



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-
graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres tratadas no INCA

João Paulo Castello Branco Vidal

Orientador : Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira.

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres tratadas no INCA

João Paulo Castello Branco Vidal

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto Nacional
de Cancer como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Doutor em Oncologia

Orientador : Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira.

**RIO DE JANEIRO
2016**

V648e Vidal, João Paulo Castello Branco.

Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres tratadas no INCA / João Paulo Castello Branco. – Rio de Janeiro, 2016.

144 f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Miguel Angelo Martins Moreira.

1. Papiloma Vírus Humano. 2. Neoplasias Uterinas. 3. Genótipo. 4. Institutos de Câncer. 5. Brasil. I. Moreira, Miguel Angelo Martins (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99466



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres tratadas no INCA

João Paulo Castello Branco Vidal

Orientador : Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira.

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Alves Soares - Presidente

Prof. Dra. Alcina Frederica Nicol

Prof. Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

Prof. Dr. Renato Santana Aguiar

Prof. Dra. Luiz Claudio Santos Thuler (suplente I)

Prof. Dra. André Felipe (suplente II)

RIO DE JANEIRO

2016

Dedicatória

Dedico todo este trabalho em primeiro lugar as pacientes portadoras de câncer do colo do útero, por depositarem sua esperança na ciência e por permitirem a coleta de amostras, possibilitando a busca por melhores tratamentos e qualidade de vida para as futuras gerações.

Agradecimentos

Em especial a minha esposa e parceira de vida, Thais. Obrigado pelo seu amor, apoio e cuidado nos momentos mais difíceis e, principalmente, por compreender minha ausência nestes intermináveis 3 anos que vivemos e enfrentamos juntos a dura rotina da ponte aérea. Serei eternamente grato por estar ao meu lado em todos os momentos!

À minha irmã Dra. Flávia Vidal, meu maior exemplo e fonte de inspiração para a carreira científica.

A minha mãe e meu padrasto, fundamentais na construção de uma vida cheia de boas lições e garra perante as dificuldades

Ao meu orientador, Doutor Miguel Angelo Martins Moreira, por aceitar-me no laboratório, pela enorme paciência e disponibilidade absoluta. Agradeço não só pelo privilégio de trabalhar neste projeto sob sua orientação, mas também por entender as minhas limitações e minha eventual ausência por conta das minhas viagens a SP.

Aos pesquisadores da Divisão de Genética: Dr. Hector Seuanez, Dra Cibele Bonvicino, Dr. Marcelo Soares e Dra Esmeralda Soares

A queridíssima Shayane, pela incansável e fundamental dedicação para esse estudo. Muito obrigado pela amizade e parceria!

Ao nosso grupo de pesquisa, Marion, Barbara, Sergio, Ayslan, Renam, Diogo, por toda a troca de ideia e reuniões sempre produtivas!

Aos alunos e funcionários da Divisão de Genética (são muitos!), por todos os bons momentos de convivência, as frequentes e generosas doses de cafeína e pelas excelentes trocas de experiências, auxílio e suporte.

Aos amigos da boa e velha Minas Gerais! Em especial aos grandes amigos Carolina

Furtado e Michel Faria.

Aos pesquisadores da Divisão de Epidemiologia do INCA: Dra Liz de Almeida, Antônio Maria da Silva Negrão, Luís Felipe Leite Martins, Flavia Miranda, Evaneide Moraes e Neile Carvalho

A equipe de medicas do departamento de Ginecologia do HC2 Claudia Bessa, Patricia Patury, Vanessa Franco, Aurenice Carvalho e Lina Vieira pela dedicação despendida com o nosso projeto,

As enfermeiras responsáveis pela coleta dos dados epidemiológicos.

Aos professores e todos os membros da pós-graduação do INCa pelo grande comprometimento com o ensino.

E, por fim, ao Instituto Nacional do Cancer – INCa, como instituição de ensino e pesquisa. Em 2016 completam 10 anos desde que entrei pela primeira vez no CPQ. Foram tantas as pessoas que marcaram esses anos, compartilhando comigo seu saber e especialidade em campos variados de conhecimento, que seria praticamente impossível nomear uma a uma. Portanto, a quem, de alguma forma fez parte do meu caminho durante esta jornada, meus mais sinceros agradecimentos.

Muito, muito obrigado.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres tratadas no INCA

RESUMO

Tese de Doutorado

João Paulo Castello Branco Vidal

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos em relação aos mais desenvolvidos. Dentre outros cofatores, a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) tem sido bem documentada como fator necessário ao desenvolvimento deste tipo de câncer, sendo os tipos HPV16 e HPV18 responsáveis por aproximadamente 70-80% dos casos. A caracterização dos tipos virais mais frequentemente associados ao câncer cervical, permitiu o desenvolvimento de vacinas comerciais, atualmente disponibilizadas ou em fase de testes. Além disso, o interesse em variantes intratipo dos HPVs mais prevalentes está crescendo rapidamente, visto que evidências sugerem que essas variantes podem diferir biologicamente e etiologicamente no desenvolvimento e comportamento do tumor. Tendo em vista a relevância do câncer de colo de útero, a sua associação com diferentes tipos de HPVs, o desenvolvimento de vacinas, e o limitado número de estudos sobre a prevalência de diferentes tipos e subtipos desse câncer no Brasil, o presente projeto teve por objetivos: (1) Identificar a prevalência dos tipos de HPV identificados a partir de amostras de câncer cervical invasivo de 594 mulheres matriculadas no hospital do câncer II do Instituto Nacional do Câncer. (2) Levantar as características socioeconômicas desta coorte de pacientes. (3) Identificar a prevalência das variantes intratipo do HPV 16 e HPV 18. A detecção e genotipagem do HPV foram realizadas a partir da PCR e sequenciamento direto utilizando os iniciadores PGMY/GP, sendo identificados 370 amostras HPV 16; 77 amostras HPV 18; 33 amostras HPV 45; 12 amostras HPV 35; 11 amostras HPV 58; 8 amostras HPV 73 e HPV52, respectivamente; 7 amostras HPV31 e HPV33, respectivamente; 6 amostras HPV 59 e HPV 39, respectivamente; duas amostras HPV 26, HPV 51, HPV 56 e HPV 68, respectivamente e, por fim, 1 amostra HPV 83. Em 20 amostras, foram observadas múltiplas infecções, em 16 amostras não foi possível a identificação do tipo de HPV presente e em 4 amostras não foi identificado o DNA viral pelo método empregado. Para a identificação das variantes do HPV 16 e HPV18, as amostras foram submetidas a amplificação por PCR e sequenciamento com primers tipo específico das regiões LCR e E6, seguida a identificação dos haplótipos compartilhados, análise filogenética e identificação de polimorfismos específicos (SNVs) para cada variante. Para o HPV16, em 334 amostras obtivemos sequências integras, onde foram identificados 125 haplótipos. Destes, 216 amostras foram classificadas como pertencentes a linhagem A, 10 amostras para a linhagem B, 10 amostras para linhagem C e 97 amostras para a linhagem D. Para o HPV18, 71 foram amostras analisadas e 33 haplótipos identificados. Destes, 55 amostras foram classificadas como pertencentes à linhagem A e 16 amostras à linhagem B. Nenhuma amostra foi classificada como pertencente a linhagem C. Em conjunto, nossos achados corroboram com a prevalência dos fatores de risco descritos para o HPV, demonstram uma alta diversidade dos tipos de HPV quando comparado a outros estudos desenvolvidos no Brasil, e por fim, apontam uma maior frequência de variantes, tanto para HPV 16 quanto HPV 18, das linhagens mais prevalentes em populações Européias e Norte Americanas. A diversidade genética de HPV 16 indicou uma recente expansão de variantes específicas ou uma vantagem seletivas associada ao desenvolvimento de câncer cervical. Para o HPV 18, este padrão não foi observado.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Studies of HPV genotypes present in cervical tumors in women treated in INCA

João Paulo Castello Branco Vidal

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common cancer among women worldwide. The incidence is approximately two times higher in less developed countries than in the more developed. Among other cofactors, infection with human papillomavirus (HPV) has been well documented as a necessary factor for the development of this cancer, and the HPV16 and HPV18 types account for approximately 70-80% of cases. The characterization of the virus types most commonly associated with cervical cancer has enabled the development of commercial vaccines currently available or being tested. Moreover, the interest in variants of the most prevalent HPV is rapidly growing, since evidence suggests that these variants may differ biologically and epidemiologically in the development and tumor behavior. Considering the importance of cervical cancer, its association with different types of HPV, vaccine development, and the limited number of studies on the prevalence of different types and subtypes of cervical cancer in Brazil, this study aimed to: (1) identify the prevalence of HPV types identified from invasive cervical cancer samples from 594 women enrolled in the cancer hospital II of the National Cancer Institute. (2) Collect socioeconomic data of this cohort of patients. (3) Identify the prevalence of variants of HPV 16 and HPV 18. The detection and genotyping of HPV have been performed by PCR and direct sequencing using the PGMV / GP primers. We identified 370 samples positive for HPV 16; 77 for HPV 18; 33 for HPV 45; 12 for HPV 35; 11 for HPV 58; 8 for HPV 73 and HPV52, respectively; 7 for HPV31 and HPV33, respectively; 6 for HPV 59 and HPV 39 respectively; Two for HPV 26, HPV 51, HPV 56 and HPV 68 respectively and, finally, 1 for HPV 83. Multiple infections were observed in 20 samples; it was not possible to identify the type of HPV present in 16 samples and it was not possible to detect viral DNA by the method employed in 4 samples. For the identification of variants of the HPV 16 and HPV 18, samples were subjected to PCR amplification and sequencing with type specific primers for LCR and E6 region, followed by the identification of shared haplotypes, phylogenetic analysis and identification of specific polymorphisms (SNVs) for each variant. For HPV16, we obtained 334 satisfactory sequences being identified 125 haplotypes. Of these, 216 samples were classified as belonging to the lineage A, 10 samples belonging to the lineage B, 10 samples to line C and 97 samples for the lineage D. For HPV18, we obtained 71 satisfactory sequences being identified 33 haplotypes. Of these, 55 samples were classified as belonging to the lineage A and 16 samples to lineage B. No sample was classified as belonging to lineage C. Together, our findings corroborate the prevalence of the risk factors described for HPV, demonstrate a high diversity of HPV types when compared to other studies conducted in Brazil, and finally, show a higher frequency of variants A for both HPV 16 as HPV 18, the most prevalent in European and North American populations. The genetic diversity of HPV 16 indicated a recent expansion of specific variants or selective advantage associated with the development of cervical cancer. For HPV 18, this pattern was not observed.

Índice

Lista de Tabelas	12
Lista de Quadros	13
Lista de Figuras	14
1. Introdução	17
1.1. Epidemiologia do Câncer Cervical no Brasil e no Mundo	17
1.2. Histórico HPV e Câncer Cervical	19
1.3. O HPV e o câncer do colo de útero	20
1.4. Estrutura do virion e genoma do HPV	20
1.5. As proteínas virais	22
1.6. Taxonomia Viral	24
1.7. Associação dos tipos virais com lesões e câncer cervical	25
1.8. Tipos histológicos de tumores do colo uterino	28
1.9. Estadiamento tumoral de acordo com a classificação FIGO	30
1.10. Mecanismo da infecção	30
1.11. A transformação celular	32
1.12. Varição Intratipo dos HPV	35
1.13. Variantes de HPV 16	36
1.14. Variantes de HPV 18	39
1.15. HPV e outros câncer	41
1.16. Histórico de estudos de HPV em câncer cervical no Brasil	41
1.17. Vacinas	43
2. Justificativa	47
3. Objetivo geral	49
3.1. Objetivos Específicos	49
4. Metodologia	50
4.1. População de estudo	50
4.2. Coleta de dados epidemiológicos	50
4.3. Coleta, transporte e armazenamento das amostras	50
4.4. Extração do DNA	51
4.5. Quantificação de DNA	52
4.6. Deteção do DNA do HPV por PCR	52
4.7. Sequenciamento direto para a identificação do tipo de HPV	54
4.8. Identificação de coinfeções por mais de um tipo de HPV	54
4.9. Identificação das variantes de HPV 16 e HPV 18	55
4.10. Edição e montagem das sequências e contigs	56
4.11. Identificação de Haplótipos, Linhagens e Análise Filogenética das sequências de HPV 16 e HPV 18	57
4.12. Análises Estatísticas	58
5. Resultados	59
5.1. Caracterização da população do estudo	59
5.2. Identificação dos tipos de HPV	62
5.3. Coinfeções por diferentes tipos de HPV	63
5.4. Tipos histológicos dos tumores x Tipo de HPV	64
5.5. Variantes de HPV 16	66
5.5.1. Identificação dos Haplótipos compartilhados	67
5.5.2. Análise de SNVs específicos para as linhagens de HPV16	68
5.5.3. Análise filogenética e rede de haplótipos	70

5.6. As linhagens de HPV 18	77
5.6.1. Identificação de haplótipos compartilhados	77
5.6.2. Análise de SNVs específicos para os subtipos de HPV 18	78
5.6.3. Análise filogenética e rede de haplótipos	80
6. Discussão	85
7. Conclusões	99
8. Referencias	100
9. Apendices	113
9.1. Artigo publicado, como primeiro autor, em periódico indexado com índice de impacto Qualis B1 da área Medicina I da CAPES	113
9.2. Tabela com os tipos histológicos dos tumores incluídos no estudo, com a classificação definida como “outros”	123
10. Anexos	124
10.1. Artigo publicado em periódico indexado com índice de impacto Qualis B2 da área Medicina I da CAPES	124
10.2. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	131
10.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	132
10.4. Ficha Clínica	135

Lista de Tabelas

Tabela 1.16.1- Estudos realizados no Brasil relacionados a identificação dos tipos de HPV presentes em amostra de tumores cervicais.....	43
Tabela 5.1.1- Dados sociodemográficos e história reprodutiva da população do estudo.....	60
Tabela 5.1.1- Dados sociodemográficos e história reprodutiva da população do estudo (cont.).....	61
Tabela 5.3.1 – Amostras com coinfeção detectada com o Kit PappilomaStrip High + Low.	63
Tabela 5.4.2 – Distribuição dos tipos histológicos entre os tipos HPV 16 e HPV 18 e entre as espécies $\alpha 7$ e $\alpha 9$	65
Tabela 5.4.3 – Relação entre os 5 tipos de HPV mais frequentes e a idade média das pacientes.	66
Tabela 5.5.1 - Os 125 haplótipos identificados de HPV16.....	68
Tabela 5.5.3.1 - Índice de diversidade molecular para o HPV16.....	75
Tabela 5.5.3.2 – Substituições de aminoácidos encontradas na proteína E6 em HPV16.....	76
Tabela 5.6.1.1 – Os 33 haplótipos identificados de HPV 18.....	77
Tabela 5.6.3.1 - Índice de diversidade molecular para o HPV18.....	81
Tabela 5.6.3.1 – Substituições de aminoácidos encontradas na proteína E6 nas amostras HPV18.....	82
Tabela 5.7.1 - Variantes de HPV16 e HPV18 X Dados Clínicos e epidemiológicos.....	84

Lista de Quadros

Quadro 1.1.1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia cervical por 100 mil mulheres nas diferentes regiões do Brasil..	19
Quadro 1.7.1- Os tipos de HPV, classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino.....	26
Quadro 4.6.1 - Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de detecção do DNA de HPV	53
Quadro 4.9.1 - Oligonucleotídeos utilizados na identificação dos subtipos de HPV 16 e HPV 18.....	56
Quadro 5.5.2. - Padrão dos SNVs para identificação das variantes de HPV 16 para LCR e E6.....	70
Quadro 5.6.2.1 - Padrão dos SNVs para identificação das variantes de HPV 18 para LCR e E6.....	79
Quadro 6 .1 – Estudos conduzidos no Brasil	89

Lista de Figuras

Figura 1.1.1 - Tipos mais incidentes de câncer na população feminina brasileira....	18
Figura 1.4.1- Micrografia eletrônica de partículas de papiloma vírus	21
Figura 1.4.2- Representação esquemática do genoma do HPV.....	22
Figura 1.6.1- Árvore filogenética contendo a sequência de 170 tipos de papilomavírus, baseados na análise da sequência de <i>L1</i>	24
Figura 1.7.1- Frequências mundiais de HPV encontrados diferentes estágios de evolução da lesão cervical.....	27
Figura 1.8.1- Representação esquemática do colo do útero humano.....	28
Figura 1.10.1- Progressão de lesões induzidas por HPV a câncer cervical.....	32
Figura 1.11.1- Associação de E7 de HPV a proteína do retinoblastoma.....	34
Figura 1.11.2- Degradação de p53 mediada por E6 de HPV.....	35
Figura 1.13.1 – Arvore filogenética construída a partir dos genomas completos representativos de cada linhagem/sublinhagens de HPV16.....	37
Figura 1.14.1 – Árvore filogenética construída a partir dos genomas completos representativos de cada linhagem e/ou sublinhagens de HPV18.....	41
Figura 1.15.1 - Associação entre o HPV e diferentes tipos de câncer.....	42
Figura 5.2.1 - - Prevalência dos diferentes tipos de HPV encontrados nas 594 amostras.....	62
Figura 5.4.1 - Os tipos de tumores biopsiados, de acordo com a revisão histopatológica.....	64
Figura 5.4.2 - Distribuição do número de pacientes de acordo com faixa etária.....	66
Figura 5.5.1 - Coinfecção de variantes de HPV16.	67
Figura 5.5.3.1 - Análise filogenética do HPV16.	74
Figura 5.5.3.2- Análise em rede dos 125 haplótipos de HPV16.	75
Figura 5.6.3.1- Análise filogenética do HPV18.	81
Figura 5.6.3.1 - Análise em rede dos 33 haplótipos de HPV18.....	82

Lista de siglas e abreviaturas

AGC	Células glandulares atípicas(<i>atypical glandular cells</i>)
ASC	Células escamosas atípicas (<i>atypical squamous cells</i>)
ASC-H	Células atípicas que não permitem excluir lesões de alto grau (<i>cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
ASC-US	Células atípicas de significado indeterminado (<i>atypical squamous cells of undetermined significance</i>)
CCI	Câncer cervical invasivo
CCU	Câncer do colo uterino
CDK	Quinase dependente de ciclina (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
DST	Doença sexualmente transmissível
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato (<i>Deoxyribonucleoside Triphosphates</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (<i>The International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>)
HC2	Captura Híbrida 2 (<i>Hybrid Capture 2</i>)
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HPV-HR	Papilomavírus humano de alto risco
HPV-LR	Papilomavírus humano de baixo risco
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (<i>high-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
HSPGs	Proteoglicanos de Heparan Sulfato (<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>)
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamo-colunar
LCR	Região controladora longa (<i>long control region</i>)
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (<i>low-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	Quadro aberto de leitura (Open reading frame)
p53	Proteína de 53kD
pb	Pares de Bases
PCR	Reação da Polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction)
pRb	Proteína do Retinoblastoma

SNV	Single Nucleotide Variation
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Sistema Bethesda (<i>The Bethesda System</i>)
URR	Região controladora <i>upstream</i> (<i>upstream regulatory region</i>)
VLP	Partícula semelhante a vírus (<i>Virus-like particle</i>)
WHO	Organização mundial da Saúde (World Health Organization)

1. Introdução

1.1. Epidemiologia do Câncer Cervical no Brasil e no Mundo

O câncer do colo do útero (CCU) é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo com aproximadamente 530 mil casos novos por ano, sendo responsável pelo óbito de 265 mil mulheres por ano (Globocan, 2012). Estudos demonstram que mais de 80% dos coeficientes mundiais de incidência e 86% de mortalidade ocorrem nos países em desenvolvimento (Ferlay et al., 2010), o que sugere que este tipo de câncer possui um comportamento epidemiológico intimamente relacionado ao Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). As regiões com os maiores índices incluem a África Oriental e Ocidental, (> 30 por 100.000), África do Sul (26,8 por 100.000), Centro-Sul da Ásia (24,6 por 100.000), África Central e América do Sul (23,9 e 23,0 por 100.000 respectivamente). Os índices são menores na Ásia Ocidental, América do Norte e Austrália / Nova Zelândia (< 6 por 100.000). Comparativamente os países do continente europeu, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas observadas, enquanto que países da América Latina e, principalmente, de regiões mais pobres da África, apresentam índices extremamente elevados. Como exemplo, enquanto na Finlândia as taxas de incidência e de mortalidade por câncer do colo do útero foram 3,7 e 0,9 por 100 mil mulheres, respectivamente, na Tanzânia atingiram valores de 50,9 e 37,5 (dados de 2007, WHO, 2008b).

Já na população brasileira, o câncer de colo de útero é o terceiro mais incidente entre as mulheres (excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), e para o ano de 2016 a estimativa de novos casos é de 16.340, com um risco estimado de 16,34 casos a cada 100 mil mulheres. Estas taxas são somente superadas pela incidência do câncer de mama, com estimativa de 57.960 mil novos casos, com uma incidência de 57,09 casos novos para cada 100 mil mulheres e o câncer de cólon e reto, com 17,62 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA, Estimativa 2016) (Figura 1.1.1). No Brasil o câncer do colo do útero apresenta, em relação às taxas de incidência, valores relativamente equiparados a índices de outros países em desenvolvimento. Contudo, quando comparados aos países desenvolvidos, com programas de detecção precoce e políticas de prevenção melhor estruturadas, estas taxas apresentam valores bastante superiores.

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	205.960	
Todas as Neoplasias	300.870	

Figura 1.1.1 - Tipos mais incidentes de câncer na população feminina brasileira, segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2016. Excluiu-se a incidência do câncer de pele não melanoma.

(Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil, INCA 2015).

