as pacientes não comparecem às consultas no tempo marcado para a terapia, sofrem alguma

complicação durante o tratamento (e tem que suspendê-lo por certo tempo), ou quando o aparelho da radioterapia se danifica, e as pacientes ficam sem o seu tratamento por longos períodos de tempo.

Ainda se sabe muito pouco, se existe uma relação entre o genótipo do HPV causante do CCU, e a resposta final ao tratamento com radioterapia. Os dados continuam sendo contraditórios. FERDOUSI et al., 2010, por exemplo, demonstraram que mulheres infectadas com HPV 16 e 33, tem um mau prognóstico e uma resposta mais fraca depois de ser tratadas com radiação ou quimiorradiação. WANG et al., 2010, relataram que pacientes com CCU positivos para as espécies de HPV α -7 (HPV 18, 39, 45, 59 e 68) tiveram um controle local (CL) mais pobre após a RT em comparação com pacientes positivos para as espécies α -9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52 e 58).

No entanto, testes em linhagens clonais de CCU, revelaram que o mau prognóstico associado às espécies de HPV não poderia ser explicado pelas radio sensibilidades intrínsecas, porque as células infectadas tanto por espécies α -9 e α -7 do HPV tinham radio sensibilidades semelhantes (HALL et al., 2013).

No nosso estudo, então, o fato de que alguns das pacientes não tenham respondido completamente ao tratamento oncológico, pode ser devido à participação de diferentes fatores que podem estar envolvidos na resposta ao tratamento, incluindo: o tempo prolongado do tratamento, que pode levar à repopulação das células malignas (JEMU et al., 2018), (sendo que, durante a coleta das nossas amostras foi possível constatar que muitas das pacientes estiveram sem o tratamento radioterápico por certo tempo, porque o aparelho estava danificado); o tamanho do tumor (tumores maiores são menos oxigenados) (PEDERSEN et al., 1995); a pouca oxigenação do tumor (MORENO-ACOSTA et al., 2013; QIN et al., 2014); o baixo nível de hemoglobina que indica anemia impossibilitando a utilização do quimioterápico cisplatina (além de contribuir para a diminuição da oxigenação tumoral) (VAUPEL, 2004), entre outros.

Neste estudo, observamos que a maioria das pacientes que responderam favoravelmente ao tratamento, persistiram com infecção viral, porém, se precisariam de mais estudos para determinar se realmente o genótipo viral pode ser considerado um marcador prognóstico de resposta ao tratamento.

Embora neste estudo se tenham poucas pacientes com recidiva e metástase a distância de câncer do colo do útero, é importante destacá-lo. Para as pacientes

com câncer de colo uterino, existem dois tipos de metástases: a metástase hematogênica (onde as células cancerígenas se separam do tumor primário, viajam através do sistema sanguíneo e formam um novo tumor em outros órgãos; sendo os mais comuns: os pulmões, ossos, fígado, e o cérebro) e a metástase linfática (onde os lugares afetados são todos linfonodos e não órgãos pélvicos. As células tumorais são transportadas pela linfa, e podem chegar aos linfonodos mais próximo e distantes ao tumor) (LI; WU; CHENG, 2016a).

Pacientes com metástase hematogênica apresentam um risco maior de morte do que aquelas com metástase linfática. No presente estudo, duas pacientes apresentaram metástase no fígado (uma no estágio II da doença e a outra no estágio IV), e segundo a literatura, o fígado é o lugar mais afetado quando o câncer de colo uterino faz metástase aos órgãos distantes (até 33% das pacientes apresentam este tipo de metástase) (SALMERÓN, MURRIETA GONZÁLEZ, *et al.*, 2002); uma paciente apresentou metástase no pulmão, sendo que de 4,16% a 7,7% das pacientes desenvolvem este tipo de metástase (a sobrevida média das pacientes com metástase pulmonar, após o diagnóstico é de aproximadamente 18 meses, com taxas de sobrevida em 2 e 5 anos de 37,7% e 7,5% respectivamente), sendo que a tomografia computadorizada pulmonar é recomendada em pacientes com câncer de colo uterino em estágios IA-IIB durante o período de acompanhamento.

Teve-se também, uma paciente com suspeita de metástase óssea, que é observada em 0,8% a 23% de todos os casos (LI; WU; CHENG, 2016a), onde as taxas de metástase em cada um dos quatro estágios clínicos se informam da seguinte forma: 4,0% no estágio I, 6,6% no estágio II, 8,0% no estágio III e 22,9% no estágio IV (sendo que, se as pacientes com este tipo de metástase não recebem tratamento sobrevivem menos de 6 meses).

E interessante destacar que três das quatro pacientes que apresentaram metástase neste estudo se encontravam no estágio IIB da doença (estágio que sem dúvida merece mais atenção em estudos posteriores).