Quanto a incidência entre os estados e regiões brasileiras, os números de casos de câncer do colo de útero apresentam grande variabilidade. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo uterino é o mais incidente na Região Norte (24/100.000) e o segundo mais freqüente nas regiões Nordeste (19/100.000) e Centro-Oeste (21/100.000). Na região Sudeste (11/100.000) as estimativas apontam a terceira posição, enquanto a região Sul a quarta posição (15 /100.000) (Quadro 1.1.1). Esta grande variação na incidência de câncer cervical observada entre as regiões brasileiras ou até dentro do próprio estado pode ser explicada pela grande extensão territorial do país e pelas desigualdades sócias entre as diferentes áreas. Diversos estudos, no decorrer dos anos, apontaram o câncer cervical como uma doença multifatorial associado a infecções virais, fatores comportamentais, demográficos e socioeconômicos. Diante desse panorama torna-se evidente a necessidade de programas e estudos destinados ao controle do câncer em diferentes níveis de atuação, como na promoção da saúde, na prevenção da doença, na detecção de lesões precursoras

ou de tumores em estágios iniciais, na assistência aos pacientes e na pesquisa básica

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Mama feminina (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama feminina (38,74)	Mama feminina (55,87)	Mama feminina (68,08)	Mama feminina (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama feminina (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,56)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

Quadro 1.1.1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia cervical por 100 mil mulheres nas diferentes regiões do Brasil. Figura retirada da publicação biennial das estimativas do INCA para 2016.(Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil, INCA 2015)

1.2. Histórico HPV e Câncer Cervical

Em 1888 Eugene Garfield, no seu artigo *All sorts of warts - Separating fact from fiction* (Garfield et al., 1988) descreveu o histórico sobre os primeiros trabalhos acerca do papel infeccioso no processo de formação de verrugas (Payne, 1891; Licht C deF, 1894; Variot G, 1894 apud Garfield,1988), a posterior suspeita de que um vírus fosse o agente causador (G. Ciuffo, 1907 apud Garfield,1988), o caráter transmissivo do papiloma vírus em experimento realizados em coelhos (Shope R, 1933 apud Garfield,1988) e finalmente, o potencial de transformação maligna das lesões em coelhos (Rous e Beard, 1935 apud Garfield,1988; zur Hausen, 2008). Com a evolução da microscopia eletrônica a partir da década de 1930 e do cultivo de células na década de 1940, a virologia passou por grandes avanços. Em 1949, Maurice Strauss e outros pesquisadores da Escola de Medicina da Universidade de Yale, New Haven, Connecticut, usando um microscópio eletrônico, observaram partículas em amostras retiradas de papilomas da pele. Um ano mais tarde, Strauss e colaboradores identificaram o papilomavírus humano como o agente etiológico das verrugas (apud Garfield, 1988).

Apesar do conhecimento de que outros membros do grupo dos papilomavírus eram carcinogênicos em coelhos e também capazes de transformar alguns tipos de células de roedores (zur Hausen & De Villiers, 1994), não havia sido estabelecida até a década de 1970, uma correlação entre o HPV e o carcinoma cervical humano. Mas, em meados da década de 70, alguns trabalhos, caracterizaram a presença de segmentos de DNA viral em carcinomas de colo uterino, sendo estabelecida a relação causal entre o carcinoma cervical e o HPV (zur Hausen et al., 1976; Orth et al., 1981; Gissmann et al., 1976;). Na década de 80 o isolamento de diversos tipos de HPV em várias lesões de pele e de mucosa (verrugas, displasias epiteliais, e carcinoma da cérvix uterina e de pênis) abriu caminho para estudos detalhando o papel desse vírus nos cânceres genitais (zur Hausen , 2009).

1.3. O HPV e o câncer do colo de útero

Para o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas intraepiteliais e do câncer cervical invasivo, sabe-se hoje que a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) é condição necessária. Entretanto, foi demonstrado que, por si só, o HPV não é causa suficiente, sendo necessária a associação a outros co-fatores para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intraepiteliais (Bosch et al., 1995; Ferenczy et al., 2003; Rosa et al., 2009)

Dentre os principais co-fatores, destacam-se aqueles envolvendo o comportamento sexual e os hábitos de vida, como tabagismo, uso prolongado de contraceptivos orais, início precoce da atividade sexual, multiplicidade de parceiros sexuais, multiparidade e histórico de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) incluindo infecção por *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex tipo 2 e HIV. Além desses, outros fatores como imunossupressão e fatores genéticos estão também supostamente envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical (Shiffman et al., 2003; Daling Jr et al., 1996; Lima Ca et al., 2006; Guven S et al., 2007).

1.4. Estrutura do virion e genoma do HPV

O papilomavírus (figura 1.4.1) é um grupo diverso de vírus, encontrados em diversas espécies de mamíferos, bem como aves e répteis. O papilomavírus humano (HPV) são vírus não envelopados, de formato icosaedro e medem aproximadamente 55nm (Fauquet et al., 2005)

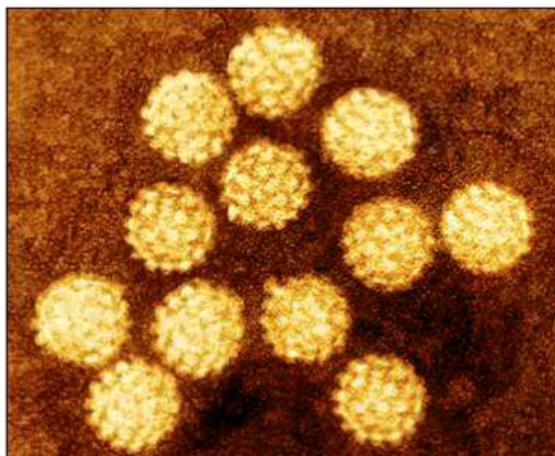


Figura 1.4.1- Micrografia eletrônica de partículas de papiloma vírus.
Fonte: Stannard(1995)

O genoma do HPV é constituído de um DNA dupla fita circular, contendo cerca de 7.900 pares de base (Figura 1.4.2). Possui 8 fases abertas de leitura (ORF, do inglês Open Reading Frames) e uma região não codificadora chamada LCR (do inglês Long Control Region) ou URR (do inglês "Upstream Regulation Region"), que contem elementos de regulação da replicação viral e expressão gênica (zur Hausen et al., 1994; Bernard et al., 2006).

A estrutura do genoma viral pode ser dividida em 3 partes: A região contendo os genes de expressão precoce (E, do inglês "early"), a região contendo os genes de expressão tardia (L, do inglês "late") e a região reguladora LCR. A região E contem 6 genes (E1, E2, E4, E5, E6, E7) e a região L dois genes (L1 e L2) (Doorbar J et al. 2006).

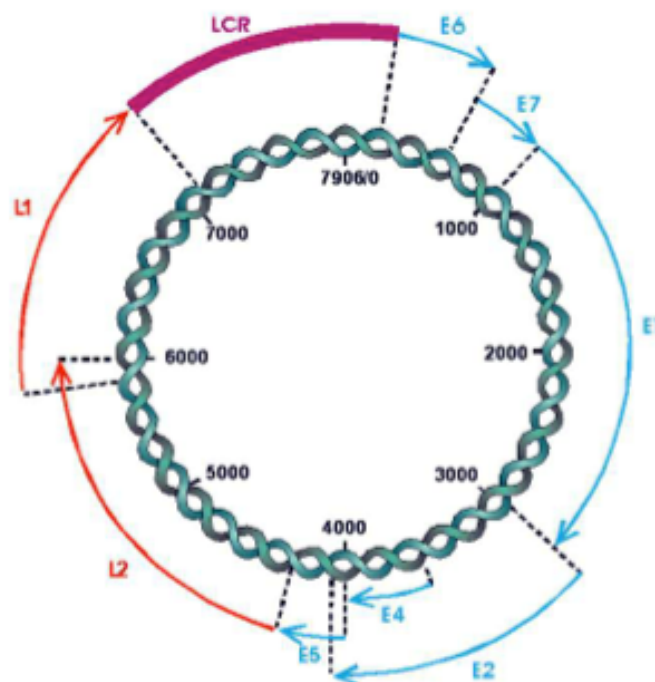


Figura 1.4.2- Representação esquemática do genoma do HPV. Observam-se na figura, em azul, a região precoce, responsável pela síntese das proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7, em vermelho, a região tardia, que codifica as proteínas estruturais L1 e L2, e, em lilás, a região LCR. As setas, ao final de cada gene, indicam a direção única em que ocorre a transcrição dos genes do HPV. Na parte interna da figura estão indicadas as posições nucleotídicas no genoma viral a cada 1000pb. Fonte: Modificado de Burk et al. (1999).

1.5. As proteínas virais

As proteínas codificadas por genes de expressão tardia (L) são proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral. A proteína L1 compõe a maior parte do capsídeo viral, possuindo a capacidade de organizar-se em uma estrutura altamente imunogênica (Kirnbauer et al., 1992), fato que levou inclusive ao desenvolvimento das vacinas atualmente disponíveis. Outra função importante da proteína L1 é a capacidade de, durante o ciclo de vida viral, submeter-se a uma série de mudanças estruturais que permitem, por exemplo, o encapsulamento do DNA de 7.900 pares de base e a maturação para um estado mais estável a fim de sobreviver à transmissão entre dois hospedeiros (Bachmann et al., 1993; Burk et al., 2013). Já a proteína L2, apesar de representar uma pequena porção do capsídeo viral, possui um importante papel no processo de encapsulamento do vírus promovido por L1 para a formação de um novo virion, como também no processo infeccioso (Day et al., 1998; Florin et al., 2002; Wang et al., 2011).

As proteínas codificadas por genes de expressão precoce (E) possuem papéis distintos no ciclo de vida viral, relacionados a regulação do ciclo, controlando

a replicação do DNA viral, transcrição do RNA viral e do ciclo celular da célula do hospedeiro. A proteína E1 é essencial durante todo o ciclo replicativo viral, pois promove a replicação e amplificação do DNA episomal do vírus no núcleo das células infectadas, permitindo que o vírus utilize os mecanismos da célula hospedeira para replicar o seu genoma (Bergvall et al. 2013). A proteína E2 é o principal regulador transcricional dos papilomavírus (Macbride et al., 2013), sendo expresso em estágios iniciais e intermediários do ciclo de vida viral. Essa proteína está envolvida em muitos processos através da regulação direta dos oncogenes virais E6 e E7 (Bernard et al., 1989; Nishimura et al., 2000; Thierry & Yaniv, 1987). A proteína E4 tem a sua ORF (quadro aberto de leitura) sobrepondo-se ao gene E2, variando consideravelmente em tamanho entre os tipos de papilomavírus (Doorbar et al., 1996; 2013). Sua função ainda não foi claramente elucidada, porém alguns estudos sugerem que E4 se acumula na célula no momento da amplificação viral, contribuindo para o sucesso da amplificação genômica viral, além de funções adicionais na liberação e/ou de transmissão do vírus (Doorbar J 2013). A proteína E5 é capaz de estimular a proliferação celular formando complexos com o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor de fator de crescimento- β derivado de plaquetas (PDGF β R) e o receptor de fator de estimulação de colônia (CSF1R) (Dimaio et al., 2013). Mais recentemente, também foi descrita a capacidade de E5 em prevenir a apoptose através da via de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K/Akt) e da proteína quinase ativada por mitógenos ERK1/2 (ERK1/2 MAPK), componentes de vias de sinalização de sobrevivência em resposta ao stress (Zhang et al., 2002). As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela transformação maligna da célula do hospedeiro, através da interação com um vasto repertório de proteínas, promovendo o bloqueio da apoptose, proliferação celular e levando a instabilidade cromossômica. A proteína E6, com participação da proteína associada a E6 (E6-AP) promove degradação de P53, um sistema de reparo que estimula a expressão de genes envolvidos na apoptose e na parada do ciclo celular (Werness et al. 1990; Vandepol et al. 2013). Além deste papel, E6 é capaz de degradar a proteína pro-apoptótica BAK (Jackson et al., 2000) e ativar a enzima telomerase (Veldman et al., 2001). A proteína E7 interage com a proteína retinoblastoma (PRb) liberando o fator de transcrição E2F, que ativa genes envolvidos com a síntese de DNA e progressão do ciclo celular (Dyson et al., 1992). E7 também pode promover a proliferação celular através da interação com fatores de transcrição AP-1 (Nead et al., 1998) e expressão de ciclina A e ciclina E (Zerfass

et al., 1995; Roman et al., 2013). O papel das oncoproteínas E6 e E7 na carcinogênese cervical será detalhado posteriormente.

1.6. Taxonomia Viral

Os papilomavírus humanos são classificados em cinco gêneros (figura 1.6.1): alfa- papilomavírus, beta- papilomavírus, gama- papilomavírus, mu- papilomavírus e nu- papilomavírus (Bernard et al., 2006). Os HPV do gênero alfa- papilomavírus estão associados às lesões em mucosas, incluindo a região anogenital, e os demais infectam principalmente regiões cutâneas. (de Villiers et al., 2013).

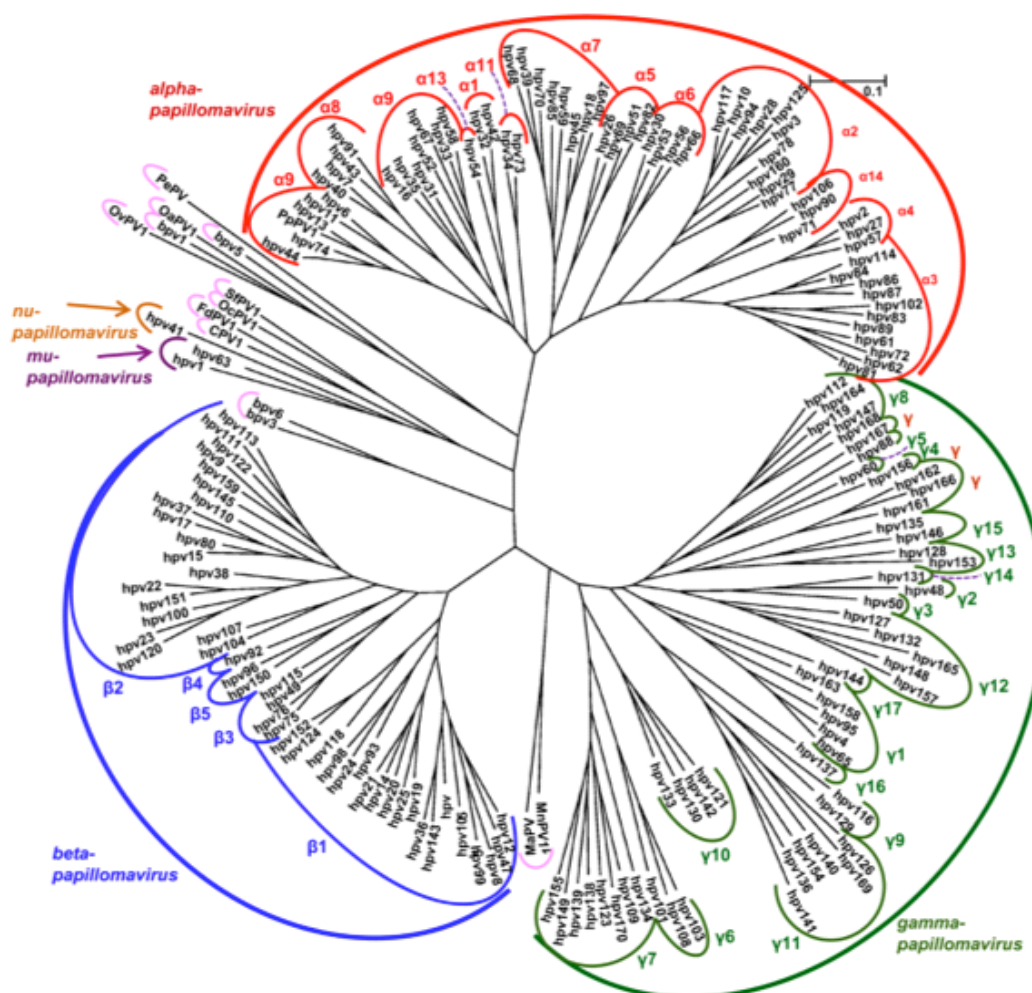


Figura 1.6.1- Árvore filogenética contendo a sequência de 170 tipos de papilomavírus, baseados na análise da sequência de *L1*. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies. (Fonte: E.-M. de Villiers et al. 2013).

A classificação dos HPVs baseia-se na diversidade genômica da sequência completa do gene *L1*, que é a região genômica mais conservada entre os

diferentes tipos virais. A família Papillomaviridae abrange 16 gêneros que, entre si, apresentam uma diferença maior que 40% na sequência de nucleotídeos em *L1*, enquanto as espécies apresentam diferença entre 30% e 40%. Além da classificação em família, gênero e espécie, os papilomavírus são classificados em tipos, subtipos e variantes. Um tipo de HPV difere de outro quando apresenta ao menos 10% de divergência na sequência do gene *L1*. As variantes de tipos de HPV diferem em menos de 2% na sequência de nucleotídeos de *L1*, e em até 5% na LCR (Ho et al., 1993; de Villiers et al., 2004). Até o momento, mais de 200 tipos de HPV foram identificados, sendo nomeados pela sigla HPV seguida de um número que é dado, à medida que são caracterizados (International Human Papillomavirus Reference Center: <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>). Os tipos de HPV podem ser divididos ainda em cutâneos e mucosotrópicos, dependendo do tropismo pelo tecido infectado. Os tipos cutâneos são aqueles que infectam a pele e os mucosotrópicos são os que infectam as mucosas urogenitais, anais e oro-respiratórias. Estes últimos podem também ser divididos em baixo ou alto risco oncogênico, de acordo com o potencial de risco a progressão ao câncer (Munoz et al., 2003). Os HPV de alto risco oncogênico estão mais frequentemente associados ao risco de desenvolvimento de câncer cervical, sendo considerados os principais causadores de neoplasias cervicais em todo o mundo. Infecções em mucosas pelos tipos oncogênicos de HPV representam entre 50% a 75% de todas as infecções por estes vírus (Muñoz et al., 2003, Clifford et al., 2005). Os tipos de HPV considerados de alto risco pertencem ao gênero Alphapapillomavirus e os tipos de alto risco mais prevalentes em cânceres cervicais, HPV 16 e HPV 18, pertencem a duas espécies distintas: espécie 9 (HPV 16) e espécie 7 (HPV 18) (de Villiers et al., 2004; Fauquet et al., 2005).

1.7. Associação dos tipos virais com lesões e câncer cervical

Como dito anteriormente, do ponto de vista epidemiológico, os tipos de HPV são classificados de acordo com o potencial carcinogênico e podem ser detectados em lesões-malignas e benignas (quadro 1.7.1). Os HPVs considerados de alto risco são comumente encontrados em lesões de alto grau e carcinomas invasivos. Há também os de baixo risco, mais frequentemente associados a condilomas e outras lesões benignas. Além destes, existem também os tipos que são classificados como de risco indeterminado, pois ainda não existem dados suficientes para uma

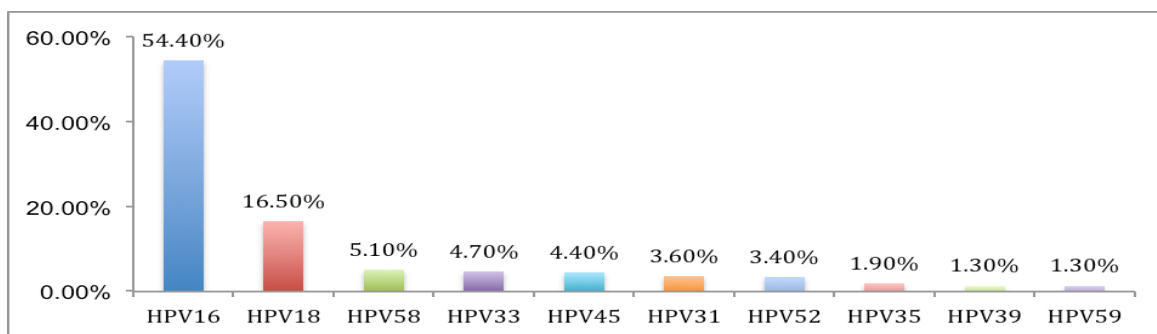
classificação definitiva. Apesar desta classificação estar bem definida, ela não é absoluta. Em alguns estudos foram observadas a associação entre o câncer cervical e presença de DNA de HPVs de baixo risco, como HPV 6, 11 (Bosch et al., 2008; Matsukura et al., 2008; Guimera et al., 2013)

Risco relativo ao Cancer	Tipos	Observações
Tipos de baixo risco (LR)	HPVs tipos 6, 11, 40, 42, 43 e 44	Verrugas genitais (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino
Tipos de alto risco (HR)	HPVs tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68	Lesões de alto grau e carcinoma invasor
Tipos de risco indeterminado	26, 34, 53, 54, 55, 61, 62, 66, 73, 82, 83	Tipos raros, com potencial oncogênico indeterminado

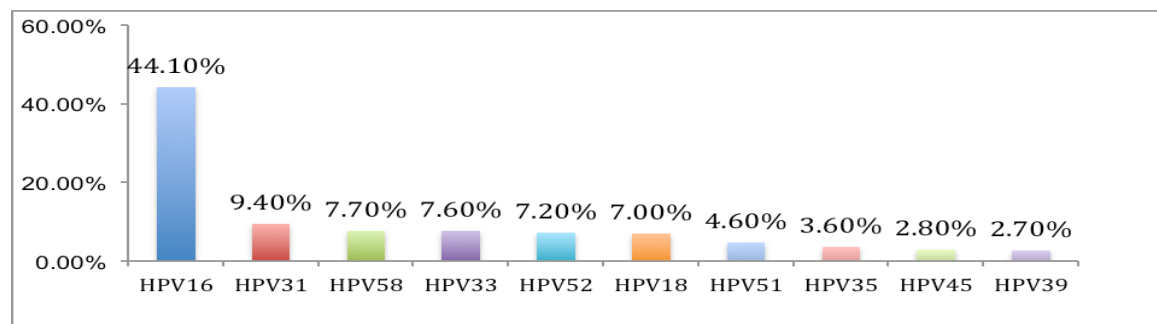
Quadro 1.7.1- Os tipos de HPV, classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino (Gravitt et al., 1998; Gravitt et al., 2000; Peyton et al., 2001; Munoz et al., 2003)

A infecção pelo HPV pode estar presente no epitélio normal, em lesões pré-cancerosas em diferentes estágios (NIC 1, NIC 2 e NIC 3) e no câncer invasivo (figura 1.7.1). Considerando dados do mundo em conjunto, o HPV 16 e o HPV 18 estão associados a 70% dos casos de câncer do colo do útero, entre 41% -67 % das lesões cervicais de alto grau (NIC 3) e 16-32 % das lesões cervicais de baixo grau (NIC 1 e NIC 2). Excluindo os HPV 16/18, os tipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58 são os mais comuns, porém observados com grandes variações nas frequências (Ferlay et al., 2011). Por exemplo, entre os países desenvolvidos, os tipos de HPV 58, HPV 33 e HPV 45 figuram em 3º, 4º e 5º mais prevalentes respectivamente, em casos de câncer. Já entre os países subdesenvolvidos, os tipos HPV 33, HPV 31 e HPV 45 ocupam estas respectivas posições. Os demais tipos são mais raros, sendo detectados em menos de 1% dos casos (WHO/ICO – Centro de Informação de HPV e Câncer Cervical, 2010; Clifford et al., 2005).

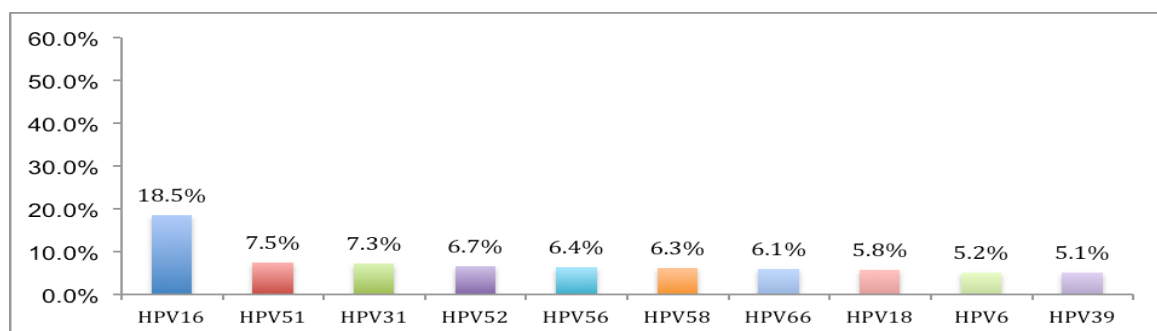
A)



B)



C)



D)

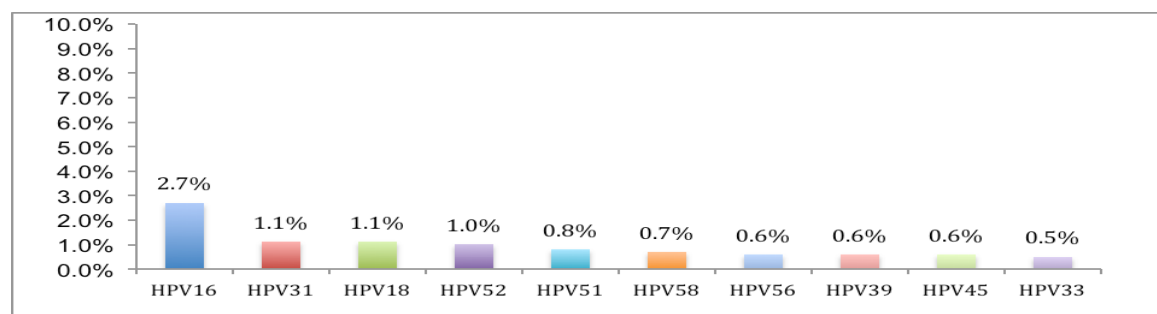


Figura 1.7.1- Frequências mundiais de HPV encontrados diferentes estágios de evolução da lesão cervical. A) Câncer Invasivo; B) Lesão de alto grau; C) Lesões de baixo grau; D) Citologia normal
Fonte: Adaptado de IARC, 2004; Li et al., 2011

1.8. Tipos histológicos de tumores do colo uterino

O colo uterino é definido como a região anatômica do útero que se estende do óstio interno até a sua porção final no óstio externo no interior da vagina. Seu tamanho em relação ao corpo uterino total varia de acordo com a idade, paridade e fatores hormonais da mulher (Bartoli et al., 1991). O colo uterino (figura 1.8.1) pode ser dividido em ectocervix, porção encontrada na parte externa do orifício cervical, recoberto por epitélio escamoso e de fácil visualização em um exame laboratorial e a endocervix, porção proximal ao orifício cervical externo, recoberto por epitélio colunar. Esses dois tipos de epitélio encontram-se na junção escamocolunar (JEC) (Marsh et al., 1956; IARC, 2004; Herfs, 2012).

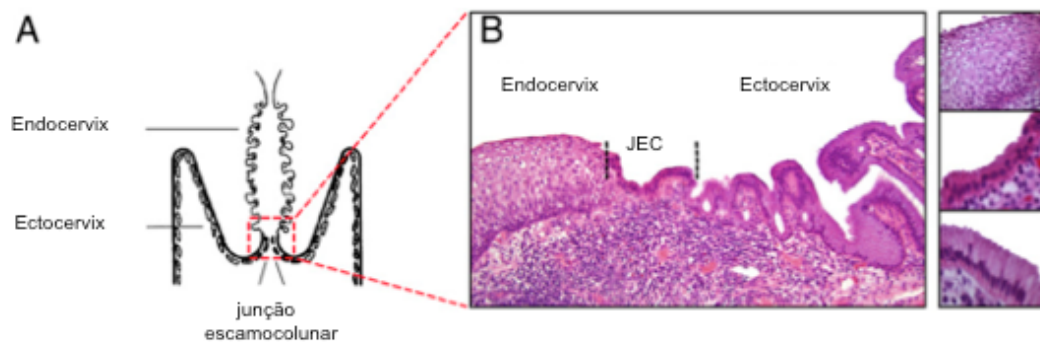


Figura 1.8.1- Representação esquemática do colo do útero humano. (B) Corte histológico do colo, Fonte: Adaptados de Herfs M et al., 2012.

A JEC é uma região que se apresenta como uma margem bem definida devido à diferença de altura dos epitélios escamoso e colunar. Sua localização anatômica é variável durante a vida da mulher e depende de fatores como idade, estado hormonal, uso de anticoncepcionais orais e determinadas condições fisiológicas como gravidez. Ao longo da vida da mulher, devido aos processos fisiológicos normais e acidez vaginal, as células do epitélio colunar são repetidamente destruídas. A substituição fisiológica do epitélio colunar por um epitélio escamoso recém-formado é denominada de metaplasia escamosa (Richart, 1973; Marsh et al., 1956 aput Herfs, 2012). A região do colo uterino onde o epitélio colunar é substituído pelo novo epitélio escamoso metaplásico é denominada de zona de transformação. Nas mulheres em idade reprodutiva, esta zona está localizada na ectocérnix. Depois da menopausa e com o avanço da idade, o colo

uterino reduz-se de tamanho em decorrência da diminuição do hormônio estrogênio. A identificação do sítio anatômico da zona de transformação é de grande importância em exames clínicos, visto que quase todas as manifestações da carcinogênese cervical ocorrem nessa zona (Herfs et al., 2012). A zona de transformação é descrita como normal quando é composta de metaplasia escamosa imatura e/ou madura juntamente com as áreas de epitélio colunar interpostas. Já quando há evidência de carcinogênese cervical, como a alteração displásica na zona de transformação, é denominada de zona de transformação anormal ou atípica (IARC, 2004; Herfs et al., 2012).

Os tumores cervicais originam-se das células do epitélio da zona de transformação, sendo assim podem apresentar características de células escamosa, glandular ou um padrão misto. Portanto, existem dois tipos principais de câncer de colo do útero: os carcinomas de células escamosas e os adenocarcinomas (Marsh, 1956; Herfs et al., 2012). Os carcinomas de células escamosas possuem células neoplásicas com estroma sobreposto, com grande variação no padrão de crescimento e tipo celular. Os tumores produzidos possuem diferentes graus de diferenciação e aproximadamente 50% a 60% são considerados neoplasias moderadamente diferenciadas e o restante estão distribuídos de forma igualitária em bem e mal diferenciados. As células neoplásicas são subdivididas em dois tipos, queratinizadas e não-queratinizadas. As células do tipo queratinizada são compostas de células epidermóides, contendo aglomerados de queratinas, com núcleo grande e hipercromático. O carcinoma escamoso não-queratinizado são formados por células poligonais inchadas irregulares, que invadem o estroma cervical. Já os adenocarcinomas em geral, originam-se no canal endocervical no epitélio glandular, formando tumores diferenciados a moderadamente diferenciados (IARC, 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, atualmente o carcinoma de células escamosas responde por cerca de 75% a 80% dos casos, enquanto o adenocarcinoma está presente em 20 a 25%. Esta frequência vem sendo modificada ao longo do tempo, visto que nos últimos 30 anos a incidência de adenocarcinoma subiu de 5% para 20% (Cubie, 2013), sendo esta mudança acompanhada por um aumento significativo de casos em mulheres mais jovens, além do declínio nos casos associados ao carcinoma escamoso. Alguns estudos atribuem isso ao fato de que, com a introdução do exame Papanicolau (Traut and Papanicolau, 1943), houve um aumento no diagnóstico precoce nas lesões presentes na ectocervix,

precursoras do carcinoma de células escamosas. Já na detecção de lesões precursoras dos adenocarcinomas, que surgem a partir de glândulas endocervicais, o exame não obteve o mesmo impacto (Eifel et al., 1995; Vizcaino et al., 1998; Smith et al., 2000).

Com respeito ao prognóstico comparativo entre o adenocarcinoma do colo uterino em relação ao carcinoma de células escamosas, existem controvérsias. Alguns estudos sugerem que adenocarcinoma de colo uterino em estádios iniciais tem um pior prognóstico, comparado ao carcinoma escamoso [Hopkins et al., 1991; Eifel et al., 1995], porém outros trabalhos não tem evidenciado esta diferença (Lee et al., 2006). Estudos sugerem que, pelo fato de os adenocarcinomas surgirem das células glandulares endocervicais, que são anatomicamente menos visíveis, é plausível que o prognóstico seja pior, visto que as pacientes são normalmente diagnosticadas mais tardiamente, com a doença mais avançada (Smith et al., 2000).

1.9. Estadiamento tumoral de acordo com a classificação FIGO

Existem atualmente diversos fatores prognósticos que caracterizam a evolução tumoral como: o tamanho do tumor, a profundidade da invasão, o status dos linfonodos, o grau de diferenciação, os achados histopatológicos e o estadiamento clínico. São esses fatores que determinam o procedimento ideal para tratamento da doença (Bidus et al., 2007). Apesar de já bem descritos, ainda são reportadas altas taxas de erros decorrentes principalmente da subjetividade, entre os clínicos, no diagnóstico desses fatores (Bidus et al., 2007).

O principal fator prognóstico empregado na clínica, é o estadiamento baseado na classificação da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia). Segundo a FIGO, o estágio tumoral é dividido em: I (Ia, Ia1, Ia2, Ib, Ib1 e Ib2) quando o tumor limita-se ao colo uterino; II (IIa e IIb) tumor invadindo a vagina e/ou os paramétricos; III (IIIa e IIIb) tumor invadindo a vagina e/ou os paramétricos distais e; IV (IVa e IVb) tumor invadindo estruturas extra-uterinas (Bidus et al., 2007).

1.10. Mecanismo da infecção

Como descrito anteriormente, a infecção pelo vírus HPV é causa necessária para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. O vírus é capaz de

infectar as camadas mais basais do epitélio através de microlesões no tecido epitelial do colo uterino que podem ocorrer durante o ato sexual, especialmente na junção escamocolumnar (figura 1.10.1). O ciclo de vida do vírus HPV está intimamente relacionado com o estado de diferenciação das células do epitélio cervical (Doorbar et al., 2006). As proteínas de expressão precoce E5, E6, E7, E1 e E2 são expressas nas camadas basais e intermediárias. Em queratinócitos em estágio mais avançado de diferenciação, ocorre a expressão de E4 e das proteínas tardias L1 e L2, ocorrendo então formação das partículas virais. A liberação das partículas virais ocorre com a descamação natural dos queratinócitos mais superficiais. O ciclo produtivo da infecção ocorre quando o genoma do HPV encontra-se sob a forma episossomal, que permanece incubado no interior da célula do hospedeiro durante algum tempo, podendo variar de meses a anos. Após esse período, podem surgir manifestações clínicas como lesões de diferentes graus até o câncer cervical (Burd et al., 2003) .

Em algumas lesões de baixo grau e na maioria das lesões de alto grau da cérvix uterina, e no câncer, é observado com grande frequência a presença do DNA viral integrado ao genoma do hospedeiro. O processo de integração se dá através da quebra do gene E2, resultando na linearização e integração do DNA do vírus com o DNA da célula hospedeira. Com a evolução do grau da lesão, normalmente é observado quase exclusivamente o genoma viral integrado e, em menor proporção, cópias episossomais (zur Hausen et al. , 2002; Lehn H et al., 1988). Estudos sugerem que este processo de integração esteja associado à persistência do vírus no organismo, no entanto não se sabe ao certo o que provoca a integração entre os genomas viral e do hospedeiro e porque alguns tipos virais possuem maior capacidade em desenvolver tal mecanismo. Sabe-se entretanto, que este processo está associado a perda de expressão de E2, pois o rompimento do genoma viral durante o processo de integração ocorre geralmente na região codificante para essa proteína (Munger et al., 2002; Manavi et al., 2008; Bodily et al., 2011). Já outros estudos sugerem que a atividade reguladora de E2 sobre a expressão de E6 e E7 pode também ser inativada por outros mecanismos além do rompimento e integração do genoma viral, tais como a metilação em sítios específicos da LCR onde E2 se liga. Sendo assim, o processo de integração do DNA do HPV talvez não seja determinante para a carcinogênese cervical, o que possibilita, em alguns casos, a presença o vírus na forma episossomal (Arias-Pulido et al., 2005; Badaracco et al., 2002; Cheung et al., 2013)

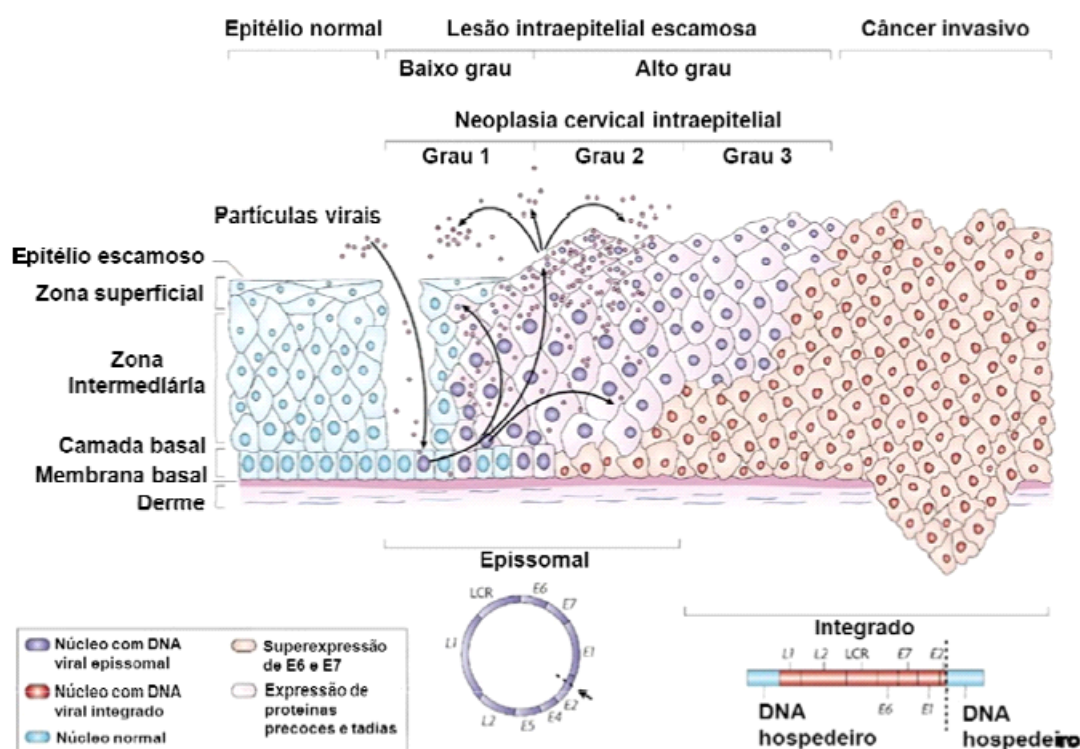


Figura 1.10.1- Progressão de lesões induzidas por HPV a câncer cervical. O vírus HPV acessa a camadas basal do epitélio através de microlesões no epitélio cervical. Seguido da infecção, ocorre a síntese das proteínas de expressão precoce E1, E2, E4, E5, E6 and E7 e replicação do genoma viral a partir do DNA viral na forma episomal. Nas camadas superiores (zonas intermediária e superficial) ocorre a expressão das proteínas E4, L1 e L2, ocorrendo a encapsulação do genoma viral e posterior liberação das partículas virais com a descamação dos queratinócitos da superfície do epitélio. As lesões intraepiteliais de baixo grau correlacionam com infecções virais produtivas. Algumas infecções por HPV de alto risco são persistentes e podem progredir para neoplasia intraepitelial cervical. A progressão de lesões não tratadas a lesões invasivas está associada com a integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro (núcleo vermelho), com perda do gene *E2* e subsequente superexpressão de *E6* and *E7*.

Fonte: modificado de Woodman et al. 2007

1.11. A transformação celular

Como descrito anteriormente, a proteína E2 é uma proteína multifuncional, que dentre as funções descritas, é responsável pelo controle da expressão dos oncogenes *E6* e *E7*. Com a perda do gene *E2*, ocorre a expressão acentuada desses oncogenes o que leva a progressão do ciclo celular e a imortalização celular (Doorbar et al., 2006; Munger et al., 2004; Zur Hausen H et al., 2002; Bodily et al., 2011). Entretanto, também é atribuído a eles a indução de anormalidades nos centrôssomos, resultando em aneuploidias e segregação anormal dos cromossomos (Spangle et al., 2010; Zur Hausen et al., 2002; Bodily et al., 2011).

Adicionalmente ao papel atribuído às proteínas E6 e E7, a proteína E5 parece ter um papel secundário importante na tumorigenese. Foi demonstrado em experimentos em meio de cultura, que E5 estimula fibroblastos a formar colônias (Straight et al., 1993), aumentando a eficiência na imortalização de queratinócitos com E6 e E7 (Stoppler et al., 1998), além de inibir a expressão do supressor de tumor P21, o que sugere que pode existir um processo cooperativo com E6 e E7 na transformação dos queratinócitos (Tsao et al., 1995). Foi também atribuído a E5 a habilidade de interferir na capacidade do sistema imune em eliminar células infectadas, pois a proteína viral é capaz de prejudicar significativamente a comunicação célula-célula, prejudicando a sinalização celular (Kabsch et al., 2002).

A proteína E7 tem papel na inativação da fosfoproteína nuclear retinoblastoma (pRb) que tem uma importante função na regulação do ciclo celular, através do controle negativo da passagem da fase G1 para S (figura 1.11.1). Esse processo ocorre pela interação de pRb com várias proteínas alvo, dentre elas, alguns fatores de transcrição da família E2F. Assim, este fator ativa a transcrição de genes necessários para a síntese de DNA e progressão do ciclo celular. A proteína E7 de HPVs de alto risco também é capaz de mediar a degradação de pRb pela via de proteólise. Dessa forma, a proteína E7 perturba o crescimento celular normal, estimulando a expressão de genes responsáveis pela divisão celular (Duensing et al., 2003).

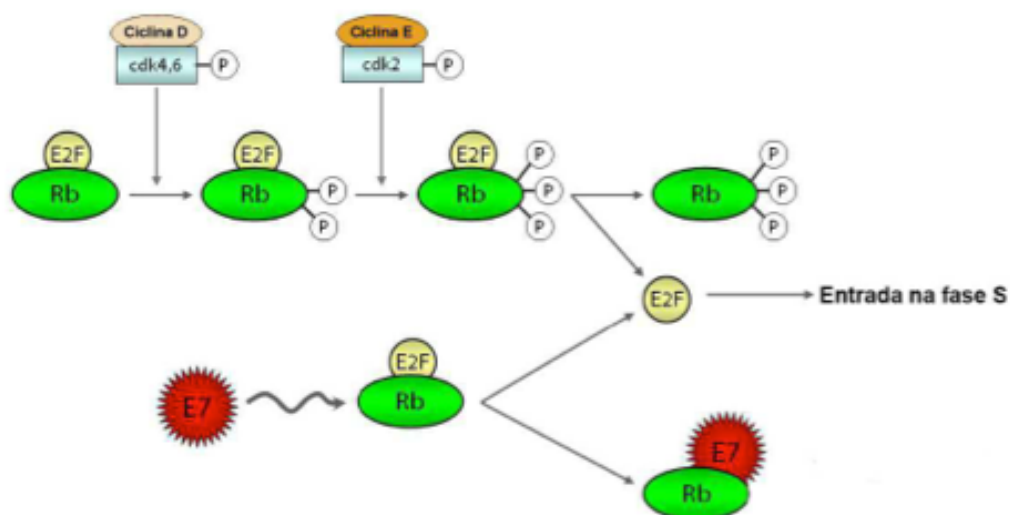


Figura 1.11.1- Associação de E7 de HPV a proteína do retinoblastoma. A fosforilação sequencial da proteína do retinoblastoma (Rb) por complexos ciclina/CDK inibem sua atividade repressora do ciclo celular. A proteína E7 de HPV se liga a Rb em sua forma hipofosforilada. Essa ligação desfaz o complexo entre Rb e o fator de transcrição celular E2F, resultando na liberação deste fator, o que permite que a célula entre na fase S do ciclo celular.
Fonte: Modificado de Jo e Kim (2005).

A proteína E6 (figura 1.11.2) tem um papel complementar a de E7 nos HPVs de alto risco, sendo estas expressas de forma simultânea (Tang et al., 2006). O processo de apoptose, devido a liberação de E2F mediado por E7, é impedido pela atividade da proteína E6, que tem a capacidade de induzir a degradação por ubiquitinação da proteína P53. O processo ocorre através da formação de um complexo entre E6 e uma proteína celular, E6-AP, que funciona como uma ubiquitina ligase. Ao se ligar ao domínio central desse complexo, a p53 se torna rapidamente ubiquitinada, sendo degradada nos proteossomas. Como consequência da baixa expressão, p53 deixa de atuar transativando genes envolvidos em reparo de DNA ou induzindo apoptose, o que favorece a malignização (Werness et al., 1990; Munger et al., 2004).

A proteína E6 dos HPVs de alto risco ligam-se a várias outras proteínas celulares (zur Hausen et al., 2002). Foi sugerido que E6 liga-se e leva a degradação de proteínas com domínio PDZ, que estão envolvidas na sinalização celular e adesão célula-célula. Esta associação parece ter um papel fundamental na carcinogênese, pois algumas destas proteínas tem função de supressão tumoral. Outra consequência importante da ação de E6 é a immortalização celular, feita através da ativação do promotor da subunidade catalítica da telomerase, hTERT (human telomerase reverse transcriptase), via interação com as proteínas c-Myc, ligadas ao promotor de hTERT. A telomerase humana é uma proteína capaz de prevenir a diminuição dos telômeros, portanto, com a sua expressão ativada por E6, ocorre a manutenção dessas estruturas, o que é fundamental para a immortalização das células cancerosas (Kiyono T et al., 1998; Munger et al., 2004).

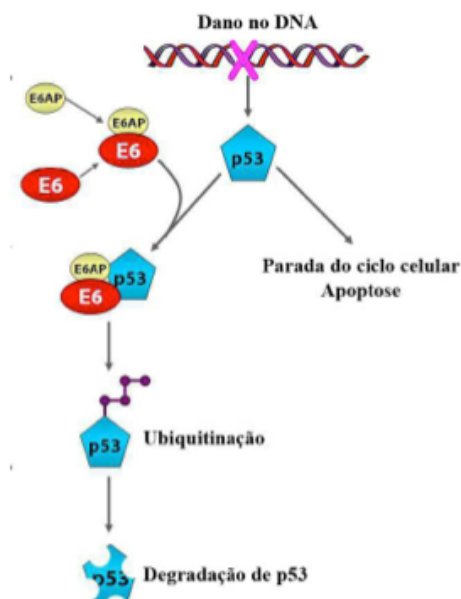


Figura 1.11.2- Degradação de p53 mediada por E6 de HPV. Danos ao DNA induzem a ativação de p53 levando tanto à parada do ciclo celular quanto à apoptose. E6 se liga a E6-AP e o complexo formado se liga a p53. E6-AP ubiquitina p53, que é rapidamente degradada pelo proteassomo.
Fonte: Modificado de Jo e Kim (2005).