A respeito dos resultados do diagnóstico molecular, podemos observar diferentes situações, no que à infecção pelo HPV se refere. Tiveram-se pacientes que resolveram a infecção pelo vírus; pacientes que após o término do tratamento do câncer persistiram com o mesmo genótipo viral (a maioria com genótipos de alto risco oncogénico); aquelas que tinham de um a dois genótipos diferentes (que o

inicial) após o término do tratamento; pacientes com infecções múltiplas que persistiram com um genótipo viral e conseguiram eliminar a infecção por outros genótipos; aquelas nas que antes do tratamento o DNA do vírus não pôde ser detectado e após o término sim (mas não conseguimos identificar o genótipo viral), entre outros, podendo existir diferentes explicações para estes diferentes cenários, que a continuação se tentaram esclarecer:

Como foi observado o genótipo mais prevalente (causando a maioria das infecções nas pacientes) foi o HPV 16, tanto antes quanto após o término do tratamento (em infecções simples e múltiplas), o que concorda com estudos que sugerem que tanto o HPV 16 quanto o 18 são os genótipos mais comuns causantes do CCU em todo o mundo (embora a distribuição do HPV pode variar geograficamente) (DE SANJOSE et al., 2010; MUÑOZ et al., 2003).

Nos casos onde o HPV 16 foi detectado na mesma amostra (antes e após o tratamento) e em um intervalo curto de tempo, é consistente com dados que sugerem que o HPV 16 persiste por um tempo um pouco mais longo (cerca de 12 meses) do que outros genótipos virais (6 a 8 meses) (GALLOWAY, 2003); de modo que as lesões que apresentem este genótipo, podem progredir para o câncer muito mais rápido do que aqueles que apresentem infecção por outros genótipos (LIZANO-SOBERÓN; CARRILLO-GARCÍA, 2009).

O surgimento de genótipos distintos do HPV 16 (o genótipo mais frequente no estudo) após o término do tratamento, pode ser devido a que uma infecção prévia com este genótipo viral, aumenta o risco de adquirir outros genótipos virais (LIAW et al., 2001), o que pode estar relacionado ao comportamento sexual da paciente ou a aspectos imunológicos, que podem sugerir que a paciente é imunologicamente suscetível a infecções por qualquer genótipo do HPV. ROUSSEAU et al., 2001, por outro lado, concluem, que a infecção prévia com qualquer genótipo de HPV (não só com o HPV 16 ou outro de alto risco), está associado com uma maior probabilidade de adquirir outros genótipos diferentes em algum momento da vida; e que nenhum genótipo viral tem mais ou menos probabilidades de ser eliminado antes que outro, quando detectado em infecções múltiplas.

Estudos sugerem que a detecção sequencial de diferentes genótipos de HPV, poderia indicar a sua transmissão por um ou mais parceiros sexuais, mas também é possível que vários genótipos virais sejam transmitidos simultaneamente pelo mesmo parceiro sexual. Ou seja, mais de um genótipo de HPV pode ser

transmitido simultaneamente, e sua detecção sequencial depois disso é uma consequência de ciclos de vida replicativos que são assíncronos e que só ocasionalmente se sobrepõem (esses ciclos de vida podem ser interdependentes) (WOODMAN et al., 2001; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

Outros estudos indicam que alguns genótipos de HPV podem interagir ou agir sinergicamente para induzir o desenvolvimento ou progressão da lesão; e que o risco de desenvolver lesões de alto grau e câncer invasivo do colo do útero parece aumentar consideravelmente entre mulheres com infecções de tipo múltiplo, em comparação àquelas que abrigam um único genótipo de HPV (TROTIER, 2006).

Embora neste estudo, poucas pacientes apresentaram infecções múltiplas (aproximadamente 10%), tem sido sugerido que as mulheres infectadas com múltiplos genótipos das espécies $\alpha 9$ do HPV (HPV 16,31, 33, 35, 52, 58, 67, etc.), e com espécies $\alpha 7$ (HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85) podem ter um risco maior de desenvolver CCU de 5,3 e 2,5 vezes respectivamente (SENAPATI et al., 2017).

A nova detecção do HPV ou a detecção de um genótipo diferente (após o tratamento) neste estudo poderia dever-se a: uma infecção antiga persistente que estava controlada ou abaixo do limiar de detecção; a uma nova infecção, sem deixar de considerar que a maioria das pacientes neste estudo eram casadas (e relataram não ter outro parceiro sexual diferente ao marido no formulário após o término do tratamento), e onde essa nova infecção pode provir do próprio marido. Tendo em conta o longo período de tempo entre a coleta da primeira e a segunda amostra, a nova detecção do vírus pode ser devido a uma infecção proveniente de um parceiro sexual diferente.

Com relação às poucas amostras onde antes do tratamento não foi possível detectar o DNA do vírus, mas sim após este; isso pode ser devido à possibilidade de um falso negativo devido a um erro na coleta da amostra onde foram coletadas poucas ou nenhuma célula transformada. Porém, o resultado verdadeiramente negativo pode ser devido a um mecanismo chamado "*hit-and-run*" que leva à perda do genoma do HPV ou ao desenvolvimento do tumor através de uma via HPV independente (HERRINGTON, 1999), o que é pouco provável visto que em 99,7% dos casos de câncer do colo uterino o DNA deste vírus é detectado.

No caso das pacientes em que o DNA do HPV foi detectado, mas não conseguimos identificar o genótipo viral (sendo que todas as amostras foram testadas com sondas específicas para sete HPVs de alto risco e dois de baixo risco),

isso pode ser devido à diversidade genética do vírus, onde existem outros HPV de alto risco circulando, e que já foram detectados previamente nesta região do país (como por exemplo: o HPV 82, 68, 26, 53, 66 e 70) (VIEIRA, 2014).

8. CONCLUSÕES

As pacientes tratadas com radioterapia e quimioterapia no Hospital Ophir Loyola:

- Tinham uma idade média de 47 anos (a idade variou de 29- 75 anos);
- A maioria eram casadas ou com companheiro estável e com baixo nível de instrução;
- Tinham tido uma média de três parceiros sexuais durante a vida, iniciado a atividade sexual por volta dos 14 anos;
- Tinham uma média de cinco filhos;
- A maioria não fazia uso de contraceptivos de barreira, e um pouco menos da metade nunca tinha feito o exame do preventivo (PCCU) antes da detecção da doença;
- Mais da metade das pacientes estiveram expostas ao fumo em algum momento da vida, dois quintos destas consumia álcool e uma minoria esteve exposta a outra IST.

Em três quartos das mulheres com CCU o DNA do HPV foi detectado tanto antes quanto após o término do tratamento oncológico pela Reação em Cadeia da Polimerase; a taxa final de eliminação do vírus foi de 25%. Podendo afirmar que a chance do DNA do HPV estar presente após o término do tratamento é 4 vezes menor que antes do tratamento oncológico (o tratamento concomitante com radioterapia e quimioterapia pode ajudar na eliminação do vírus).

Foram identificados sete genótipos diferentes do HPV (HPV 6, 16, 18, 33, 35, 52 e 58), dos quais o tipo 16 foi o mais frequente tanto antes quanto após o término do tratamento. Porém em algumas amostras positivas para o vírus, não foi possível a detecção do genótipo viral.

Quando correlacionado os fatores de risco, as características do tumor e a modalidade terapêutica, quanto a sua contribuição para a infecção e persistência do HPV (tanto antes quanto após o tratamento) não foi possível observar significância estatística, (devido possivelmente ao baixo tamanho amostral no nosso estudo).

Ao final do tratamento oncológico, mais da metade das pacientes tiveram remissão completa, aproximadamente um terço teve remissão parcial, e 14% foram a óbito. Observou-se que pacientes com resposta completa ao tratamento oncológico, persistiam com o vírus, porém, se precisariam de mais estudo para

confirmar se a presença de determinados genótipos virais influencia na resposta final ao tratamento.

A detecção do DNA do HPV pode ser uma ferramenta útil para saber o prognóstico das pacientes tratadas por câncer de colo uterino. Mas definir quando uma infecção é persistente ou transitória continua sendo difícil; entender a diferença entre estes dois é fundamental para poder implementar estratégias de prevenção e controle deste tipo de câncer, baseadas na detecção do DNA viral.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R. E. B.; CAMPOS, J. B. Virus oncogénicos: el paradigma del virus del Papiloma humano. **Virus**, v. 51, n. 3, 2007.
- ÁLVAREZ ALDANA, A.; SEPÚLVEDA ARIAS, J. C.; SILLER LÓPEZ, F. Carcinogénesis inducida por el virus del Papiloma humano. **Investigaciones Andina**, v. 14, n. 24, p. 438–456, 2012.
- ALVARENGA ROCHA, G.; MELO, V. H. Biologia molecular no rastreamento das neoplasias cervicais uterinas. **Femina**, v. 38, n. 3, p. 168-172, março 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Survival Rates for Cervical Cancer, by Stage, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/detection-diagnosis-staging/survival.html>>. Acesso em: 28 outubro 2017.
- ARIAS-PULIDO, H. et al. Human Papillomavirus Type 16 Integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1755–1762, may 2006.
- ASTUDILLO GONZÁLEZ, O. B.; FLORES MONTESINOS, C.; ESPINOZA SALAMEA, M. R. Diagnóstico molecular del virus del Papiloma humano. **Panorama médico**, v. 8, n. 1, p. 64 - 69, julio 2014.
- BELTRÁN-LISSABET, J. F. Panorámica de los receptores celulares del virus del papiloma humano y su repercusión en la purificación de partículas semejantes a virus. **Vacunax**, v. 15, n. 1–2, p. 29–36, enero 2014.
- BHATLA, N.; MODA, N. The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. **Indian Journal of Medical Research**, p. 5, 2009.
- BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33–39, jan. 2011.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244–265, 1 abr. 2002.
- BRENDLE, S. A.; BYWATERS, S. M.; CHRISTENSEN, N. D. Pathogenesis of infection by human papillomavirus. **Human Papillomavirus**, v. 45, p. 47–57, 2014.
- BROTHERTON, J. M. L. Confirming cross-protection of bivalent HPV vaccine. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 1227–1228, december 2017.
- Câncer do Colo do Útero. p. 4, [s.d.].
- CASTAÑEDA, M. S.; TOLEDO, R.; AGUILERA, M. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres de Zacatecas. **Salud pública de México**, v. 40, n. 4, p. 330–338, 1998.
- CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 110, n. 3, p. S4–S7, 2008.

CAVAZZA, M. E.; CORRENTI, M. Pruebas moleculares para la detección del virus Papiloma humano. Desafíos y posibilidades. **Dermatología Venezolana**, v. 42, n.3, p. 5, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Condoms and STDs: Fact Sheet for Public Health Personnel, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/condomeffectiveness/spanish/latex.html>>. Acesso em: 16 novembro 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Alcohol and Cancer, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/spanish/cancer/alcohol/index.htm>>. Acesso em: 16 novembro 2018.