1.12. Variação Intratipo dos HPVs

As variantes do HPV foram definidas através da diferença de aproximadamente 1,0 % entre os genomas completos do mesmo tipo de HPV (Burk et al. 2011;2013, Chen et al., 2011; Chen et al., 2005). O interesse neste campo está crescendo rapidamente, visto que apesar da relação entre os diferentes HPVs e o desenvolvimento do câncer estar bem estabelecido, a razão pela qual somente algumas lesões associadas a genótipos de alto risco progredirem para o câncer invasivo permanece indefinida (Zuna et al., 2011). Evidências sugerem que as variantes de um mesmo tipo de HPV podem interferir biologicamente e etiológicamente no desenvolvimento do câncer (Xi et al., 2007; Bernard et al., 2006), ou seja, no potencial infectivo do vírus (Schiffman et al., 2010; Villa et al., 2000), na persistência em longo prazo (Cornet et al., 2013; Gheit et al., 2011), no desenvolvimento de lesões precursoras (Xi et al., 2007; Hildesheim et al., 2001; Villa et al., 2000) e por fim, no processo invasivo das células contendo HPV (Burk, 2003). Tais diferenças poderiam contribuir para as disparidades na incidência de câncer cervical em todo o mundo.

Se forem considerados apenas os tipos de HPV oncogênicos mais prevalentes, as sequências de genomas completos e parciais do HPV 16 e HPV 18 indicam que as variantes intra-tipo possuem prevalências variáveis em diferentes

regiões do mundo (Burk et al., 2009). Estudos de variabilidade genética de isolados de HPV 16 e HPV 18 coletados nos 5 continentes revelaram uma co-evolução destes vírus e o padrão de dispersão das populações humanas pelos continentes (africanos, caucasianos e asiáticos) (Burk et al., 2003; Chan et al., 1992). Para HPV16 e HPV18, estudos anteriores sugeriram a existência das variantes, que foram nomeadas de acordo com a sua prevalência em diferentes populações (Ong et al., 1993; Ho et al., 1993; Yamada et al., 1997). Atualmente, esta nomenclatura foi revista e baseada no genoma viral completo, sendo padronizada em uma classificação alfanumérica (Burk et al., 2013).

1.13. Variantes de HPV 16

Uma pequena porção das infecções por HPV 16 persistem e podem levar ao câncer, no entanto a maioria das infecções são resolvidas naturalmente pelo sistema imunológico em até 12 meses (Schiffman et al., 2010). Os fatores que levam a persistência ou a eliminação viral ainda são pouco entendidos, mas diversos estudos sugerem que as variantes intratipo podem ter grande influência nessa questão. Até o momento, os estudos de variantes se concentraram principalmente sobre as variantes de HPV 16, o tipo mais prevalente em câncer cervical, tal como em lesões em diferentes estágios de progressão e também em citologia cervical normal (Cornet et al., 2013a; Gheit et al., 2011; Hildesheim et al., 2001; Schiffman et al., 2010; Sichero et al., 2007; Villa et al., 2000; Xi et al., 2007; Zuna et al., 2009).

O primeiro grande estudo mundial foi feito em 1993 por Ho e colaboradores em 1993, que relatou que as variantes de HPV 16, baseadas em um fragmento de 364pb de LCR, podem ser agrupadas em cinco grandes linhagens: Europeia (EUR) (sendo que a esta linhagem pertence o protótipo de HPV16), Asiática (As), Asiático-americana (AA), Africana 1 e Africana 2 (AFR1 e AFR2) (Ho et al., 1991; Ho et al., 1993). Posteriormente, Yamada e colaboradores descreveram uma linhagem adicional, Norte-Americana (NA) (Yamada et al., 1997). Recentemente, Burk e colaboradores (Burk et al., 2013), baseando-se nos genomas completos das variantes, modificaram esta nomenclatura. As variantes de HPV16 foram definidas pela diferença de 1,0% do genoma, e as sublinhagens na diferença de 0,5 a 0,9%. Desta forma, as variantes de HPV16 foram agrupadas em quatro linhagens principais; A (incluindo as Europeia e Asiática), B (incluindo Africana 1, Afr1), C (incluindo Africana 2, Afr2) e D (incluindo as linhagens Norte-Americana e

Asiático-Americana, ou NA e AA respectivamente) e 9 sublinhagens; A1, A2, A3 (Europeia), A4 (asiática), B1 (Afr1a), B2 (Afr1b), D1 (NA), D2 (AA1) e D3 (AA2) (figura 1.13.1)

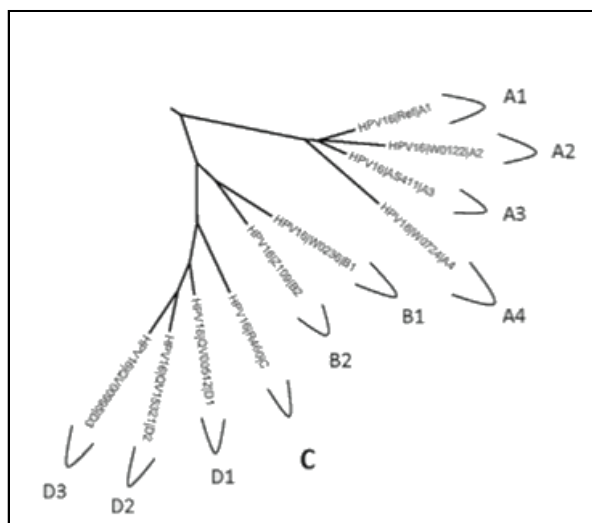


Figura 1.13.1 – Árvore filogenética construída a partir dos genomas completos representativos de cada linhagem/sublinhagens de HPV16, com os respectivos números de acesso do Genbank (Burk et al., 2013).

Apesar do HPV 16 ter sido inicialmente subdividido em 6 variantes distintas, uma recente revisão aponta que a maioria dos estudos acerca do assunto agrupam estas 6 linhagens em dois grandes grupos: O grupo Europeu (EUR) que inclui a variante A e o grupo Não Europeu (NE), que incluem as variantes B, C e D. As linhagens não-européias pertencentes ao grupo NE são apontadas como sendo mais patogênicas, em comparação com os isolados Europeus (EUR) (Sichero et al., 2007; Burk et al., 2013).

Em relação à persistência viral, a comparação entre os grupos EUR versus NE indica que as variantes do grupo NE são duas vezes mais persistentes que as variantes do grupo E (Schiffman et al. , 2010; Villa et al. , 2000). Em populações Europeias geneticamente mais homogêneas, a linhagem predominante é do tipo EUR (Zehbe et al., 2001). Esta linhagem pode ser dividida em dois conjuntos de isolados, de acordo com o polimorfismo T350G, presente no gene E6, que leva a troca do aminoácido de leucina para valina. Diversos estudos sugerem que isto pode influenciar na persistência viral, conferindo um risco duas vezes maior a variantes

350T versus 350G (Gheit et al., 2011; Zehbe et al., 2001; Grodzki et al., 2006). Entretanto, em um recente estudo conduzido na França com 142 mulheres infectadas com HPV 16, não houve significância estatística no risco de persistência entre as duas variações (Cornet et al., 2013).

Comparativamente, existe uma forte evidência de que as variantes do grupo Não Europeu tem riscos mais elevados para o desenvolvimento do câncer, embora grande parte desta associação esteja relacionada especificamente a variante AA (Berumen et al., 2001; Burk et al., 2003; Zuna et al., 2009). Há também estudos que indicam que as variantes D2/D3, em comparação com o grupo E, está em uma proporção muito mais elevada (4-35 vezes) em adenocarcinomas (Berumen et al., 2001; Burk et al., 2003; Zuna et al., 2011).

O elevado risco associado a variante D pode estar especificamente associado a oncoproteína E6. A maioria dos estudos experimentais em HPV 16 foram conduzidos utilizando-se E6 do protótipo E enquanto alguns poucos estudos avaliaram as outras variantes de E6 (Stoppler et al., 1998; Chakrabarti et al., 2004; Lichtig et al., 2006; Asadurian et al., 2007; Zehbe et al., 2009). O protótipo E6 e suas variantes diferem: na sua afinidade com o cálcio, através da ligação E6-PB (Asadurian et al., 2007), na expressão de citoqueratinas em culturas organotípicas (Zehbe et al., 2010) e no potencial de imortalização celular, avaliado por experimentos em uma linhagem de queratinócitos humanos (Boukamp, 1988).

Alguns estudos sugerem que a variante AA é, em relação ao protótipo E, encontrada 20 vezes mais frequentemente em câncer cervicais diagnosticados nas Américas (Xi et al., 1997; Berumen et al., 2001), quando comparadas a mulheres sem câncer. Este último autor referiu-se em seu estudo à população mexicana. Foram observados que, comparativamente, a variante D versus a variante A foi encontrada de forma estatisticamente significativa com maior frequência em pacientes de casos de câncer (AA = 23,2% [42 de 181]; E = 27,1% [49 de 181]) do que no grupo controle sem câncer (AA = 1,1% [dois de 181] ; E = 10% [18 de 181]). Comparada ao protótipo, a variante E6 AA difere em 3 trocas de aminoácidos: Q14H / H78Y / L83V. Com base no modelo proposto para E6 de HPV 16, supõe-se que estas mudanças afetam a estabilidade e função da proteína, dando à variante AA um melhor mecanismo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro e um maior potencial oncogênico (Zehbe et al., 2003; de Araújo Souza et al., 2009)

Um estudo conduzido por Richard et al. (2010) foram comparadas as capacidades da proteína E6 do protótipo (E) e de AA em imortalizar e transformar

células de queratinócitos em cultura, na presença de E7, que normalmente é co-expresso em cânceres cervicais. Os resultados mostraram não só que a variante E6 AA conduziu a um período mais curto de recuperação das células no período de senescência em cultura, como também as culturas com células transfectadas com a variante E6 AA apresentaram o dobro da capacidade da proliferação celular, no período pós senescência.

1.14. Variantes de HPV 18

O HPV 18 é o segundo tipo mais comum de HPV associado ao câncer de colo do útero. Estudos apontam que as infecções por HPV 18 são proporcionalmente mais associados aos adenocarcinomas, do que os as infecções por HPV 16. Ou seja, se forem comparados os casos de câncer infectados por HPV 16 ou HPV 18, teremos uma proporção maior de adenocarcinomas em relação a carcinomas de células escamosas em infecções por HPV 18 do que HPV 16 (Tenti et al., 1996; Pirog et al., 2000; Atekruse et al., 2003). A distribuição distinta dos HPVs 16 e 18 em neoplasias escamosas e glandulares pode ser explicada por diferenças no potencial oncogênico entre os tipos de HPV. Apesar da sua relevância clínica, o HPV 18 apresenta uma prevalência muito menor do que o HPV 16, o que limita o conhecimento sobre o papel das variantes (Burk et al., 2013).

A distribuição das variantes do HPV 18 mostra relativa similaridade a distribuição geográfica do HPV 16. Além disso, as linhagens de HPV18 também foram inicialmente definidas baseadas em um fragmento de LCR, onde foram inicialmente identificadas 3 linhagens: Asiático-Ameríndias (AA), sendo que a esta linhagem pertence o protótipo (Villa et al., 2000), Europeia (E), e Africana (AF) (Ong et al., 1993; Villa et al., 2000; De Boer et al., 2004). Assim como para HPV16 e outros tipos, Burk e colaboradores (Burk et al., 2013), baseando-se nos genomas completos das variantes, também modificaram a nomenclatura baseada na origem geográfica das amostras. Para o HPV18, as variantes foram agrupadas em 3 grandes linhagens: A (compreendendo as linhagens Asiático-Americano e Europeu, ou AA e E, respectivamente) B e C (compreendendo a linhagem Africana, Afr). Oito sublinhagens foram também descritas: A1 e A2, equivalentes a AA; A3, A4 e A5, equivalentes a E; e B1, B2 e B3, equivalentes a Afr (Figura 1.14.1)

Assim como o HPV 16, as linhagens não europeias são apontadas como as com maior risco para o desenvolvimento de lesões de alto grau e câncer cervical

(Sichero et al., 2007). Entretanto, outros estudos sugerem evidências indicando que a composição genética dos hospedeiros pode ter forte influência nessas análises. Um estudo conduzido por Xi et al. em 2006, concluiu que determinadas variantes de HPV 18 tem maior persistência de acordo com a região de origem da população humana estudada, ou seja, a variante Européia persiste mais tempo em mulheres caucasianas, enquanto a variante Africana e Asiático-Ameríndias persistem mais em mulheres afro-americanas (Xi et al., 2006). Em lesões pré-cancerosas, poucos estudos foram realizados, provavelmente pelo fato de que estas lesões, quando associadas ao HPV 18, são menos frequentemente detectadas em comparação com o câncer (Guan et al. , 2012).

Em relação a histologia tumoral, alguns estudos sugerem que não há evidências de que diferentes variantes de HPV 18 estejam associados a um determinado tipo histológico de tumor (Arias - Pulido et al. , 2005). No entanto, outros estudos sugerem que a linhagem Asiático Americana é 4 vezes mais comum em adenocarcinoma que a linhagem Europeia (Burk et al., 2003; De Boer et al., 2005).

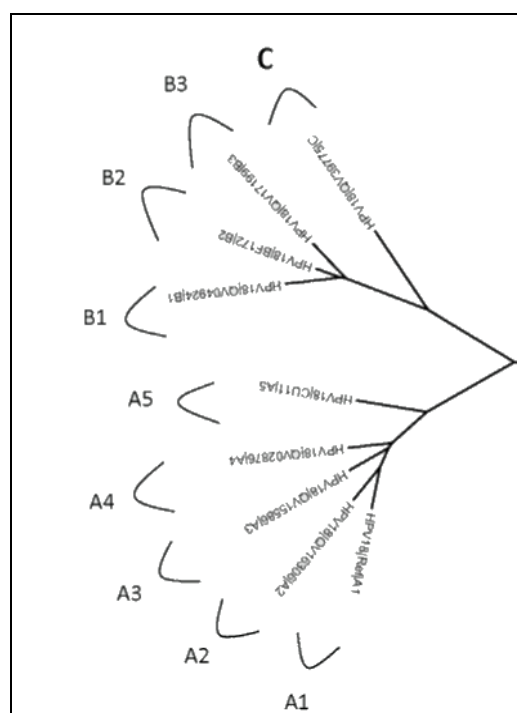


Figura 1.14.1 – Árvore filogenética construída a partir dos genomas completos representativos de cada linhagem e/ou sublinhagens de HPV18, com os respectivos números de acesso do Genebank (Adaptado de Burk et al., 2013).

1.15. HPV e outros câncer

O HPV é associado a lesões benignas e malignas. O vírus preferencialmente infecta o epitélio escamoso estratificado e nos seres humanos quase todas os epitélios podem ser afetados. Nas últimas décadas, um número crescente de associações entre diferentes tipos de Câncer em outros sítios anatômicos e os HPV de alto risco tem sido relatadas (figura 1.15.1): 84% dos cânceres de canal anal, 40% dos cânceres de vulva, vagina e pênis, 20% dos cânceres de orofaringe e 10% dos cânceres de laringe e esôfago (Zur Hausen et al., 1996; Ferenczy et al., 2003; Cubie HA et al., 2013). Entretanto, a associação entre HPV e câncer mais evidente ocorre em relação ao câncer cervical, suportado pela evidência epidemiológica de que o DNA de HPV pode ser encontrado em 99,7% dos casos deste tipo de câncer (Walboomers et al., 1999; Schiffman et al., 1993).

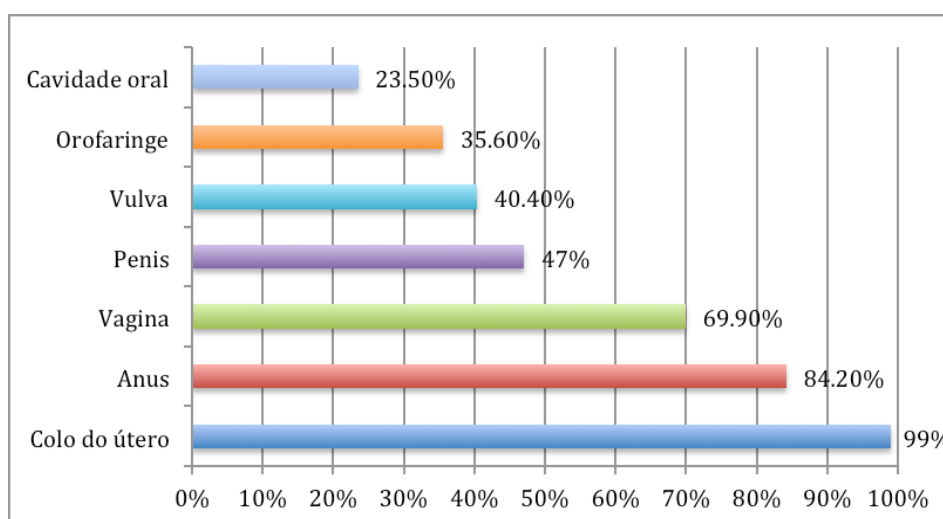


Figura 1.15.1 - Associação entre o HPV e diferentes tipos de câncer
Fonte: WHO/ICO – Centro de Informação de HPV e Câncer Cervical ,2010

1.16. Histórico de estudos de HPV em câncer cervical no Brasil

Como já descrito, o câncer do colo do útero representa o terceiro câncer mais comum em mulheres em todo o mundo e contribui para aproximadamente 10% de todos os cânceres femininos, tornando-se a terceira maior causa de morte por câncer em mulheres. Dados de 2012 revelaram que cerca de 530 mil casos novos casos e 265 mil mortes, sendo a América Latina responsável por aproximadamente 15% deste total. Estudos de prevalência dos diferentes tipos de HPV nas diferentes regiões do mundo são fundamentais para estimar o impacto

das vacinas sobre o câncer de colo do útero e para o desenvolvimento de programas de rastreio. Algumas meta-análises tem relatado informações sobre a distribuição da prevalência de tipos de HPV de alto risco em câncer cervical em todo o mundo, no entanto, os dados disponíveis para populações da América Latina, dentre as quais a do Brasil, são incompletos e muito variáveis, desde a metodologia utilizada para a identificação do vírus, assim como do material biológico utilizado. Alguns resultados também apresentam-se discrepantes no que diz respeito a prevalência a outros tipos de HPV diferentes de HPV 16 e HPV 18.

Em uma recente meta-análise (Ciapponi et al., 2011) foram revistos e listados os principais estudos relacionados a tipagem e distribuição de HPV a partir de tumores e lesões de alto grau, em populações do Caribe e América Latina, dentre as quais a do Brasil. No estudo, foram relatadas algumas técnicas de genotipagem do HPV, que, pelo fato de apresentarem diferentes graus de sensibilidade, poderiam afetar os resultados de prevalência tipo específica. Atualmente, a identificação de tipos específicos do HPV em amostras biológicas é preferencialmente feito por meio de métodos baseados em PCR devido à sua sensibilidade superior, no entanto, alguns estudos mais antigos ainda utilizam outras técnicas, como a hibridização *in situ*. Para o presente estudo, listamos 21 estudos em que foram avaliados os tipos de HPV presentes a partir de tumores cervicais, sendo que em 4 deles foi utilizado tecido tumoral fresco como fonte de material genético. Em 14 estudos, foram utilizadas técnicas baseadas em PCR, enquanto em 7 estudos foram utilizadas técnicas como Southern blot (SB), Dot blot (DB), FISH (F) e hibridização *in situ* (ISH).

Tabela 1.16.1- Lista de estudos realizados no Brasil relacionados a identificação dos tipos de HPV presentes em amostra de tumores cervicais.

Estudo	Amostra	Técnica detecção	Genotipagem
Tavares 2014	Células esfoliadas	PCR MY09/11 / GP5+/6+	Sequenciamento
Fernandes 2013	Tecido fresco	PCR MY09/11	<i>Dot-blot hybridisation</i>
Oliveira 2013	Tecido fresco	<i>Linear Array HPV Genotyping Test</i>	<i>Linear Array HPV Genotyping Test</i>
Amaro Filho 2013	Tecido fixado em parafina	PCR GP5+/6+ / MY09/11	Sequenciamento
da Silva Barros 2012	Células esfoliadas	PCR MY09/11	<i>Reverse line blot hybridisation</i>
Fernandes 2011	Tecido fresco	PCR MY09/11	<i>Dot-blot hybridisation</i>
Ribeiro 2009	Células esfoliadas	PCR MY09/11	<i>Reverse line blot hybridisation</i>
Fernandes 2010	Tecido fixado em parafina	PCR GP5+/6+	<i>Dot-blot hybridisation</i>
Pitta 2010	Células esfoliadas	<i>Linear Array HPV Genotyping Test</i>	<i>Linear Array HPV Genotyping Test</i>
Rabelo-Santos 2009	Células esfoliadas	PCR PGMY	<i>Reverse line blot hybridisation</i>
Cambruzzi 2005	Tecido fixado em parafina	PCR GP5+/6+	PCR tipo específico
Rabelo-Santos 2003	Tecido fixado em parafina	PCR GP5+/6+	<i>Dot-blot hybridisation</i>
Pinheiro 2001	Tecido fresco	<i>Southern blot / PCR MY09/11</i>	<i>Dot-blot hybridisation</i>
Cavalcanti 2000	Tecido fixado em parafina	<i>in situ hybridization</i>	<i>in situ hybridization</i>
Lorenzato 2000	Células esfoliadas	PCR MY09/11	RFLP
Noronha 1999	Tecido fixado em parafina	PCR MY09/11	<i>Dot-blot hybridisation</i>
Cavalcanti 1996	Tecido fixado em parafina	<i>in situ hybridization</i>	PCR tipo específico
Bosch 1995	Tecido fixado em parafina	PCR	PCR tipo específico
Cavalcanti 1994	Tecido fixado em parafina	<i>in situ hybridization</i>	<i>in situ hybridization</i>
Eluf Neto 1994	Células esfoliadas	PCR GP5+/6+	<i>Southern blot</i>
Guimarães 1992	Tecido fixado em parafina	<i>in situ hybridization</i>	<i>in situ hybridization</i>

1.17. Vacinas

As vacinas são consideradas como uma das formas de prevenção mais eficientes no combate a diversas doenças imunopreveníveis. No Brasil, vários programas de imunização foram de grande sucesso, apontando para a boa receptividade da população a essa estratégia de prevenção.

Até a década de 90, os programas de rastreamento utilizaram como principal estratégia de rastreamento para o câncer do colo do útero o exame Papanicolau convencional. Novos métodos de rastreamento como testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo do útero utilizando ácido acético (VIA) ou lugol (VILI) são apontados, em vários estudos, como eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero. No Brasil, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente

para mulheres de 25 a 64 anos (Ministério da saúde/INCA 2012). Como o câncer cervical é causado por um tipo de infecção viral, seria esperado que uma vacina capaz de gerar anticorpos neutralizantes dirigidos contra as proteínas do capsídeo viral L1 e/ou L2, fossem capazes de bloquear a entrada do vírus, e com isso, reduzir a incidência desse tipo de câncer a longo prazo. As proteínas do capsídeo viral L1 e L2, ligam-se a anticorpos neutralizantes, que reconhecem epítomos conformacionais (Christensen et al., 1991; Hines et al., 1994), sendo portanto alvos para vacinas profiláticas à infecção pelo vírus HPV. A proteína L1, sozinha ou associada a L2, forma VLPs (do inglês, *virus like particles*) (Hagensee et al., 1992; Kirnbauer et al., 1992) que são altamente imunogênicas e induzem resposta de anticorpos neutralizantes para o HPV (Brown et al., 2001).

Até recentemente, duas vacinas baseadas em VLPs formadas por proteínas L1 dos HPVs 6, 11, 16 e 18 (Gardasil) ou HPV 16 e 18 (Cervarix) estavam disponíveis no mercado. Ambas as vacinas demonstraram ser altamente imunogênicas em ensaios clínicos, resultando em 100% de soroconversão nas diferentes populações estudadas (Harper et al., 2004; Villa et al., 2006; Garland et al., 2007). A duração da proteção conferida pelas vacinas ainda não é conhecida, no entanto a continuação dos estudos tem mostrado que a eficácia é mantida por pelo menos cinco anos (Harper et al., 2006; Olsson et al., 2009). Estas vacinas foram baseadas em partículas virais constituídas apenas pela proteína L1 e ambas apresentaram uma alta resposta imune e eficácia em longo prazo. A vacina bivalente também apresentou proteção cruzada contra os tipos virais HPV 31 e HPV 45 (Paavonen et al., 2007), dois tipos virais próximos aos HPV 16 e HPV 18, respectivamente. Fato similar foi observado para a vacina tetravalente com respeito ao HPV 31 e outros HPVs de alto risco como (Brown et al., 2009; Wheeler et al., 2010). Mas para ambas as vacinas a eficácia da proteção cruzada foi inferior aquela observada para os tipos virais utilizados na vacina. O Brasil foi um dos países pioneiros na aprovação da vacina contra o HPV. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autorizou a vacina anti HPV em 24 de Agosto de 2006. Porém, somente 7 anos depois da aprovação, entrou em vigor em 20 de novembro de 2013 a incorporação da vacina quadrivalente contra HPV na prevenção do câncer de colo do útero no Sistema Único de Saúde (SUS)

Depois do HPV 16/18, duas recentes metanálises apontaram que os HPVs 31/33/35/45/52/58 são os tipos mais frequentemente detectados em câncer em todo o mundo (Li et al., 2011; de Sanjose et al., 2010). Com estes dados, foi desenvolvida

uma vacina nonavalente, denominada Gardasil 9, que contem os cinco tipos de HPV adicionais (31/33/45/52/58) aos 4 tipos de HPV previamente incluídos (6/11/16/18) na vacina tetravalente Gardasil. Em países do continente Asiático e América Latina, estudos clínicos fase 3 ainda estão em andamento, entretanto, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou no dia 10 de dezembro de 2014 a sua utilização em mulheres com idade entre 9 e 26 anos, e homens com idades entre 9 e 15. Um estudo clínico randomizado e controlado, foi realizado nos EUA e em outros países (incluindo o Brasil) em cerca de 14.000 mulheres em idades de 16 e 26 anos com resultados negativos para os tipos de HPV da vacina. Os participantes receberam no início do estudo a vacina Gardasil ou a Gardasil 9. A Gardasil 9 apresentou 97% de eficácia na prevenção de lesões precursoras do câncer de colo do útero, da vulva e cânceres vaginais causados pelos cinco tipos adicionais de HPV (31, 33, 45, 52, e 58). Além disso, o Gardasil 9 mostrou-se tão eficaz como a Gardasil (quadrivalente) para a prevenção de doenças causadas pelos quatro tipos de HPV compartilhados (6, 11, 16 e 18) com base em respostas de anticorpos (Merck & Co., Inc.). Um recente estudo, tomando como base o ano de 2012 com uma projeção até 2025, sugere que, quando combinados, os nove tipos de HPV incluídos na vacina Gardasil 9 (HPV 16/18/31/33/45/52/58/6/11) atingirão uma cobertura relativa a proteção de infecção por HPV em todo o mundo de 89,4 % (IC 95% : 88,8 - 90,1), com algumas variações regionais , de 84,6% (IC 95%: 81,9-87,1) na América Central para 95,5 % (IC 95%: 91,2-98,2) na América do Norte. (Serrano et al., 2014).

Com relação a variantes intratipo, pouco se sabe a respeito de que se os polimorfismos associados as diferentes linhagens podem influenciar nas taxas de infecção após a vacinação e/ou escape vacinal, inclusive quanto a proteção cruzada contra os tipos relacionados ao HPV 16 e HPV 18 e não incluídos nas primeiras vacinas disponibilizadas. Em um recente estudo conduzido por Harari e colaboradores (Harari et al., 2015), os autores, embora não tenham encontrado um padrão consistente de variantes com diferentes eficiências das vacinas, observaram uma proteção diferencial pela vacina bivalente contra determinadas variantes do HPV 31. Entretanto, o estudo diz que, em geral, a variação de sequência ao nível das variante não parece explicar a proteção cruzada parcial pela vacina bivalente. Todavia, tendo em vista a escassez de dados acerca deste tema, novos estudos devem ser conduzidos com amostras provenientes de diferentes regiões do mundo,

afim de que se comprove ou seja refutada a hipótese de que as variantes poderiam ter influência na eficiência e/ou imunogenicidade conferida pelas vacinas.

2. Justificativa

Os resultados apresentados em estudos sobre as vacinas contra o HPV mostraram que são eficazes na prevenção da infecção e de lesões precursoras do câncer cervical associadas aos genótipos de HPV presentes na formulação. Apesar dos resultados obtidos nos ensaios clínicos com as vacinas, o tempo de seguimento da imunidade a partir da vacinação de 6,4 anos (David et al., 2009) ainda é insuficiente para observação do efeito sobre a incidência do câncer do colo do útero.

Num cenário de vacinação contra HPV, a avaliação de programas de controle do câncer do colo do útero deve incluir o monitoramento do programa de vacinação. Para tal é recomendável que ações de vigilância dos tipos de HPV circulantes sejam estruturadas, em especial para identificação dos genótipos associados ao câncer do colo do útero. Os dados epidemiológicos referentes a prevalência dos tipos de HPV para os quais as vacinas foram desenvolvidas, especificamente com respeito à população brasileira, generalistas por serem agrupados a um grande grupo “América do sul e central”, como também possivelmente defasados, visto o extenso tempo de coleta, o baixo número de amostras analisadas e a metodologia utilizada para a identificação do HPV presente.

Desde a obtenção pela ANVISA do registro para comercialização da vacina no Brasil, o Ministério da Saúde tem se dedicado ao levantamento das condições necessárias a sua implantação no país. Como etapa preliminar foi recomendada a realização de estudos para a obtenção de prevalências dos tipos de HPV na população brasileira, previamente à implantação da vacina. Os resultados de estudos de prevalências na população segundo a idade servirão de subsídio para a definição da idade ótima para vacinação futura, enquanto que estudos com mulheres com câncer cervical permitirão identificar o perfil viral entre as doentes. Os conhecimentos obtidos a partir destes estudos são fundamentais para a avaliação dos programas de controle do câncer do colo do útero em vigência e da introdução da vacinação como estratégia de prevenção (de Sanjosé et al., 2010; Wheeler, 2010).

Entre os resultados esperados neste estudo, a prevalência atual de HPVs oncogênicos de alto e de baixo risco detectados em casos de câncer do colo do útero fornecerá um panorama no qual o Ministério da Saúde poderá obter subsídios para a escolha do melhor conjunto de tipos virais contidos em vacinas disponíveis e

que poderá vir a ser implantada no país para a população-alvo, dentro do programa nacional de imunizações.

Em relação ao estudo das variantes dos HPV 16 e HPV 18, poucos estudos foram realizados no Brasil (Villa et al., 2000; Cruz et al., 2004; Sichero et al., 2007; Junes-Gill et al., 2008; Cerqueira et al., 2008; Sichero et al., 2012; Freitas et al., 2014), principalmente em amostras de DNA extraídas a partir de tecido tumoral (Junes-Gill et al., 2008). O interesse neste tópico vem crescendo muito nos últimos anos, tendo em vista o possível papel de determinadas variantes na história natural da infecção e possíveis variações no prognóstico dos carcinomas em diferentes estágios de evolução. Mesmo em trabalhos realizados no mundo, muitas destas questões permanecem ainda não esclarecidas e muitos achados são contraditórios, tornando fundamentais novas e contínuas abordagens a cerca desse tema. Além disso, quando relacionamos a questão das vacinas contra o HPV, não está claro qual é a amplitude da reação cruzada entre os subtipos de HPV 16 na resposta imune das vacinas contra o HPV existentes. O conhecimento sobre as diferenças entre eles é de grande importância para o desenvolvimento de novas vacinas e para verificar a efetividade das que já se encontram no mercado (Wu et al., 2006). E por fim, da mesma maneira como ocorre com os estudos mundiais dos tipos de HPV, os dados acerca da prevalência de variantes na população brasileira são tratados de maneira muito abrangente, estendendo dados locais a grandes regiões que, comprovadamente, possuem alta diversidade viral e de ancestralidade humana.

3. **Objetivo geral**

- Estimar a frequência dos tipos e variantes intratipo de HPV em amostras de câncer cervical uterino de mulheres encaminhadas para o Hospital do Câncer II do Instituto Nacional de Câncer.

3.1. Objetivos Específicos

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

4. Metodologia

4.1. População de estudo

A população de estudo foi composta por 594 mulheres portadoras de câncer de colo uterino matriculadas no Hospital do Câncer II do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), entre Julho de 2011 e Março de 2014. O material tumoral foi coletado a partir de biópsias de tumores de cérvix uterino de mulheres encaminhadas ao Hospital do Câncer II do INCA (HCII), sendo incluídas no estudo amostras de câncer nos estádios IB1, IB2, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB (lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos em sua maior dimensão). A coleta de amostras do tumor foi realizada ambulatorialmente nos casos que não apresentavam indicação cirúrgica como tratamento inicial (e sim de quimioterapia, radioterapia e braquiterapia), e nos casos tratados com cirurgia a biópsia foi coletada por um patologista quando possível de modo a não prejudicar o estadiamento final do tumor e a análise patológica.

4.2. Coleta de dados epidemiológicos

Anteriormente à coleta de amostras, as pacientes encaminhadas para atendimento ambulatorial no Serviço de Ginecologia Oncológica do HCII foram abordadas previamente ao atendimento por um profissional de saúde especialmente treinado, sendo convidadas a participar do estudo. Caso aceitassem, as voluntárias assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram submetidas a um extenso questionário epidemiológico, com o objetivo de descrever as características sócio-demográficas da população de estudo bem como a presença de fatores de risco associados ao câncer do colo uterino (Anexo I).

4.3. Coleta, transporte e armazenamento das amostras

Após a coleta dos dados epidemiológicos, as mulheres foram encaminhadas a consulta ambulatorial. O estadiamento clínico era feito e a biópsia (com 0,5cm X 0,5cm X 0,5cm) do tumor do colo do útero coletada com uma pinça saca-bocado. O material colhido era armazenado em criotubos em 1 ml de RNA Later (Life-

Technologies) e enviado ao Banco Nacional de Tumores e DNA (BNT) do INCA localizado no Centro de Pesquisas do INCA. O transporte entre o HCII e o Centro de Pesquisa do INCA, onde estão localizados os laboratórios, foi feito em galões de Nitrogênio líquido, em um fluxo semanal. As amostras, ao chegarem no BNT, eram retiradas do RNA later, cadastradas em um sistema com código de barras e armazenadas em freezer a -80 °C.

4.4. Extração do DNA

O isolamento do DNA deu-se através da utilização do kit comercial *QiaAMP DNA Mini Kit (Qiagen)*, seguindo-se o seguinte protocolo:

Primeiramente as amostras eram retiradas do freezer -80 °C e rapidamente maceradas com o auxílio de bisturi estéril. Em seguida, para que ocorresse a lise da membrana plasmática e nuclear e degradação proteolítica das proteínas celulares, em cada tubo, eram adicionados 220 µL de solução contendo 20µl de proteinase K a 20 mg/ml e 200µl de tampão ATL (Qiagen). As amostras eram então incubadas em termobloco (Qiagen) a 56°C por 16 horas com agitação. Após as primeiras 10 horas decorridas, eram adicionados 5 µL de proteinase K a 20 mg/ml e deixadas a 56°C por cerca de 8 horas.

Após esse período, eram adicionados 200µl de etanol 100% a cada tubo. As amostras então foram centrifugadas para a precipitação de *debris* celulares, sendo a solução aquosa cuidadosamente transferida para colunas com uma matriz capaz de reter o DNA. Após nova centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto eram adicionados 500µl de tampão AW1 (solução de lavagem) às colunas, seguida de nova centrifugação a 8.000 rpm por um minuto. Então eram adicionados novamente às colunas 500µl do Buffer AW2 (solução de lavagem) seguindo-se de centrifugação a 13.000 rpm por 4 minutos. As colunas com a matriz eram transferidas para tubos de 1,5ml, sendo por fim adicionados 200µl do tampão TE (tampão de eluição) a cada tubo. Após um breve período de incubação por 5 minutos, as amostras eram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 minutos para eluição do DNA que foi armazenado a -20 °C.

4.5. Quantificação de DNA

Apos o protocolo de extração, O DNA foi submetido a quantificação e verificação de integridade e pureza. A concentração de DNA das amostras foi obtida em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific)*, pela quantificação de absorbância no comprimento de onda de 260 nm. Neste comprimento de onda uma unidade de densidade ótica corresponde a 50 µg DNA por µL (Sambrook & Russel, 2001). Foi utilizado 1µL do volume total do DNA isolado para a leitura da absorbância. A leitura no comprimento de onda de 280 nm foi realizada para o cálculo da razão A260/A280, para determinar a pureza da amostra de DNA.

4.6. Detecção do DNA do HPV por PCR

A detecção de DNA de HPV foi feita através da amplificação de região conservada do gene *L1*, através da técnica da PCR, utilizando o conjunto de iniciadores PGMY (Gravitt et al., 2000). Nos casos em que o resultado da amplificação com esses iniciadores foi negativa, foi realizado um nested PCR utilizando os iniciadores GP5+/GP6+ (Fuessel Haws et al., 2004). Os oligonucleotídeos empregados na análise foram adquiridos da Sigma e IDT. As sequências dos iniciadores estão no quadro 4.6.1. Para cada conjunto de reações foram utilizados controles negativos (sem a adição de DNA) e também controles positivos, utilizando-se DNA extraído das linhagens celulares Caski (que contem várias cópias de HPV 16 integrados ao DNA genômico) e Hella (que contem HPV 18 integrado ao seu DNA genômico).

Para minimizar a possibilidade de contaminação externa, as reações eram preparadas em capela de fluxo laminar exposta à luz ultravioleta por aproximadamente 15 minutos, juntamente com todo o material plástico a ser utilizado.

Primer	Sequência (5' - 3') *	Alvo	Amplicons
GP5+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	L1	155
GP6+	GAAAAA TAAACTGTAAATCATATTC		
PGMY11 – A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG	L1	450
PGMY11 – B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG		
PGMY11 – C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG		
PGMY11 – D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG		
PGMY11 – E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG		
PGMY09 – F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC		
PGMY09 – G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC		
PGMY09 – H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC		
PGMY09 – I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC		
PGMY09 – J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC		
PGMY09 – K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC		
PGMY09 – L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC		
PGMY09 – M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC		
PGMY09 – N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC		
PGMY09 – P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC		
PGMY09 – Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC		
PGMY09 – R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC		
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT		

Quadro 4.6.1 - - Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de detecção do DNA de HPV com suas sequências de base, descritos por Gravitt et al.(2000) e Haws et al. (2004).

Para a PCR utilizando os *primers* PGMY, preparou-se uma mistura contendo tampão de reação 1X, 0,2 mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 2 mM de MgCl₂, 1 µM de cada oligonucleotídeos PGMY, 1,25 U de *Taq* Platinum DNA Polimerase, cerca de 100 ng de DNA extraído e água Milli-Q para obter o volume final da reação de 25 µL . Os microtubos contendo os componentes da reação foram colocados em termociclador (modelo Veriti - Life Technologies) e submetidos ao seguinte ciclo térmico de amplificação: uma etapa inicial de 6 min a 95 °C e 40 ciclos constituídos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55 °C e 45 segundos a 72 °C. Após o último ciclo era adicionada uma etapa final de 5 min a 72 °C. Após essa etapa, os tubos são armazenados a – 20 °C até a sua utilização

Nos casos onde não se detectou a presença do DNA viral com os iniciadores PGMY, realizou-se um PCR em ninho (*nested-PCR*), que consiste da amplificação da amostra original com os iniciadores PGMY 09 e PGMY 11 seguida de uma amplificação com os iniciadores internos GP5+/GP6+.

Primeiramente era realizada uma nova reação com os iniciadores PGMY conforme descrito acima. Posteriormente, o produto amplificado derivado desta reação era diluído 50 vezes em água Milli-Q e utilizado como molde para a segunda reação de amplificação com os iniciadores GP5+ e GP6+. Os componentes da solução da reação foram: tampão 1 X (Promega, Madison, EUA), 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP – Promega), 2 mM de MgCl₂, 1 µM de cada

oligonucleotídeo, GP5+ e GP6+, 1,25 U de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega), cerca 2 microlitros do produto de PCR **PGMY09/PGMY11** diluído (1:50). e água Milli-Q para completar o volume final da reação (20 µL). As ciclagens foram as seguintes: 94°C por 5 minutos, seguindo-se de 40 ciclos de 94°C por 40 segundos, 40°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos; e por fim 72°C por 3 minutos. As amostras foram posteriormente conservadas a -20°C. O produto gerado foi de aproximadamente 110 pb.

4.7. Sequenciamento direto para a identificação do tipo de HPV

Os produtos de PCR foram purificados pelo *kit illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Também foi utilizado como opção à utilização do kit comercial, o protocolo de purificação por polietilenoglicol 20% (PEG), conforme descrito por Dunn & Battner (1987).

Para as reações de sequenciamento direto dos produtos de PCR é utilizado o sequenciador 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o *kit Big-Dye Terminator* (Life Technologies). Os cromatogramas das sequências obtidas são primeiramente analisados e editados no software *4peaks* (A. Griespoor and T. Groothuis, *makentosj.com*). Em seguida, as sequências são submetidas ao software online BLASTn (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para a identificação dos tipos de HPVs.

4.8. Identificação de coinfeções por mais de um tipo de HPV

Para a identificação de co-infecções, foram selecionadas amostras que apresentaram picos duplos bem definidos e que fossem observados de forma semelhante em dois ou mais cromatogramas do mesmo fragmento. Após a seleção das amostras, foi utilizado o kit High + Low Pappilomastrip (Operon).

O kit é um teste baseado na técnica hibridização reversa que permite a detecção qualitativa de 37 tipos do vírus HPV em amostras de DNA de raspados ou biópsias cérvico-uterino. No kit estão incluídos sondas para detecção dos seguintes tipos de HPV:

*alto risco: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82 (MM4 e IS39).

* Baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84 e 91.

O protocolo de utilização do kit seguiu de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante que, em resumo, adota as seguintes etapas:

1) Extração de DNA, sendo admitida também a utilização de outros protocolo de extração previamente estabelecido, assim como o realizado no presente estudo com o kit *QiaAMP DNA Mini Kit (Qiagen)*.

2) Amplificação por PCR, na qual incluem-se no kit todos os reagentes necessários para a amplificação das regiões de E6-E7 dos 37 tipo de HPV previstos, sendo cada tipo com primers tipo-específico. Além dos primers para amplificação do DNA viral, o Kit também conta com primers para amplificação dos genes constitutivos *GAPDH* e *β -globina*, atuando como controles de qualidade.

3) Hibridização e revelação, onde nesta etapa os produtos de PCR amplificados são hibridizados contra uma série de sondas específicas para cada um dos tipos de HPV previstos. O kit conta com dois conjuntos de tiras de hibridização, sendo um conjunto contendo as sondas para os HPVs de alto risco e o outro para os de baixo risco. Além das sondas dos HPVs, todas as tiras de ambos os conjuntos possuem uma sonda para o controle da amplificação (*GAPDH* e *β -globina*), uma sonda controle para a revelação e três linhas, uma negra e duas roxas, para o controle da posição correta da tira.

4.9. Identificação das variantes de HPV 16 e HPV 18

Após a identificação dos tipos de HPV presentes, as amostras identificadas com HPV 16 e HPV 18 foram submetidas a um novo protocolo de amplificação por PCR de regiões específicas do genoma viral, capazes de identificar a variante a qual pertence aquele tipo de HPV detectado. Tanto para o HPV 16 quanto para o HPV 18, foram utilizados dois pares de iniciadores, que amplificavam toda a região LCR e o gene *E6*. Cada região teve o seu iniciador desenhado especificamente para o HPV correspondente, conforme o quadro 4.9.1

Quadro 4.9.1 - Oligonucleotídeos utilizados nas identificação dos subtipos de HPV 16 e HPV 18

Primer	Sequencia (5' - 3')	Tm	Ref. Seq	Posição no genoma
LCR F HPV 16	CACCCACCACCTCATCTACC	56°	K02718.1	7100 - 7120
LCR R HPV 16	CACACACCCATGTGCAGTTT	C	HPV16	7835 - 7855
E6 F HPV 16	CACATATTTTTGGCTTGTT	50°		7701 - 7720
E6 R HPV 16	GGAGATACACCTACATTGCATGAA	C		570 - 592
LCR F HPV 18	TCTAAACCTGCCAAGCGTGT	56°	X05015.1	7095 - 7115
LCR R HPV 18	ATGTGATGCCCAACCTATTT	C	HPV18	7825 - 7845
E6 F HPV 18	GTTGCCTTTGGCTTATGTCTG	56°		7468 - 7488
E6 R HPV 18	TTGCCTTTAGGTCCATGCATAC	C		587 - 607

Para as PCRs utilizando os iniciadores específicos para cada região de ambos os tipos de HPV, foi padronizado o mesmo protocolo de reações e ciclagem térmica, com exceção da temperatura de anelamento. O protocolo para as reações de PCR deu-se a seguinte forma: Preparou-se uma mistura contendo tampão 10X (Life Technologies) 0,2 mM de cada dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 1 µM de cada iniciador, 1,25 U de *Taq* Platinum DNA Polimerase (Life Technologies), cerca de 100 ng de DNA extraído e água Milli-Q para completar o volume final da reação (25 µL). Os microtubos contendo os componentes da reação foram colocados em termociclador Veriti (Life Technologies) e submetido ao seguinte ciclo térmico de amplificação: uma etapa inicial de 6 min a 95 °C e 40 ciclos constituídos de: 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a “Tm” específica (quadro 4.9.3) e 1 minuto a 72 °C. E por fim, 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C. Após a etapa final, os tubos foram armazenados a – 20 °C até a sua utilização.