CHAN, P. K. S. et al. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 1, p. 297–301, 1 jan. 2010.

CORRAL, F. et al. La baja escolaridad como factor de riesgo en el cáncer de cuello de útero. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)**, v. 121, n. 6, 1996.

CRUZ, F. J.; MELO, V. H. Fatores associados à persistência da infecção pelo HPV na cérvix uterina. **Femina**, v. 38, n. 8, agosto 2010.

DE LA FUENTE-VILLARREAL, D. et al. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. **Revista Medicina Universitária**, v. 12, n. 49, p. 231-238, septiembre 2010.

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

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

DE VINCENZO, R. et al. HPV vaccine cross-protection: Highlights on additional clinical benefit. **Gynecologic Oncology**, v. 130, n. 3, p. 642–651, set. 2013.

DINIZ, G. C. Vírus do papiloma humano (HPV): aspectos moleculares, reação imunológica do hospedeiro e bases do desenvolvimento da vacina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 3, p. 7, 2009.

DO CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus humano. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v. II, n. 1, p. 29-31, 2007.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7–15, mar. 2005.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 2–23, mar. 2015.

DUNNE, E. F.; PARK, I. U. HPV and HPV-Associated Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 765–778, dez. 2013.

FERDOUSI, J. et al. Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 3, p. 525–530, 2010.

FIGUEIRÊDO, P. G. et al. Detecção do DNA do papilomavírus humano após excisão da zona de transformação com alça diatérmica para tratamento de neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 1, fev. 2003.

FILHO, S.; LOPES, A. Use of the prognosis markers in the treatment for the invasive cervical carcinoma. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 9, p. 468–473, set. 2009.

FONSECA, F. Neoplasia intraepitelial cervical: da etiopatogenia ao desempenho da tecnologia no rastreio e no seguimento. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 24, n. 1, p. 53–61, 2012.

FOR THE INC HPV STUDY GROUP et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1184–1190, abril 2009.

FRANCESCHI, S. et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 11, p. 2677–2684, december 2006.

FRAZER, I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. S10–S16, december 2007.

GALLOWAY, D. A. Papillomavirus vaccines in clinical trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 8, p. 469–475, august 2003.

GARRIDO SÁNCHEZ, M. C. et al. Revisión de la exenteración pélvica en el cáncer de cérvix. Descripción de nuestra casuística. **Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia**, v. 41, n. 3, p. 122–128, 1 jul. 2014.

GHITTONI, R. et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p. 1–13, february 2010.

HALL, J. S. et al. Poor prognosis associated with human papillomavirus $\alpha 7$ genotypes in cervical carcinoma cannot be explained by intrinsic radio sensitivity. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 85, n. 5, p. e223–e229, april 2013.

HAMID, N. A.; BROWN, C.; GASTON, K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 66, n. 10, p. 1700–1717, may 2009.

HERNÁNDEZ, R. A. et al. Factores relacionados con el cáncer cervicouterino en el estado de Nayarit, México. **Ginecología y Obstetricia de México**, v. 75, n. 6, 2007.

HERRERA, F. G.; PRIOR, J. O. The role of PET/CT in cervical cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

HERRINGTON, C. S. Do HPV-negative cervical carcinomas exist?-revisited. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 1–3, set. 1999.

HOFFMAN, B. L. et al. **Ginecología de Williams - 2ed.** [s.l.] Artmed Editora, 2014.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324–334, february 2009.

IARC MONOGRAPHS. HUMAN PAPILLOMAVIRUSES. **Lyon, France: IARC**, 2011.

INCA (ED.). CÂNCER DO COLO DO ÚTERO. v. 46, n. 4, p. 351–54, 2000.

INCA. Tratamento Câncer Colo do Útero, 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterotrato1>. Acesso em: 3 Fevereiro 2018.

INCA/MS. Câncer do Colo do Útero, Conduas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 6, p. 351-54, 2000.

INSTITUTO ONCOLOGIA. Opções de Tratamento para Câncer de Colo do Útero por Estágio 2017. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/opcoes-de-tratamento-para-cancer-de-colo-do-uteropor-estagio/6723/285/>>. Acesso em: 25 agosto 2017.

INTHARABURAN, S. et al. Human papillomavirus infection following radiation therapy or concurrent chemoradiation for invasive cervical cancer. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 95, n. suppl 5, p. S38–S41, 2012.

JEMU, M. et al. Tumour and treatment factors influencing the outcome of chemoradiation in stage IIB cervical cancer: a single institution experience. **Southern African Journal of Gynaecological Oncology**, v. 10, n. 1, p. 5–10, 2 jan. 2018.

KAHN, J. A. HPV Vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 3, p. 271–278, 16 jul. 2009.

KAMRAVA, M.; BANERJEE, R. Brachytherapy in the treatment of cervical cancer: a review. **International Journal of Women's Health**, p. 555, may 2014.

KOSHIOL, J. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, n. 2, p. 123–137, 15 may 2008.

KYRGIU, M.; SHAFI, M. I. Invasive cancer of the cervix. **Obstetrics, Gynecology & Reproductive Medicine**, v. 20, n. 5, p. 147–154, 1 may 2010.

LEE, J. O.; RUSSO, A. A.; PAVLETICH, N. P. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 859–865, 26 feb. 1998.