Em seguida a etapa das reações de PCR, os produtos gerados foram submetidos aos mesmos protocolos de purificação e sequenciamento direto para a identificação do tipo de HPV. Entretanto, na etapa do sequenciamento direto, foram utilizados os iniciadores tipo específico para as diferentes regiões genômicas, conforme descrito anteriormente (Quadro 4.8.1) .

4.10. Edição e montagem das sequências e contigs

Na estrutura genômica do HPV, a região LCR e o genes E6 são observados em forma subsequente. Sendo assim, os iniciadores de cada região foram desenhados para que os fragmentos gerados tivessem sobreposição, possibilitando

a montagem de uma sequência consenso de aproximadamente 1.400 pb. Para a montagem da sequência consenso, foi utilizado o software GENEIOUS (Biomatters ltd).

4.11. Identificação de Haplótipos, Linhagens e Análise Filogenética das sequências de HPV 16 e HPV 18

Para a identificação das linhagens de HPV16 e HPV18, foram utilizadas somente as amostras que apresentaram alta qualidade nas sequências obtidas para LCR e E6. Duas estratégias foram empregadas: (1) levando em consideração a presença nucleotídeos específicos em posições de LCR e E6 conforme estabelecido por Cornet et al. (2012) para HPV 16; e para o HPV18 uma estratégia similar, identificando SNVs que permitem a identificação das linhagens proposta por Burk et al., 2013; (2) a partir de análise filogenética das sequências obtidas utilizando sequências representativas das diferentes linhagens e sublinhagens indicadas por Burk et al. (2013). A identificação dos haplótipos foi feita utilizando-se do software DNAsp versão 5 e as análises filogenéticas feitas com o método de Máxima Verossimilhança utilizando o programa PHYML (Guindon e Gascuel, 2003) utilizando o modelo GTR. Os valores de *bootstrap* foram estimados com 10.000 réplicas para avaliar o suporte dos ramos internos. As referências utilizadas foram: K02718 (REF SEQ, linhagem A), AF536179 (linhagem A), HQ644236 (linhagem A), AF534061 (linhagem A), AF536180 (linhagem B), HQ644298 (linhagem B), AF472509 (linhagem C), HQ644257 (linhagem D), AY686579 (linhagem D), e AF402678 (linhagem D) para o HPV16; e AY262282 (REF-SEQ, linhagem A), EF202146 (linhagem A), EF202147 (linhagem A), EF202151 (linhagem A), GQ180787 (linhagem A), EF202152 (linhagem B), EF202155 (linhagem B), KC470225 (linhagem B), e KC470229 (linhagem C) para o HPV18.

A rede de haplótipos foi construída utilizando-se do software NETWORK 4.6.1.1 (Bandelt et al., 1999) e as sequências obtidas a partir das nossas amostras. Os índices de diversidade molecular (diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica) e o testeFs de Fu (1997) para neutralidade seletiva foram obtidas utilizando-se o software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2011)

4.12. **Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Prism 6.0, aplicando os testes de normalidade D'Agostino-Pearson e os testes não-paramétricos Kuskal Wallis e Qui-Quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Caracterização da população do estudo

A população do estudo foi composta por 594 mulheres diagnosticadas com câncer cervical invasivo atendidas no Serviço de Ginecologia do Hospital do Câncer II do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. O período de coleta das amostras iniciou-se em junho de 2011, sendo finalizado em março de 2014. Previamente a cada coleta de biópsias, as pacientes eram submetidas a um questionário epidemiológico (Apêndice X) para a coleta de dados sociodemográficos e história reprodutiva (tabela 5.1.1).

Do total de mulheres, 377 (63,5%) residem fora do município do Rio de Janeiro. Com relação à faixa etária, 434 (73,1%) apresentavam idades acima dos 39 anos. Já a situação conjugal, 341 (57,4%) eram casadas ou possuíam união consensual. Grande parte da população foi composta por mulheres que se autodeclararam com a cor da pele negra ou parda (394 ou 66,3%) e 338 (56,9%) possuíam baixa escolaridade (igual ou inferior a 7 anos de estudo). Já a renda *per capita* das famílias de 385 mulheres (74,8%) era de até um salário-mínimo. Em relação a história reprodutiva, 453 mulheres (78,8%) iniciaram sua vida sexual antes dos 18 anos e 354 (63,2%) relataram de 2 ou mais parceiros ao longo da vida. Quanto ao exame preventivo, ~40% das mulheres (237) desconheciam o propósito do exame Papanicolau, sendo que, previamente ao diagnóstico do câncer do colo uterino, 331 mulheres nunca haviam sido submetidas ao exame ou se submetiam em intervalos irregulares de 3 anos ou mais (Tabela 5.1.1).

Tabela 5.1.1- Dados sociodemográficos e história reprodutiva da população do estudo

Características sócio-demográficas e história reprodutiva	Pacientes incluídas	
	N=594	(%)
Local de residência		
Município do Rio de Janeiro	217	36,50%
Rio de Janeiro – outros municípios	377	63,50%
Idade		
19 a 39 anos	160	26,90%
40 a 49 anos	165	27,80%
50 a 64 anos	192	32,30%
65 ou mais	77	13%
Anos de estudo		
Nenhum	43	7,20%
1 a 3	115	19,40%
4 a 7	180	30,30%
8 a 10	134	22,60%
11 ou mais	122	20,50%
Situação Conjugal		
Solteira	47	7,90%
Casada/União consensual	341	57,40%
Divorciada / separada	123	20,70%
Viúva	83	14,00%
Religião		
Sem religião	32	5,40%
Católico	281	47,30%
Evangélico	250	42,10%
Outras	31	5,20%
Raça/Cor da pele		
Branca	198	33,30%
Parda	315	53,00%
Negra	79	13,30%
Outras	2	0,3%
Atividade Remunerada		
Não	358	60,30%
Sim	236	39,70%
Renda per Capita (em salários mínimos)*		
Até 1/2 sm	210 (40,0)	40,00%
Acima de 1/2 até 1 sm	175 (34,8)	34,80%
Mais de 1 sm	127 (25,2)	25,20%

*82 pacientes sem informação

Tabela 5.1.1- Dados sociodemográficos e história reprodutiva da população do estudo (cont.)

Características sócio-demográficas e história reprodutiva	Pacientes incluídas	
	N = 594	(%)
Idade de início da atividade sexual*		
8 a 15	165	28,70%
16 a 18	288	50,10%
19 ou mais	122	21,20%
Número de parceiros**		
Até 2	206	36,80%
3 a 5	255	45,50%
Acima de 5	99	17,70%
Número de partos***		
Nenhum	11	1,90%
1 a 2	234	41,30%
3 a 4	190	33,50%
5 a 6	85	15%
7 ou mais	47	8,30%
Conhecimento sobre o propósito do exame preventivo		
Sim	357	60,10%
Não	237	39,90%
Realização de exame preventivo antes do diagnóstico		
Sim	480	80,80%
Não	114	19,20%
Frequência de realização do exame preventivo****		
Nunca foi submetida	114	19,20%
Anualmente	214	36,10%
De 2 em 2 anos	48	8,10%
De 3 em 3 anos	7	1,20%
Intervalos maior que 3 anos ou irregulares	210	35,40%
Tabagismo		
Atual	114	19,20%
Ex-fumante	209	35,20%
Nunca fumante	271	45,60%

*19 pacientes sem informação; **34 pacientes sem informação; ***47 pacientes sem informação; ****1 paciente sem informação

5.2. Identificação dos tipos de HPV

Do total de 594 biópsias coletadas, foram identificadas: 370 amostras (63%) com HPV 16; 77 amostras (13,8%) com HPV 18; 33 amostras (6,1%) com HPV 45; 12 amostras (2,3%) HPV 35; 11 amostras (1,9%) com HPV 58; 8 amostras (1,5%) HPV 73 e com HPV52, respectivamente; 7 amostras (1,2%) com HPV31 e HPV33, respectivamente; 6 amostras (1%) com HPV 59 e HPV 39, respectivamente; duas amostras (0,4%) com HPV 26, HPV 51, HPV 56 e HPV 68, respectivamente e, por fim, 1 amostra (0,16%) com HPV 83. Em 20 amostras (3,3%), foram observadas coinfeções com mais de um tipo de HPV, em 16 amostras (2,6%) não foi possível a identificação do tipo de HPV presente e em 4 amostras (0,8%) não foi possível a detecção do DNA viral pelo método empregado (figura 5.2.1.)

Os HPV 16 e HPV 18 estavam presentes em 80% das biópsias analisadas. Cerca de 98,1% das biópsias possuíam HPV considerados de alto-risco (HPV 16; HPV 18; HPV 45; HPV 35; HPV 31; HPV 58; HPV 59; HPV 52; HPV 33; HPV 39; HPV 51; HPV 68; HPV 83) enquanto 1,9% possuíam HPV (HPV 26 e HPV 73) considerados de risco indeterminado, e em nenhuma biópsia foi encontrado a presença de HPV de baixo risco de forma isolada, somente quando co-infectadas com outro tipo de alto risco (tabela 5.3.1)

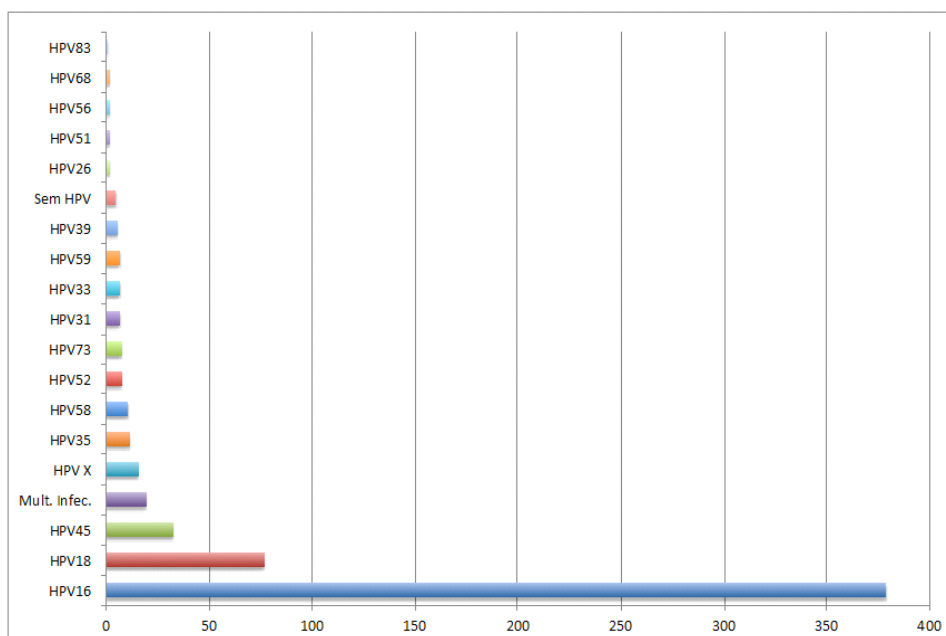


Figura 5.2.1 - - Prevalência dos diferentes tipos de HPV encontrados nas 594 amostras.

5.3. Coinfecções por diferentes tipos de HPV

Foram selecionadas 27 amostras com suspeita de múltipla infecção por mais de um tipo de HPV presente. Esta seleção foi feita através da análise individual de dois ou mais eletroferogramas de uma mesma amostra, que apresentaram um padrão de sobreposição de picos sugestivos para coinfecção. As amostras selecionadas foram submetidas ao protocolo de hibridização reversa com o Kit *PappilomaStrip High + Low* (Operon). Do total testado, em 20 amostras foram confirmadas a presença de dois ou mais tipos de HPV (Tabela 5.3.1). Destas, 19 amostras apresentavam o HPV16 como um dos tipos presentes e em 3 amostras observou-se a presença de algum HPV de baixo risco, sempre em coinfecção com algum HPV de alto risco.

Tabela 5.3.1 – Amostras com coinfecção detectada com o Kit PappilomaStrip High + Low.

Tipos de HPVs identificados nas múltiplas infecções	N
HPV16, HPV18	4
HPV16, HPV45	2
HPV16, HPV39	1
HPV16, HPV42*	1
HPV16, HPV18, HPV31	1
HPV31, HPV35, HPV39	1
HPV16, HPV18, HPV45	1
HPV16, HPV18, HPV52	1
HPV16, HPV18, HPV31, HPV33	1
HPV16, HPV18, HPV33, HPV45	1
HPV16, HPV18, HPV33, HPV54*	1
HPV16, HPV18, HPV54, HPV61*	1
HPV16, HPV45, HPV58, HPV54	1
HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV39	1
HPV16, HPV31, HPV33, HPV39, HPV68	1
HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52	1

* HPV de baixo risco

5.4. Tipos histológicos dos tumores x Tipo de HPV

A revisão histopatológica dos tumores, os tumores foram classificados majoritariamente entre os dois principais tipos histológicos relacionados a carcinogênese cervical: Os carcinomas de células escamosas (CCE), com o total de 454 biópsias (76,4%) e os Adenocarcinomas (ADN), correspondendo a 80 amostras (13,4%). Em 2 amostras, não foi possível a classificação definitiva. Os tipos tumorais menos prevalentes, que totalizaram 58 amostras (9,7%), foram agrupados em um único grupo. As informações detalhadas acerca deste grupo de amostras estão detalhadas em forma de apêndice ao presente trabalho.

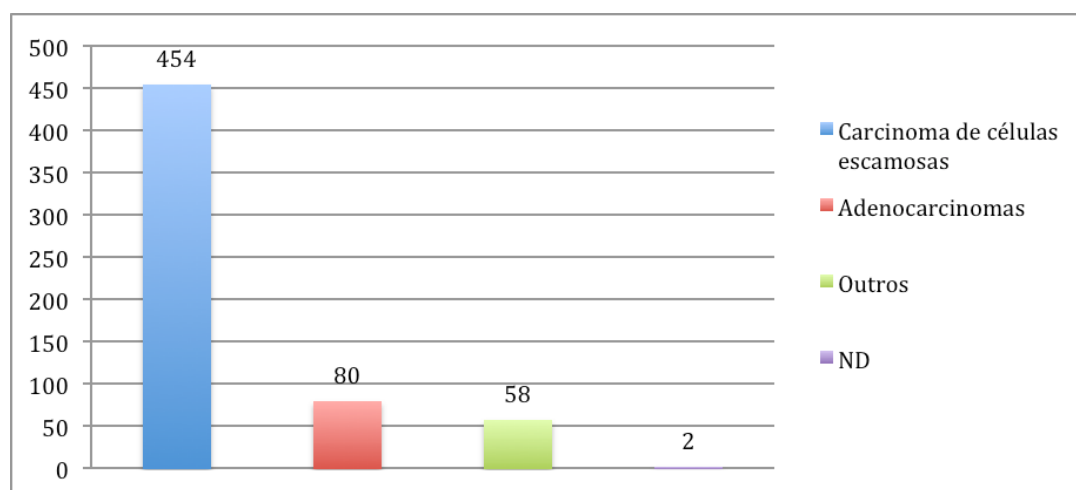


Figura 5.4.1 - Os tipos de tumores biopsiados, de acordo com a revisão histopatológica. A classificação foi dividida entre os dois tipos mais frequentes e os menos frequentes foram agrupados em um único grupo (outros).

Foram avaliadas as distribuições dos CCE X ADN em relação aos tipos de HPV identificados (tabela 5.4.1). Quando comparados os dois tipos mais prevalentes, HPV 16 e HPV 18, do total de 454 carcinomas de células escamosas, 294 amostras estavam infectadas com HPV 16 e 39 com HPV 18. Já com relação aos 80 adenocarcinomas biopsiados, em 45 amostras foi identificada a presença do HPV 16 e em 22 amostras o HPV18. Quando comparados, observou-se uma associação entre a presença do HPV 18 e Adenocarcinomas ($p=0,001$ - tabela 5.4.2). Para os demais tipos não foram observadas quaisquer associações com o tipo histológico tumoral.

Tabela 5.4.1 - Frequência dos tipos de HPV de acordo com o tipo histológico dos tumores

Tipo de HPV	Total	CCE (%)	ADC (%)	Outros (%)	ND#%
16	370	294 (79,6)	45 (11,9)	30 (7,4)	1 (1,1)
18	77	39 (52,5)	22 (27,5)	15 (15,0)	1 (5,0)
26	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
31	7	7 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
33	7	7 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
35	12	9 (75,0)	2 (16,7)	1 (8,3)	0 (0,0)
39	6	5 (83,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)
45	33	24 (72,7)	6 (18,2)	3 (9,1)	0 (0,0)
51	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
52	8	8 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
56	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
58	11	11 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
59	6	4 (66,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)
68	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
73	8	7 (87,5)	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)
83	1	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
X***	16	11 (68,8)	1 (6,3)	2 (12,5)	2 (12,5)
Múltipla Infecção	20	16 (66,7)	2 (22,2)	2 (11,1)	0 (0,0)
NI****	4	3 (75,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	594	454	80	58	

Em seguida, devido ao baixo número de amostras infectadas com cada um dos demais tipos de HPV, optamos por realizar uma análise comparativa entre os tipos histológicos e espécies de HPV, agrupando as amostras entre a espécie $\alpha 7$ (que inclui os HPVs de alto risco dos tipos HPV 18; HPV 68; HPV 39; HPV 70; HPV 85; HPV 59; HPV 45 e HPV 97), e a espécie $\alpha 9$ (incluindo os HPVs de alto risco dos tipos HPV 16; HPV 35; HPV 31; HPV 52; HPV 67; HPV 33; HPV 58). Também foi observada uma relação entre a presença de algum tipo da espécie $\alpha 7$ e o desenvolvimento de adenocarcinoma.

Tabela 5.4.2 – Distribuição dos tipos histológicos entre os tipos HPV 16 e HPV 18 e entre as espécies $\alpha 7$ e $\alpha 9$.

Tipo Histológico	HPV16	HPV18	Espécie $\alpha 7$	Espécie $\alpha 9$
CCE	294 (87%)	39 (64%)	74 (72%)	336 (87%)
ADN	45 (13%)	22 (36%)	29 (28%)	47 (13%)
Total	339 (100%)	61 (100%)	103 (100%)	383 (100%)
			p<0.001	p<0.001

Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre as características da população e os tipos de HPV presentes no estudo. A distribuição das idades não foi normal (p 0,004) segundo o teste de normalidade D'Agostino-Pearson (D'Agostino; Pearson, 1973). O gráfico de distribuição das idades apresentou pico único, com a idade média das pacientes em 48 anos (figura 5.4.2).

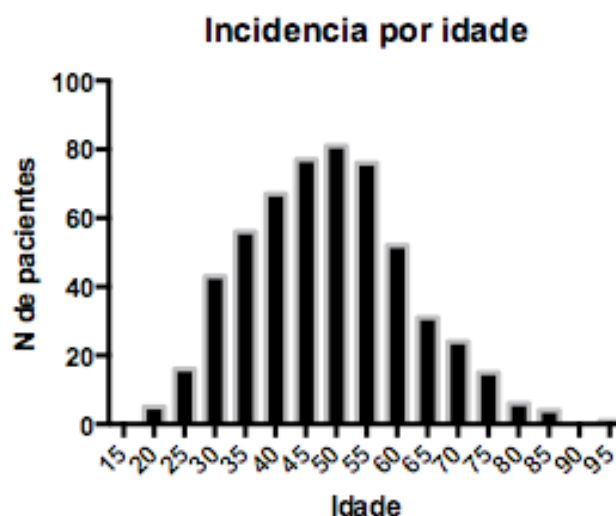


Figura 5.4.2 - Distribuição do número de pacientes de acordo com faixa etária. O intervalo apresentado é de 5 anos, com as idades variando entre 19 anos e 93 anos.

Já quando comparados os 5 tipos de HPV mais frequentes (HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 35 e HPV 58) segundo a idade das pacientes, observou-se que a média de idade maior no grupo com HPV 58. Esse valor foi, em sua maioria, estatisticamente significativo quando comparado à faixa etária das mulheres com os outros HPV(tabela 5.4.3), exceto para HPV35.

Tabela 5.4.3 – Relação entre os 5 tipos de HPV mais frequentes e a idade media das pacientes.

Tipo de HPV	N amostra	Media de idade	Comparação entre HPV58 X outros HPV
HPV58	11	58,45	
HPV16	370	48,71	p = 0,0152*
HPV18	77	46,71	p = 0,0045*
HPV35	12	47,75	p - 0,11138
HPV45	33	48,48	p = 0,0406*
* significativo			

5.5. Variantes de HPV 16

Para a identificação de variantes de HPV 16, um total de 1310 pares de base do genoma do HPV16 foram sequenciados a partir de dois produtos de PCR que sofrem sobreposição (dos nucleotídeos 7157-559), correspondentes à região de *LCR* e *E6*. Das 370 amostras identificadas como HPV16+, em 334 amostras as sequências das regiões *E6* e *LCR* foram completamente ou parcialmente obtidas.

Em duas amostras foi identificada a coinfeção por duas linhagens de HPV16 (figura 5.5.1) e em 34 amostras, a amplificação por PCR foi insatisfatória para um ou ambos os fragmentos. Como consequência, 36 amostras (11,6%) foram excluídas das análises subsequentes de variantes.