LI, H.; WU, X.; CHENG, X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 27, n. 4, 2016a.

LI, H.; WU, X.; CHENG, X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 27, n. 4, p. e43, jul. 2016b.

LISSABET, B.; FÉLIX, J. Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma humano. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 45, n. 2, 2014.

LIZANO-SOBERÓN, M.; CARRILLO-GARCÍA, A. Infección por virus del Papiloma humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. **Cancerología**, v. 4, p. 205-216, 2009.

LÓPEZ, J. et al. Detección y tipificación de virus Papiloma humano en lesiones preneoplásicas de cuello uterino. **Revista médica de Chile**, v. 138, n. 11, p. 1343–1350, 2010.

LÓPEZ, J.; ARISTIZÁBAL, F. A. Integración viral y cáncer de cuello uterino. **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**, Bogotá, v. 35, n. 1, p. 5-32, Junio 2006.

LÓPEZ-CARBALLEIRA, A. et al. Imagen por resonancia magnética en la estadificación y planificación del tratamiento del cáncer de cérvix. **Radiología**, p. 269-276, 2016.

MADELEINE, M. M. et al. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 3, p. 650–655, 1 feb. 2007.

MAGÛES, M.; GUILLERMO, L. **Genotipificación del virus del Papiloma humano mediante secuenciación y PCR cuantitativa en tiempo real y detección de variantes intratípicas por análisis fitogenético**. 2015. 131f. Tesis de grado (Biología)- Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos naturales, Escuela Politécnica del Litoral, Guayaquil.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7874–7887, 2001.

MARTÍN ANGULO, M. et al. Cáncer de cérvix. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, Enfermedades oncológicas (I). v. 10, n. 24, p. 1606–1612, 1 enero 2009.

MATEOS-LINDEMANN, M. L. et al. Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del Papiloma humano. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, jun. 2016.

MEDINA, M. L.; MEDINA, M. G.; MERINO, L. A. Diagnostic valuation of molecular technologies for detection of mouth infection for virus of the human papiloma. *Revista Costarricense de Salud Pública* v. 21, p. 116-122, 2012.

MORENO-ACOSTA, P. et al. Expresión de marcadores hipóxicos y glucolíticos CAIX, GLUT-1, HKII y su relación con la respuesta temprana al tratamiento en carcinoma escamocelular de cuello uterino. **Progresos de Obstetricia y Ginecología**, v. 56, n. 8, p. 404–413, octubre 2013.

MORENO-ACOSTA, P. et al. Novel predictive biomarkers for cervical cancer prognosis. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 5, n. 6, p. 792–796, december 2016.

MORENO-ACOSTA, P. et al. Biomarkers of resistance to radiation therapy: a prospective study in cervical carcinoma. **Radiation Oncology**, v. 12, n. 1, december 2017.

MORFFIZ, Y. S.; HIRIARTH, B. M. Colposcopia con histodiagnóstico de virus del papiloma humano en mujeres de Camagüey, Cuba. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, v. 58, n. 1, p. 30–35, 2011.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 213–228, 1 nov. 2002.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 6 february 2003.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1–S10, august 2006.

NAGAI, Y. et al. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 6, p. 1907–1913, december 2004.

NEWTON, C. L.; MOULD, T. A. Invasive cervical cancer. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, 2017.

NÚÑEZ-TROCONIS, J. Cigarrillo y cáncer de cuello uterino. **Revista chilena de obstetricia y ginecología**, v. 82, n. 2, p. 144–152, abr. 2017.

OMS. Papilomavirus humanos (VPH) y cáncer cervicouterino, 2015. Disponible em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>>. Acceso em: 26 agosto 2017.

OMS. Virus del papiloma humano (VPH), 2017. Disponible em: <<http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/es/>>. Acceso em: 19 abril 2018.

OSTÖR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, v. 12, n. 2, p. 186–192, april 1993.

PASSOS, M. R. L. et al. Papilomavírose humana em genital, parte I. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, Niterói, RJ, v. XX, n. 2, p. 108-112, 2008.

PEDERSEN, D. et al. Prognostic value of pretreatment factors in patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix treated by radiotherapy alone. **Acta Oncologica**, v. 34, n. 6, p. 787–795, jan. 1995.

PEREIRA DE LIMA, M. A.; LIMA DA SILVA, C. G.; BAREM RABENHORST, S. H. Papel das proteínas precoces do Papilomavírus humano na carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 4, p. 565-573, 2013.

PINIDIS, P. et al. Human papillomavirus life cycle and carcinogenesis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 1, 2016.

PIRTEA, L. et al. Human papilloma virus persistence after cone excision in women with cervical high grade squamous intraepithelial lesion: A prospective study. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale**, v. 2016, 2016.

QIN, C. et al. Factors associated with radiosensitivity of cervical cancer. **ANTICANCER RESEARCH**, p. 8, 2014.

ROSA, M. I. et al. Persistence and clearance of Human papillomavirus infection: a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 6, p. 617.e1-617.e7, dez. 2008.

ROUSSEAU, M. et al. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 12, p. 1508–1517, 15 december. 2001.

ROUZIER, R.; LEGOFF, S. Cancer du col de l'utérus. **EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)**, eds. **Traité de médecine Akos**, p. 3–1250, 2007.

SALMERÓN, A. A. et al. Sitios frecuentes e infrecuentes de localización del carcinoma cervicouterino recurrente. Hallazgos por Tomografía Computada. **Anales de Radiología México**, v. IV, p. 565-571, 2002.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R.; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiante**. Lyon: Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.

SENAPATI, R. et al. HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187844, 21 nov. 2017.

SENBA, M.; MORI, N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. **Oncology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 17, 5 october 2012.

SERRANO, R. O. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 55, n.2, p. 146-160, 2004.

SILVA, R. et al. Diagnóstico de la infección por virus Papiloma humano en el hombre. **Revista chilena de infectología**, v. 30, n. 2, p. 186–192, 2013.

SINGH, N.; ARIF, S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer - a review. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 14, n. 5, p. 741–750, set. 2004.

SONG, Y. J. et al. Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 4, p. 896–902, 15 august 2011a.

SONG, Y. J. et al. Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 4, p. 896–902, 15 august 2011b.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155–160, 2005.

SOUZA, S. et al. Papilomavírus humano: biologia viral e carcinogênese. **Femina**, v. 43, n. 4, ago. 2015.

SRINIDHI SHANMUGASUNDARAM; JIANXIN YOU. Targeting persistent Human Papillomavirus infection. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 229, 18 august 2017.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, n. 2, p. S15–S21, may 2008.

TREJO, E. D.; ZARAGOZA, O. P.; CUEVAS, R. Z. Factores de riesgo para cáncer cérvico uterino en pacientes atendidas en el Centro Estatal de Cancerología “Dr. Miguel Dorantes Mesa”. **Revista Médica de la Universidad Veracruzana**, v. 12, n. 1, p. 20–24, 2012.

TROTTIER, H. Human papillomavirus Infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 7, p. 1274–1280, 1 jul. 2006.

VALLEJO-RUIZ, V. et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein and its role in the cell transformation. **Revista médica del instituto mexicano del seguro social**, v. 53, p. S172, 2015.

VAN DOORSLAER, K.; BURK, R. D. Evolution of Human papillomavirus carcinogenicity. **Advances in virus research**, v. 77, p. 41, 2010.

VAUPEL, P. Tumor Hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. **The Oncologist**, v. 9, n. suppl_5, p. 4–9, 1 nov. 2004.

VENUTI. Persistence of HPV after radio-chemotherapy in locally advanced cervical cancer. **Oncology Reports**, v. 23, n. 4, 4 may 2010.

VIEIRA, R. C. **Prevalência e genotipagem do Papilomavírus humano (HPV) em estudantes universitárias em Belém, Pará, Brasil.** 2014. 60f. Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária na Amazônia) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará e Instituto Evandro Chagas, Belém, 2014.

VORDERMARK, D. Radiotherapy of cervical cancer. **Oncology research and treatment**, v. 39, n. 9, p. 516–520, 2016.

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 9376, p. 2217–2225, 28 jun. 2003.

WANG, C.-C. et al. Clinical effect of Human papillomavirus genotypes in patients with cervical cancer undergoing primary radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 78, n. 4, p. 1111–1120, nov. 2010.

WEDDING, U. et al. Tolerance to Chemotherapy in Elderly Patients with Cancer. **Cancer Control**, v. 14, n. 1, p. 44–56, jan. 2007.

WILSON, R.; FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Role of the E1 E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of Human Papillomavirus Type 31. **Journal of Virology**, v. 79, n. 11, p. 6732–6740, 1 jun. 2005.

WOODMAN, C. B. et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. **The Lancet**, v. 357, n. 9271, p. 1831–1836, jun. 2001.

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

YANG, J. et al. Repopulation of tumor cells during fractionated radiotherapy and detection methods (Review). **Oncology Letters**, v. 7, n. 6, p. 1755–1760, jun. 2014.

YIM, E.-K.; PARK, J.-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research and Treatment**, v. 37, n. 6, p. 319, 2005.

ZALDÍVAR LELO DE LARREA, G. et al. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. **Revista chilena de obstetricia y ginecología**, v. 77, n. 4, p. 315–321, 2012.

ZANATTA SARIAN, L. O. **Variação na detecção do DNA-HPV de alto risco oncogênico no seguimento de mulheres portadoras de neoplasia intra-epitelial cervical tratadas com conização por alça diatérmica.** 2003. Dissertação (mestrado), Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 1 may 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, february 2009.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. **Cancer research**, v. 36, february 1976.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A senhora foi convidada para participar como voluntária da pesquisa “**Persistência do Papilomavírus Humano –HPV- após tratamento em casos de câncer invasivo de colo uterino**” coordenada pela pesquisadora Dr^a Fabiola E. Villanova.

O papiloma vírus humano ou HPV é responsável pelo câncer do colo do útero. Este vírus é de transmissão sexual e está presente em cerca de 95% dos casos de câncer de colo de útero. Com este estudo, pretendemos pesquisar a presença do HPV, assim com os tipos de HPV, antes e depois do tratamento para o câncer do colo do útero, para verificar se o vírus ainda continua na lesão após o tratamento quimioterápico e/ou radioterápico.