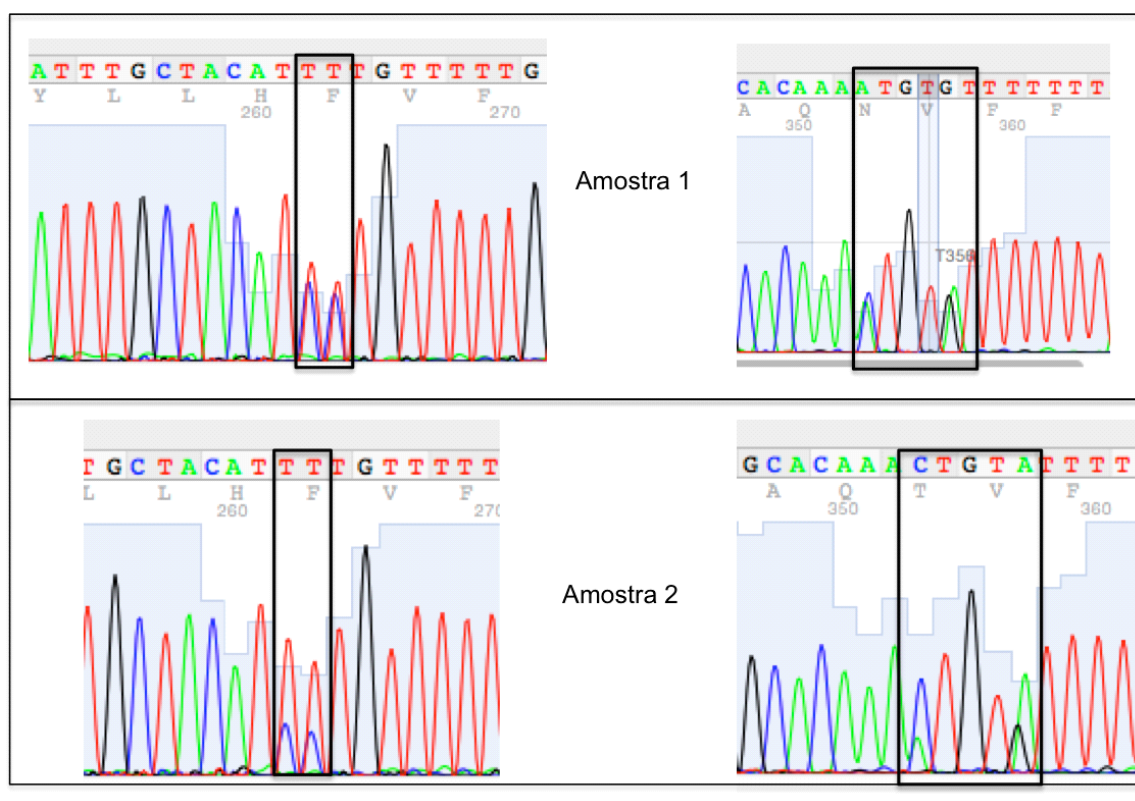


Figura 5.5.1 - Coinfeção de variantes de HPV16. A análise dos cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento da região LCR de duas amostras distintas. Em ambas, foram observadas as mesmas sobreposições de picos em SNVs específicos para a linhagem A (7489G) e D (A7485C;G7489A). A figura mostra dois exemplos das sobreposições, dentre outras observadas ao longo da sequência obtida.

5.5.1. Identificação dos Haplótipos compartilhados

Para identificar as pacientes que compartilham haplótipos de HPV16, foram analisadas 314 das 334 amostras. As sequências de 20 pacientes foram excluídas da caracterização de haplótipos devido à baixa qualidade nos eletroferogramas obtidos nas extremidades da LCR e/ou E6. Foram identificados 125 haplótipos, (tabela 5.5.1), sendo 96 presentes em pacientes únicos, e 29 variantes compartilhados por, pelo menos, dois pacientes. Os quatro haplótipos mais frequentes, presentes em cerca de 40% das amostras foram: Hap09 presentes em 68 pacientes, seguido por Hap11 em 40 pacientes, Hap47 em 12 pacientes, e Hap04 em 11 pacientes.

Tabela 5.5.1 - Os 125 haplótipos identificados a partir do alinhamento das sequências de LCR/E6 de 314 mulheres identificadas com HPV16 e o número de pacientes (N) que possui cada haplótipo.

Haplótipo	N	Haplótipo	N	Haplótipo	N	Haplótipo	N	Haplótipo	N
Hap 01	5	Hap26	1	Hap51	1	Hap76	1	Hap101	1
Hap 02	5	Hap27	1	Hap52	5	Hap77	1	Hap102	1
Hap 03	4	Hap28	4	Hap53	1	Hap78	1	Hap103	1
Hap 04	11	Hap29	1	Hap54	1	Hap79	1	Hap104	2
Hap 05	3	Hap30	1	Hap55	1	Hap80	1	Hap105	1
Hap 06	1	Hap31	1	Hap56	2	Hap81	1	Hap106	1
Hap 07	6	Hap32	8	Hap57	1	Hap82	1	Hap107	1
Hap 08	1	Hap33	1	Hap58	1	Hap83	1	Hap108	1
Hap 09	68	Hap34	1	Hap59	1	Hap84	1	Hap109	1
Hap 10	3	Hap35	1	Hap60	1	Hap85	4	Hap110	1
Hap 11	40	Hap36	2	Hap61	1	Hap86	3	Hap111	1
Hap 12	4	Hap37	1	Hap62	2	Hap87	2	Hap112	1
Hap 13	1	Hap38	2	Hap63	1	Hap88	1	Hap113	1
Hap 14	1	Hap39	1	Hap64	1	Hap89	1	Hap114	1
Hap 15	1	Hap40	3	Hap65	1	Hap90	1	Hap115	1
Hap 16	1	Hap41	1	Hap66	1	Hap91	1	Hap116	1
Hap 17	1	Hap42	1	Hap67	2	Hap92	1	Hap117	1
Hap 18	1	Hap43	3	Hap68	1	Hap93	1	Hap118	1
Hap 19	1	Hap44	1	Hap69	2	Hap94	1	Hap119	1
Hap 20	1	Hap45	3	Hap70	1	Hap95	1	Hap120	1
Hap 21	5	Hap46	1	Hap71	1	Hap96	1	Hap121	1
Hap 22	3	Hap47	12	Hap72	1	Hap97	1	Hap122	1
Hap 23	1	Hap48	1	Hap73	1	Hap98	1	Hap123	1
Hap 24	1	Hap49	1	Hap74	1	Hap99	1	Hap124	1
Hap 25	1	Hap50	1	Hap75	1	Hap100	1	Hap125	1

5.5.2. Análise de SNVs específicos para as linhagens de HPV16

Utilizando a metodologia SNVs proposta por Cornet et al. (2012) para HPV 16, todas as 334 amostras puderam ser classificadas. Sendo assim, mesmo as sequências que foram excluídas da análise de haplótipos por apresentarem baixa qualidade nas extremidades dos eletroferogramas, continham todas as posições dos SNVs propostos no estudo para identificação dos subtipos de HPV 16.

Do total de 334 amostras, 306 amostras apresentaram concordância total com pelo menos um dos nove padrões de assinaturas propostos por Cornet et al. (2012). Para 28 amostras, os nucleotídeos presentes nas 42 posições genômicas propostas não concordaram estritamente com qualquer assinatura de nucleotídeos proposto, com um número mínimo de discordância variando de 1/42 a 4/42 posições (Quadro 5.5.2). Apesar destas divergências, as 334 amostras puderam ser classificadas em uma das quatro grandes linhagens HPV16, baseados nos nucleotídeos presentes nas posições de diagnóstico ou na concordância parcial com umas das nove assinaturas. A linhagem mais frequente observada foi a linhagem A, com 216 amostras, seguida pela linhagem D, com 98 amostras a linhagem B e C, com 10 amostras cada, respectivamente.

Quadro 5.5.2. - Padrão aos SNVs para identificação das variantes de HPV 16 para LCR e E6, proposta por Cornet et al. (2012) comparado aos haplótipos que apresentaram discordâncias (entre 1/42 e 4/42) em relação ao modelo proposto. As discordâncias estão marcadas em cinza.

		HPV16																								HPV18																																															
Linhaagem		Sublinhaagem N° acesso																								Posição NUCLEOTIDICA EM LCR																								Posição NUCLEOTIDICA EM E6																							
		A1	A2	A3	A4	B1	B2	C	D1	D2	D3																																																														
		7175	7177	7201	7232	7233	7270	7287	7339	7394	7395	7435	7485	7489	7507	7669	7689	7729	7730	7743	7764	7786	7826	7834	7837	7839	7876	7886	24	31	83	109	131	132	143	145	178	286	289	335	350	403	532																														
A		A1	K02/18	A	T	T	A	A	C	A	C	C	G	A	G	A	C	C	A	A	T	C	C	G	G	A	A	C	C	C	C	A	T	A	G	C	G	T	T	A	C	T	A	A																													
A		A2	AE556179																																																																						
A		A3	HQ644256																																																																						
A		A4	AE554061	C	C	C				T	C																																																														
B		B1	AE556180																																																																						
B		B2	HQ644258																																																																						
C		C	AE472509																																																																						
C		D1	HQ644257																																																																						
D		D2	AV686579																																																																						
D		D3	AE406578																																																																						
Linhaagem		Haplotipos N amostras		LCR																								E6																																													
Hap35		1																																																																							
Hap92		1																																																																							
Hap99		1																																																																							
A		Hap61	1																																																																						
A		Hap111	1																																																																						
A		Hap27	1																																																																						
A		Hap107	1																																																																						
B/C		Hap80	1																																																																						
B/C		Hap71	1																																																																						
B/C		Hap114	1																																																																						
B/C		Hap106	1																																																																						
B/C		Hap57	1																																																																						
B/C		Hap113	1																																																																						
B/C		Hap70	1																																																																						
B/C		Hap87	2																																																																						
B/C		Hap19	1																																																																						
B/C		Hap60	1																																																																						
D		Hap69	2																																																																						
D		Hap66	1																																																																						
D		Hap79	1																																																																						
D		Hap14	1																																																																						
D		Hap30	1																																																																						
D		Hap65	1																																																																						
D		Hap73	1																																																																						
D		Hap100	1																																																																						
D		Hap38	1																																																																						

5.5.3. Análise filogenética e rede de haplótipos

Para a construção da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança dos 125 haplótipos identificados, foram incluídas as sequências de referência de cada uma das variantes, descritas por Burk et al. (2013). Os resultados deram que a grande maioria dos haplótipos agruparam de acordo com a identidade de linhagem com base em assinatura (SNVs) proposto por Cornet et al. (2014). As exceções foram os haplótipos alocados nas linhagens B e C. Estes Haplotipos formaram dois grupos monofiléticos c (Figura 5.5.3.1).

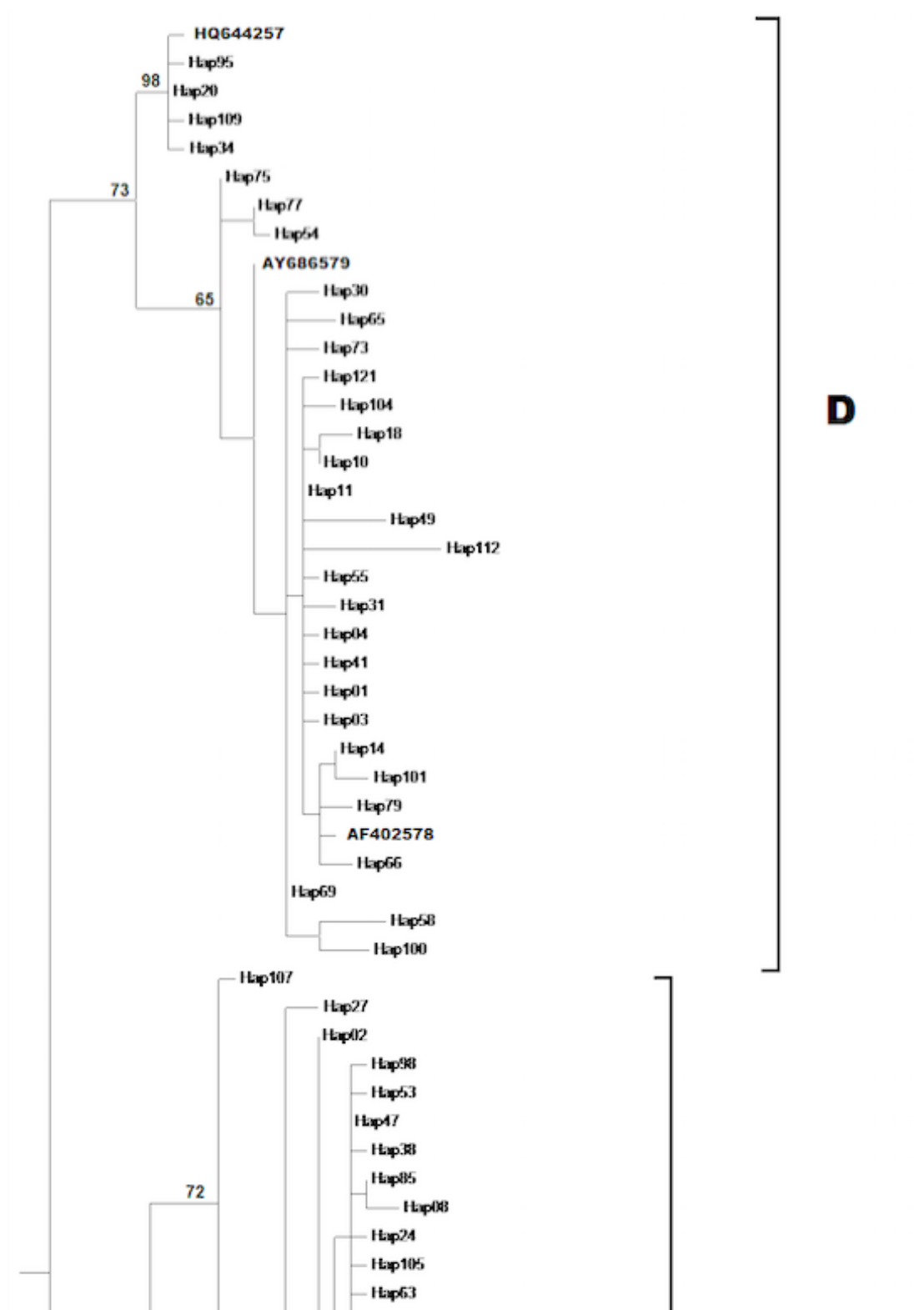


Figura 5.5.3.1 Análise filogenética do HPV16. Árvore de Máxima Verossimilhança (parte1). Os valores de *bootstrap* obtidos a partir de 10.000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* com frequência acima de 50%. As sequências referência das variantes do HPV-16 estão identificadas com o número de acesso do genebank.

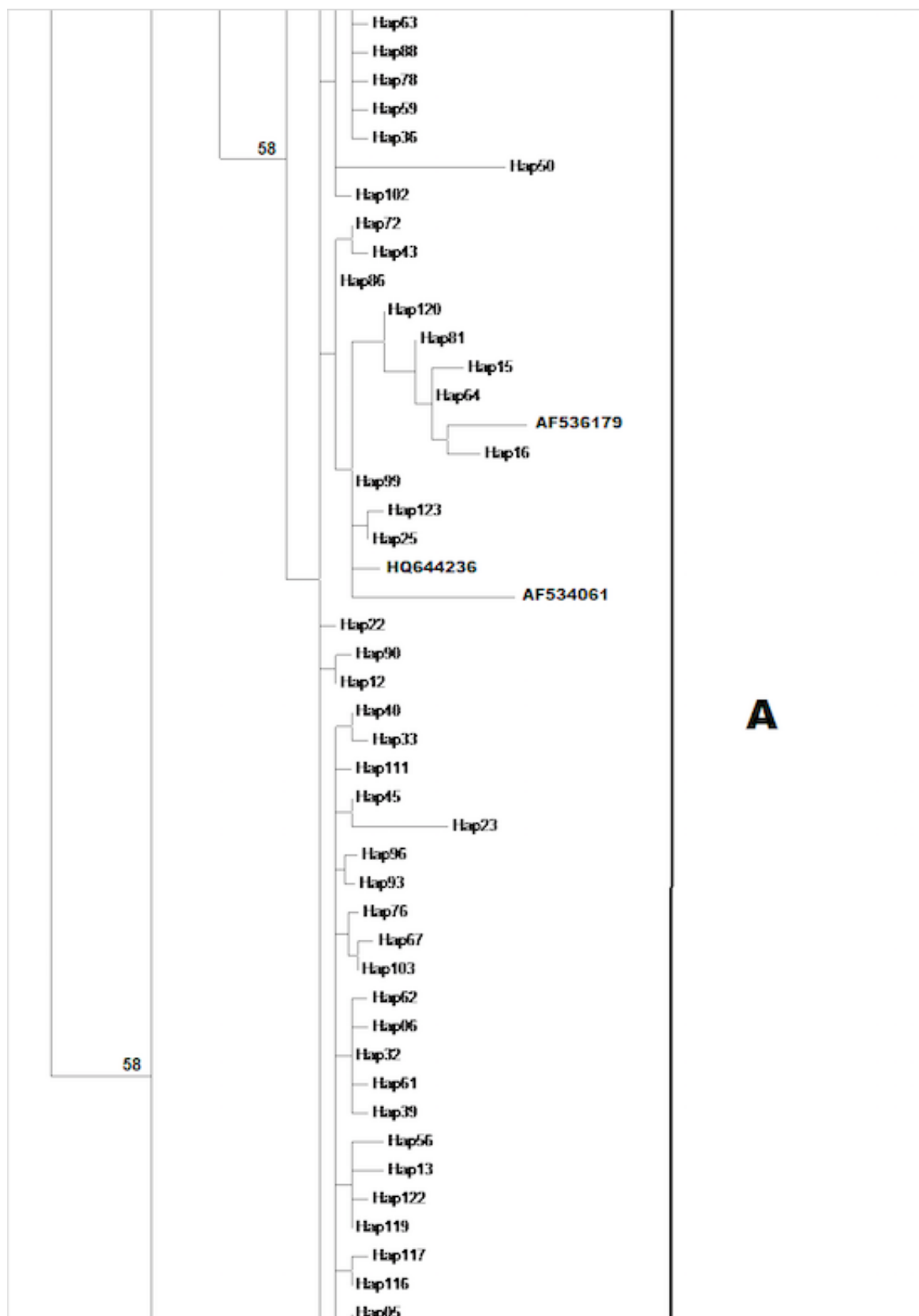


Figura 5.5.3.1 Análise filogenética do HPV16. Árvore de Máxima Verossimilhança (parte2 - continuação)

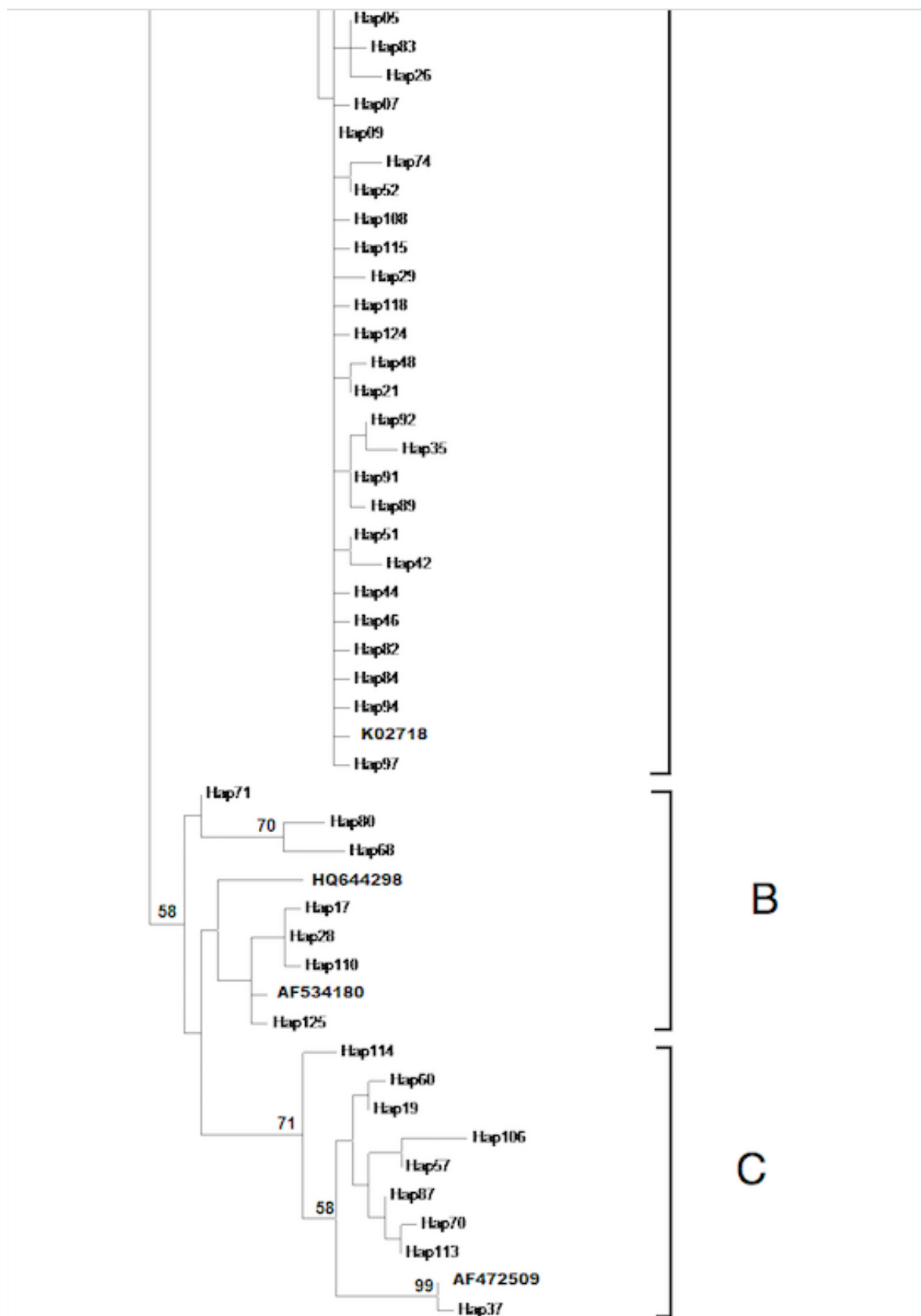


Figura 5.5.3.1 - Análise filogenética do HPV16. Árvore de Máxima Verossimilhança (parte 3 – final)

As análises em rede de Haplótipos também foram de acordo com a topologia da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança e no agrupamento a partir das assinaturas dos SNVs para identificação de cada linhagem. A rede de haplótipos mostra que os três haplótipos mais frequentes ocuparam uma posição central (padrão de estrela) na linhagem A (Hap09 e Hap47) e na linhagem D (Hap11). Em relação aos outros haplótipos menos frequentes, a maioria encontrou-se divergente destes haplótipos centrais por uma e duas substituições de nucleotídeos. O padrão de estrela não foi observado para os haplótipos de Linhagens B e C, que apresentaram uma divergência maior entre os haplótipos. Os índices de diversidade molecular (diversidade de haplótipos, diversidade de nucleotídeos) e o teste F_s (Fu's F_s test; Fu, 1997) são mostrados na Tabela 5.5.3.1, sugerindo expansão da população viral ou seleção positiva para estes haplótipos específicos.