Para a realização do estudo será feito o exame preventivo de colo uterino (PCCU), onde serão coletadas células do colo do útero necessárias para a pesquisa. Para isso será introduzido o espéculo na vagina e com uma escovinha serão coletadas células superficiais do colo do útero, mediante raspagem. O Preventivo faz parte da rotina do atendimento no Setor de Ginecologia do Hospital, e queremos aproveitar o material dessas coletas para conferir se o vírus estava ou ainda está presente na sua amostra. Coletaremos amostras em dois momentos da sua doença, antes do tratamento para o câncer, e depois dele, uma vez que a Sra. finalize o tratamento e volte para fazer o controle no Hospital. Durante a coleta do preventivo é possível que aconteçam alguns desconfortos ou riscos como pequenos sangramentos durante ou após a coleta do preventivo e mal-estar durante o exame e todos os cuidados serão mantidos para minimizar o incômodo causado pela coleta que será realizada pelo médico ou por pessoal qualificado que acompanha seu tratamento.

O benefício que esperamos com o estudo é que este poderá, no futuro, contribuir com a melhora da qualidade do tratamento contra o câncer de colo do útero e a Sra. terá acesso ao resultado da pesquisa do HPV na sua amostra antes e após o fim do tratamento. Os exames de detecção do HPV serão realizados no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

A Sr^a pode se negar a participar deste estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo ao seu tratamento nem para a Sra. neste serviço. As informações serão analisadas em conjunto com as de outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente em nenhuma fase do estudo. A Sr^a. receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e não receberá pagamento pela sua participação, sendo esta voluntária. Também não terá despesa pela participação da pesquisa visto que todas as coletas do PCCU serão realizadas quando a Sr^a. voltar para fazer seu atendimento de rotina para o tratamento do câncer no Setor de Ginecologia do Hospital Ophir Loyola, assim como não deverá pagar pela realização dos exames de detecção do HPV realizados no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical-UFPA, já que o Projeto conta com financiamento do MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Caso a Sr^a. sofra algum dano decorrente dessa pesquisa, os pesquisadores garantem indenizá-lo por todo e qualquer gasto ou prejuízo.

Durante todo o período da pesquisa a S^{ra}. tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, sobre o projeto e sua participação contatando qualquer de preferência a Dra. responsável pelo projeto, FABIOLA ELIZABETH VILLANOVA ou qualquer um dos pesquisadores listados a seguir:

D^{ra}. FABIOLA ELIZABETH VILLANOVA, na Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92, Umarizal, térreo, laboratório de Imunopatologia – Belém/PA Fone: (091)3201-0954; email:fvillanova@ufpa.br

Médico Celso Hideo Fukuda- no Setor de Ginecologia do Hospital Ophir Loyola, Av. Magalhães Barata, 992 - São Brás, Belém - PA, CEP 66060-281; Fone: (91) 3265-6606; e-mail: celsofukuda@gmail.com

A S^{ra}. também pode tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação agora ou a qualquer momento através dos contatos abaixo:

Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92, Umarizal – Belém/PA Fone: (091)3201-0961;email: cepbel@ufpa.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola – Av. Magalhães Barata, 992 - São Brás, Belém - PA, CEP66060-281;Fone:(91) 3265-6606; e-mail: dep_ensino_hol@yahoo.com.br

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente para a sua participação nesse estudo:

Belém: ____/____/201__

D^{ra}. Fabiola Elizabeth Villanova

Dr. Celso Fukuda

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu discuti com a pesquisadora a minha participação nesta pesquisa e declaro que compreendi o que ela falou sobre o projeto, dos procedimentos aos quais serei submetida, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo cooperando com a coleta do preventivo antes e após meu tratamento para o câncer de colo do útero, ciente que posso retirar este consentimento a qualquer momento.

Belém: ____/____/201__

Participante

Testemunha

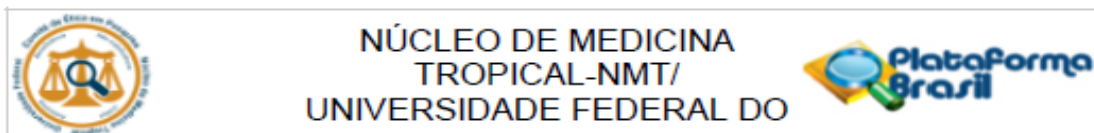
APÊNDICE B – FORMULARIO APLICADO ANTES DO TRATAMENTO

| | |
|---|---|
| <p>Tem prontuário? <input type="checkbox"/> SIM Nº envelope OL: <input type="checkbox"/> NÃO Se não tiver TEL: () _____ - _____ NOME: RG:</p> | <p>Iniciais da paciente: Identificação NMT: DATA DA COLETA: ____/____/____ ATENDIDA PELO DR:</p> |
| <p>Idade: Data Nascimento: ____/____/____ CIDADE que mora:</p> <p>1- Motivo da consulta: <input type="checkbox"/> Primeira consulta no Ophir <input type="checkbox"/> Retorno pré-tratamento <input type="checkbox"/> Controle pós- término de tratamento (ir para pag2 (APÓS- TRATAMENTO))</p> <p>2- Resultado da biópsia PCCU ANTES do tratam: <input type="checkbox"/> CA epidermóide invasor Estágio: <input type="checkbox"/> Adenocarcinoma Estágio: Lesão do colo: <input type="checkbox"/> Exofítica <input type="checkbox"/> endofítica <input type="checkbox"/> Normal / Inflamatório <input type="checkbox"/> NIC1 <input type="checkbox"/> NICII <input type="checkbox"/> NIC III/ CA <i>in situ</i> <input type="checkbox"/> Câncer de vulva <input type="checkbox"/> câncer de endométrio <input type="checkbox"/> ASCUS <input type="checkbox"/> ASGUS <input type="checkbox"/> NIVA (neoplasia intraepitelial vaginal)</p> <p>DATA DO PREVENTIVO: ____/____/____</p> <p>3 - Estado civil atual: <input type="checkbox"/> Solteira <input type="checkbox"/> Casada/Companheiro <input type="checkbox"/> Separada/Divorciada <input type="checkbox"/> Viúva</p> <p>4 - Escolaridade: <input type="checkbox"/> Analfabeta/fundamental incompleto <input type="checkbox"/> Fundamental completo <input type="checkbox"/> Médio incompleto <input type="checkbox"/> Médio completo <input type="checkbox"/> Superior</p> <p>5-Quantas vezes tinha feito o PCCU antes de descobrir o câncer? <input type="checkbox"/> Primeiro PCCU da vida <input type="checkbox"/> Realizava periodicamente; fazia a cada ____ anos <input type="checkbox"/> Não fazia faz ____ anos <input type="checkbox"/> Começou a realizar após descobrir problema.</p> <p>6- Teve ou tem alguma outra IST? Qual? _____</p> | <p>7-História reprodutiva Partos: Abortos: Gestações:</p> <p>8- Contraceptivos (camisinha, pílula, injeção). <input type="checkbox"/> Nunca usou nenhum tipo <input type="checkbox"/> Anticoncepcionais orais <input type="checkbox"/> Camisinha <input type="checkbox"/> Injeção Outros:</p> <p>9-Idade da primeira relação sexual: ____anos/ <input type="checkbox"/> Não lembra</p> <p>Número de parceiros sexuais na vida: _____ <input type="checkbox"/> Não lembra</p> <p>Número de parceiros sexuais no último ano: _____ <input type="checkbox"/> Não lembra</p> <p>Número de parceiros novos no último ano: _____ <input type="checkbox"/> Não lembra</p> <p>10-Frequência com que tem ou tinha relações: Nº de vezes por semana: _____ OU Nº vezes por ano: _____ <input type="checkbox"/> Nenhuma vez no último ano <input type="checkbox"/> Faz quantos anos não mantém relações? _____ anos</p> <p>11 – Fumante? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Já fumou? <input type="checkbox"/> Sim. Parou há quanto tempo? _____ ANOS <input type="checkbox"/> Fumou por quantos anos? _____ ANOS</p> <p>Convive com um fumante? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Faz quanto tempo e onde? _____anos <input type="checkbox"/> casa <input type="checkbox"/> emprego</p> <p>12-Consome bebidas alcoólicas mesmo que às vezes? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> |

APÊNDICE C– FORMULARIO APLICADO APÓS TRATAMENTO

| | |
|---|--|
| <p>Nº envelope OL: Nome: Iniciais da paciente:</p> | <p>Identificação NMT: DATA DA COLETA: ____/____/____</p> |
| <p>Faz quanto tempo terminou o tratamento? Primeiro controle após fim do tratamento? * SIM * NÃO Terminou faz: Meses: ____ Anos: ____</p> <p>1- Tratamento realizado: Radioterapia RT: SIM NÃO Finalizou em:</p> <p>Quimioterapia QT: SIM NÃO Finalizou em:</p> <p>Braquiterapia: SIM NÃO Finalizou em: FINALIZOU EM: ____/____/____</p> <p>2- Resultado do primeiro preventivo após tratamento: * Normal / Inflamatório * NIC I * NICII * NIC III/ CA <i>in situ</i> * CA epidermóide invasor * Adenocarcinoma * Câncer de vulva * Câncer de vagina * ASCUS * ASGUS * NIVA (neoplasia intraepitelial vaginal) DATA DO PREVENTIVO: ____/____/____</p> <p>3- Recidiva: Apareceu outro tumor após o término do tratamento? SIM NÃO Quanto tempo depois apareceu o tumor? Meses: _____ Anos: _____</p> <p>Onde apareceu o tumor ou câncer? *Vagina * Bexiga * colo do útero novamente * Linfonodos da região: _____ * Outro: _____</p> <p>4- Manteve relações após o término do tratamento? *SIM *Quantas vezes: ____ *NÃO * Regularmente</p> | <p>*Sangramento *Dor *Outros: ____</p> <p>5. Esse parceiro/s sexual/ais: É o parceiro sexual antigo? *SIM *NÃO É um parceiro sexual novo? *SIM *NÃO Atualmente tem mais de um parceiro sexual? *SIM *NÃO Se respondeu SIM, perguntar quantos: _____</p> |

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Persistência do papilomavírus Humano -HPV- após tratamento em casos de câncer de colo uterino.

Pesquisador: FABIOLA ELIZABETH VILLANOVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46042415.5.0000.5172

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.128.394

Data da Relatoria: 17/06/2015

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto bem desenhado com méritos científicos. Favor retornar via plataforma brasil o relatório final, quando da finalização desta.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELEM, 29 de Junho de 2015

Assinado por:
ANDERSON RAIOL RODRIGUES
(Coordenador)

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-0961

CEP: 66.055-240

E-mail: cepbel@ufpa.br