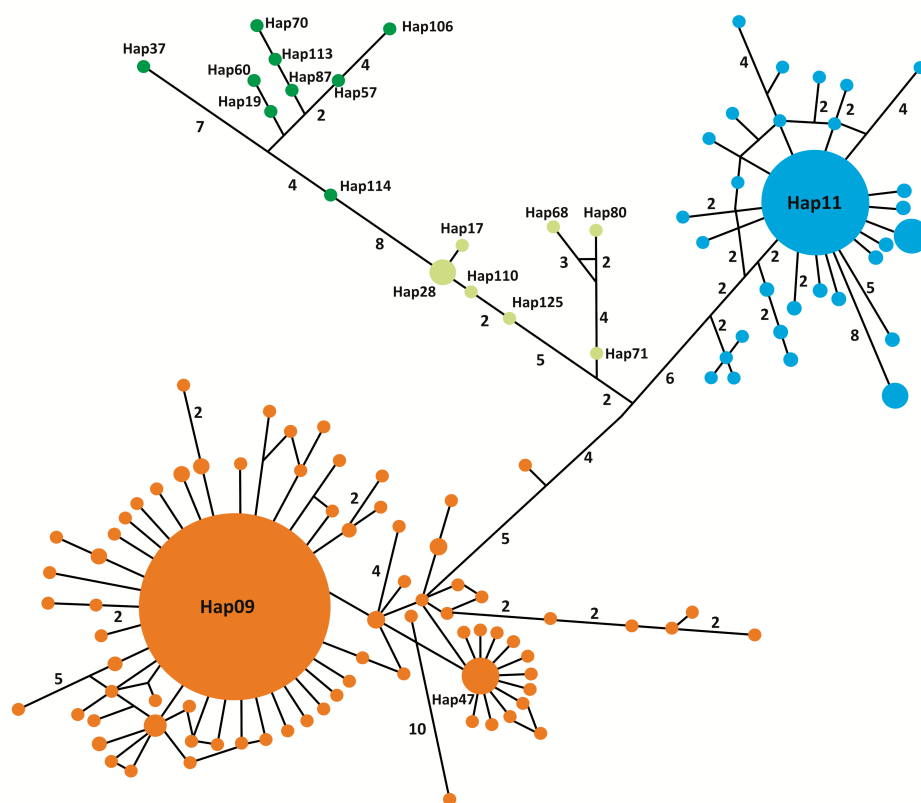


Figura 5.5.3.2- Análise em rede dos 125 haplótipos de HPV16. As linhagens são indicadas por cores: em laranja a linhagem A, em verde escuro a linhagem B, verde claro a linhagem C e em azul a linhagem D. Cada círculo corresponde a um dos 125 haplótipos e o diâmetro de cada círculo é proporcional ao número de amostras que compartilham um haplótipo específico; as linhas que ligam cada círculo representam pelo menos uma substituição de nucleotídeos e quando ocorre mais do que uma substituição, é indicado por um número (que corresponde ao número de substituições). Os três haplótipos mais frequentes são indicados: Hap09 ($n = 68$), Hap40 ($n = 40$), e Hap47 ($n = 12$). Também são indicados os haplótipos das linhagens B e C.

Tabela 5.5.3.1 - Índice de diversidade molecular para o HPV16

Número de amostras	314	
Número de haplótipos	125	
Diversidade de haplótipos	0.932	
Diversidade de Nucleotídeos	0.084	
Fu's Fs Test	-23.86	(p= 0.004)

As sequência de aminoácidos E6 mostrou 19 alterações de aminoácidos em relação à sequência do protótipo, sendo sete destas anteriormente descritas. As doze novas alterações foram: D25G, D25A, E29A, D56Y, D64N, S71C, D98H, H126P, N127K, R131L, S138F, e R144T. A variante 83V (L83V, equivalente a E6 T350G) foi compartilhada por todos os haplótipos de linhagem D em 31 haplótipos (14%) da linhagem A.

Quadro 5.5.3.2 – Substituições de aminoácidos encontradas na proteína E6 em HPV16. Na tabela somente estão representados os haplótipos que sofreram alguma substituição de aminoácido.

Linhagem	Numero de acesso A1K02718	Posição do aminoacido em E6															
		10 R	14 Q	25 D	27 I	29 E	56 D	64 D	71 S	78 H	83 L	98 D	126 H	127 R	138 S	144 R	
A	Hap74	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap35	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
	Hap23	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap33	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap40	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap78	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	L	.	.	.	
	Hap08	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap85	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap38	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap47	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap36	.	.	.	.	A	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap59	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap105	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	Q	.	.	.	.	
	Hap88	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap63	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap24	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap98	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap53	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap102	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap50	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	
	Hap81	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap15	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap64	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Hap16	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	604	G	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
	300	G	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
	201	G	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
	435	G	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
B	Hap68	T	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap80	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap71	.	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap125	T	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap17	T	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap28	T	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap110	T	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
C	Hap114	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap106	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap57	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap113	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap70	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap87	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap19	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap60	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
	Hap37	I	D	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
D	Hap11	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap55	.	H	.	.	.	Y	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap31	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap79	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap101	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap14	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap121	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap10	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap18	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	F	.	
	Hap30	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap65	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap73	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap100	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap58	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap20	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap109	.	H	G	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap95	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	Hap34	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	377	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	330	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	391	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	507	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	336	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	407	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	
	80	.	H	.	.	.	.	.	.	Y	V	.	.	.	.	.	

5.6. As linhagens de HPV 18

Para a identificação das linhagens de HPV18, utilizou-se uma estratégia semelhante à utilizada para as amostras HPV16. A partir do DNA genômico das amostras identificadas como HPV18, foram feitas amplificações por PCR e o sequenciamento direto de dois fragmentos que sofrem sobreposição parcial, possibilitando a montagem de uma sequência consenso de 1298 pares de base, correspondendo a região *LCR* e ao oncogene *E6* do genoma do HPV18. Das 77 amostras inicialmente identificadas como HPV18, seis (7,7%) foram excluídas da análise das linhagens devido à amplificação insatisfatória de um ou ambos os fragmentos.

5.6.1. Identificação de haplótipos compartilhados

Para as 71 amostras analisadas, foram identificados 33 haplótipos, sendo 15 encontrados em pelo menos duas mulheres (totalizando 53 pacientes) e 18 haplótipos únicos. O haplótipo mais frequente foi o Hap22 (identificado como pertencente a linhagem A) encontrado em 10 pacientes, seguido por Hap12 (linhagem A) e Hap33 (linhagem B), ambos observados em seis pacientes, respectivamente. Estes três haplótipos estavam presentes em cerca de 31% dos pacientes.

Tabela 5.6.1.1 – Número de biópsias que possuem um dos 33 haplótipos identificados de HPV 18. Número de biópsias que contem cada um dos 29 haplótipos identificados nas 57 amostras que apresentavam HPV 18.

Haplótipo	N	Haplótipo	N
Hap 3	2	Hap 22	10
Hap 4	1	Hap 23	1
Hap 5	1	Hap 24	2
Hap 6	1	Hap 25	1
Hap 7	1	Hap 26	1
Hap 8	1	Hap 27	2
Hap 9	1	Hap 28	1
Hap 12	6	Hap 29	1
Hap 13	3	Hap 30	1
Hap 14	1	Hap 31	1
Hap 15	2	Hap 33	6
Hap 16	3	Hap 34	2
Hap 17	3	Hap 35	2
Hap 18	1	Hap 36	3
Hap 19	2	Hap 37	1
Hap 20	1	Hap 38	1
Hap 21	5		

5.6.2. Análise de SNVs específicos para os subtipos de HPV 18

Para a identificação das linhagens de HPV 18, foi utilizada uma metodologia semelhante à utilizada para as análises de SNVs para HPV 16, através da análise de sítios específicos situados na região *LCR* e no gene *E6*. O método foi baseado nos trabalhos de Arias-Pulido et al. (2005) e Arroyo et al. (2012) em que são descritos polimorfismo presentes em determinadas regiões do genoma do HPV 18, capazes de definir entre as diferentes linhagens. Foram identificados 55 amostras pertencentes à linhagem A e 16 amostras pertencentes à linhagem B. Nenhuma amostra foi classificada como pertencente a linhagem C

As linhagens A e B foram definidas pela presença de um conjunto de nove SNVs em *LCR* (A7152G, C7161T, C7164G, C7185T, C7496G; G7512A; T7530C; T7651C e T7704C) e três SNVs em *E6* (T251C; G374A e A548G). Além disso, uma deleção de 6 nucleotídeos (244-250) em *LCR* e os SNVs G7563G; A7567C; 7592C e A7670T foram observadas de forma exclusiva para a linhagem B nas amostras analisadas. Contudo, estas variações são observadas em algumas sequências de referência utilizadas para a linhagem A e C.

Quadro 5.6.2.1 - Classificação quanto a sublinhagem de HPV 18 baseada SNVs distintos em E6 e LCR. Os pontos significam que não existem variação quando comparad sequencia referência.

Linhagem			Sublinhagem		genebank		LCR NUCLEOTIDE POSITION																				E6 NUCLEOTIDE POSITION					
					7152	7156	7161	7164	7185	7245	7246	7247	7248	7249	7250	7251	7323	7496	7512	7530	7643	7651	7658	7704	7726	7730	45	92	251	266	374	548
A	A1	REFAN262282	A	A	C	C	C	C	G	T	A	T	G	T	T	T	A	C	G	T	T	T	A	T	C	C	G	A	T	G	G	A
	A2	EF202146	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	A3	EF202147	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	A4	EF202151	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B	A5	GO180787	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	B1	EF202155	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	G	C	C	A	A	G
	B2	KC470225	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	G	C	C	A	A	G
C	B3	EF202152	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	.	G	A	C	.	C	.	C	T	A	G	C	C	A	A	G
	Haplotypes	OV39775	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A	Hap3	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap4	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap5	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap6	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap7	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap8	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap9	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap12	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap13	3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap14	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap15	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap16	3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap17	3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap18	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap19	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap20	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap21	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap22	10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap23	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap24	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap25	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap26	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap27	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap28	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap29	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Hap30	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	B	Hap31	1	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A
Hap33		6	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A	G
Hap34		2	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A	G
Hap35		2	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A	G
Hap36		3	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A	G
Hap37		1	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A	G
Hap38		1	G	G	T	T	T	T	del	del	del	del	del	del	del	del	G	G	A	C	G	C	C	C	T	A	.	G	C	A	A	G

5.6.3. Análise filogenética e rede de haplótipos

Para a construção na árvore filogenética, além dos identificados, também foram incluídas sequências de referência para as linhagens, descritas por Burk e colaboradores em 2013. Assim como HPV16, a análise filogenética das amostras com HPV18 também acordo com o método de classificação baseado em SNVs diagnóstica a topologia gerada mostrou a formação de dois agrupamentos distintos, um deles formado por haplótipos da linhagem A e outro pelos haplótipos da linhagem B. Não foram observadas quaisquer amostras agrupadas com a sequência de referência para a linhagem C.

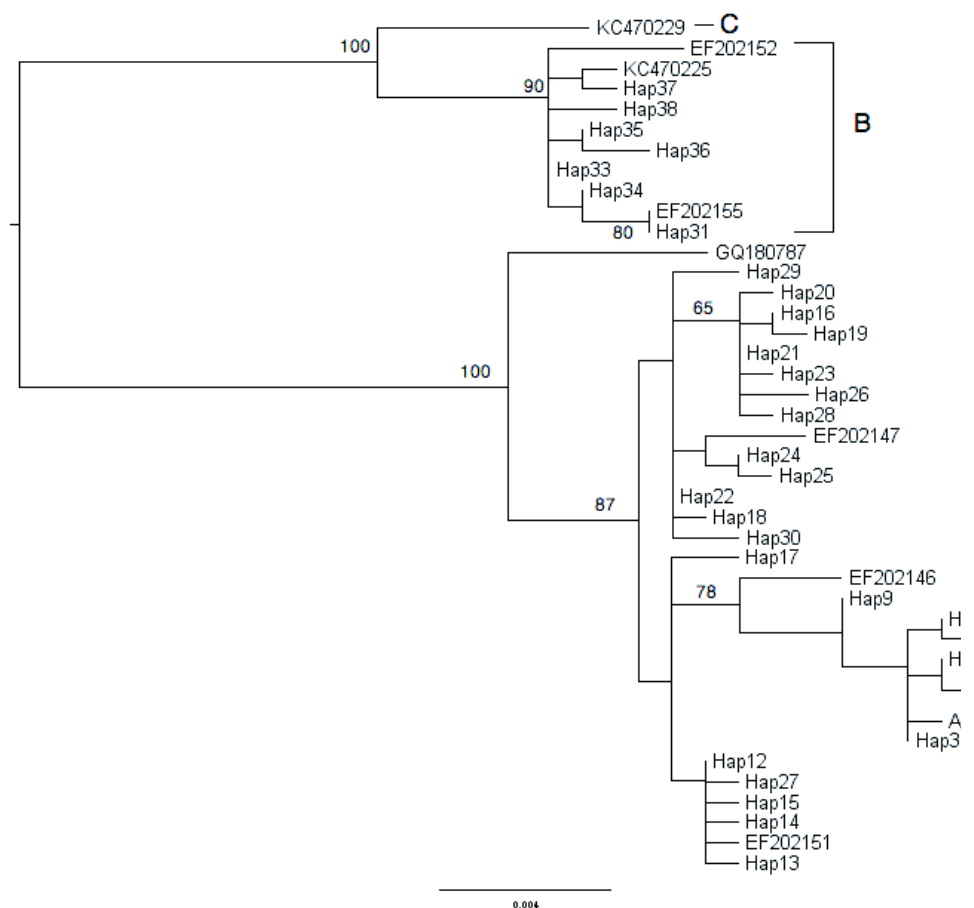


Figura 5.6.3.1- Análise filogenética do HPV18. Árvore de Máxima verossimilhança com os ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (apresentado em frequência) com base em 10.000 réplicas. São mostrados valores com frequência acima de 50%. As sequências de referência das variantes do HPV-18 estão identificadas com o número de acesso do GenBank.

As análises em rede de haplótipos (MJ) demonstraram que os haplótipos mais frequentes ocupam posições centrais, rodeados pelos haplótipos menos frequentes, mas numa configuração não tão evidente como o observado para as amostras com HPV16. Índices de diversidade molecular (diversidade de haplótipos, diversidade de nucleotídeos) e teste Fs's de Fu com base nas 71 amostras são mostrados na Tabela 5.6.3.1. O teste de Fs's de Fu foi negativo, mas não significativa (Fs's de Fu = -4,11; P = 0,156), sem evidência de expansão da população viral recente ou seleção positiva.

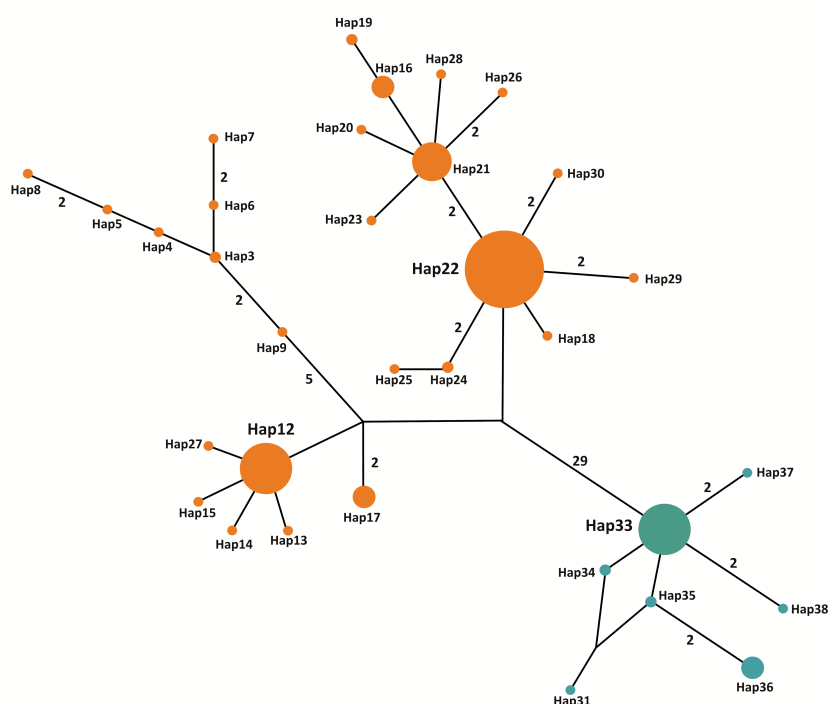


Figura 5.6.3.1 - Análise em rede dos 33 haplótipos de HPV18. As linhas são indicados por cores: em laranja a linhagem A e em verde, a linhagem B. Cada círculo é correspondente a um dos 33 haplótipos e o diâmetro correspondente a cada círculo é proporcional ao número de amostras que partilham cada haplótipo; as linhas que ligam cada círculo representam pelo menos uma substituição de nucleotídeos e quando ocorre mais do que uma substituição, é indicado por um número (que corresponde ao número de substituições). Os três haplótipos mais frequentes são indicados: Hap22 (n = 10), Hap12 (n = 6), e Hap33 (n = 6).

Tabela 5.6.3.1 - Índice de diversidade molecular para o HPV18

	HPV18	
Número de amostras	71	
Número de haplótipos	33	
Diversidade de haplótipos	0.958	
Diversidade de nucleotídeos	0.01	
Fu's Fs Test	- 4.11	(p= 0.156)

A sequência de aminoácido em E6 mostraram duas substituições anteriormente descritas em relação à sequência protótipo: Y72H em um haplótipo (Wang et al., 2009) e H129N em todos os haplótipos africanos (de Bóer et al., 2004). Além disso, quatro novas substituições foram observadas: H80Y (em um haplótipo), H133P (em dois haplótipos), Y134F (em um haplótipo), e R144Q (em um haplótipo)

Tabela 5.6.3.1 – Substituições de aminoácidos encontradas na proteína E6 nas amostras HPV18.

Linhagem	Numero de acesso Genebank AY262282	HPV18 - E6 Posição do aminoacido					
		72	80	129	133	134	144
		Y	H	N	H	Y	R
A	Hap3	.	.	.	.	.	.
	Hap4	.	.	.	.	.	.
	Hap5	.	.	.	P	.	.
	Hap6	.	.	.	.	.	.
	Hap7	.	.	.	.	.	.
	Hap8	.	.	.	P	.	.
	Hap9	.	.	.	.	.	.
	Hap12	.	.	.	.	.	.
	Hap13	.	.	.	.	.	.
	Hap14	.	.	.	.	.	.
	Hap15	.	.	.	.	.	.
	Hap16	.	.	.	.	.	.
	Hap17	.	.	.	.	.	.
	Hap18	.	.	.	.	.	.
	Hap19	H	.	.	.	.	.
	Hap20	.	.	.	.	.	.
	Hap21	.	.	.	.	.	.
	Hap22	.	.	.	.	.	.
	Hap23	.	.	.	.	.	.
	Hap24	.	.	.	.	.	.
	Hap25	.	.	.	.	.	.
	Hap26	.	.	.	.	F	.
	Hap27	.	.	.	.	.	.
	Hap28	.	.	.	.	.	.
	Hap29	.	.	.	.	.	.
	Hap30	.	.	.	.	.	.
B	Hap31	.	Y	K	.	.	.
	Hap33	.	.	K	.	.	.
	Hap34	.	.	K	.	.	.
	Hap35	.	.	K	.	.	.
	Hap36	.	.	K	.	.	.
	Hap37	.	.	K	.	.	.
	Hap38	.	.	K	.	.	Q

5.7 Variantes de HPV16 e HPV18 X Dados Clínicos e epidemiológicos

Com relação à idade das pacientes, observamos uma possível associação entre a presença das variantes B/C de HPV16 em mulheres mais jovens, quando comparados ao grupo incluído na variante A (tabela 5.7.1). Já quando relacionado ao tipo histológico tumoral, observou-se que, de todos os casos identificados com as variantes B/C de HPV16, apenas uma amostra foi identificada como adenocarcinoma. A variante B foi observada exclusivamente em carcinomas de células escamosas (10/10) , enquanto a variante C, 90% dos casos foram de carcinomas de células escamosas (9/10) .

Tabela 5.7.1 Variantes de HPV16 e HPV18 X Dados Clínicos e epidemiológicos

Características	Variantes de HPV16 (n= 334)				Variantes de HPV18 (n=71)		
	A (n=216)	B/C (n=20)	D (n=98)	P	A (n=56)	B (n=15)	P
Idade - media							
Media	48,65	42,2	47,16	(A vs B/C)	45	39	
CI 95%	48,6 - 50,4	36,3 - 48	44,7- 49,6	p=0.0386	44,7 - 51,2	36 - 48	ns
Tipo de Tumor							
CCE	175	19	78		33	7	
Adenocarcinoma	24	1	15		17	5	
Outros	18	0	4		5	4	
Local de residência							
Rio de Janeiro - Capital	72	8	38		16	7	
Rio de Janeiro - Região metropolitana	143	12	59		39	8	

6. Discussão

No presente estudo, tivemos como objetivo principal a identificação da prevalência dos diferentes tipos de HPV presentes em tumores invasivos do colo uterino em mulheres matriculadas no Hospital do Câncer II do Instituto Nacional do Câncer (INCA), entre Julho de 2011 e Abril de 2014. Além disso, também buscamos descrever o perfil sociodemográfico das mesmas. Por fim, após a identificação dos dois tipos mais prevalentes de HPV, o HPV16 e o HPV18, buscamos avaliar a variabilidade genética intratipo dos mesmos, na população em questão. O projeto foi um estudo prospectivo, com as coletas de amostras realizadas durante um período previamente estabelecido e a inclusão das pacientes conduzida de forma contínua e consecutiva, sem qualquer viés de seleção. Uma importante limitação do estudo foi a ausência de um grupo controle no qual incluíssem mulheres com exame citológico normal ou a presença de lesões pré malignas. Tanto em estudos relacionados a prevalência dos tipos de HPV quanto a trabalhos avaliando a variabilidade intratípica viral, a grande maioria dos estudos epidemiológicos encontrados utilizam-se deste tipos de amostra para as associações de fatores comportamentais, clínicos e sociodemográficos com risco ao desenvolvimento do câncer do colo uterino. Todavia, tendo em vista a impossibilidade de acesso tais amostras controle e com intuito de detalhar o perfil sociodemográfico da população do estudo, buscamos descrever os principais cofatores constantemente abordados em estudos sobre a história natural da infecção pelo HPV e, conseqüentemente, o desenvolvimento do câncer cervical. Um dos primeiros e principais estudos caso-controle conduzidos com a população brasileira foi o trabalho conduzido por Eluf-Neto et al. (1994). O estudo utilizou como amostras caso, 199 mulheres diagnosticadas com câncer cervical invasivo e 225 como controle normal. Apesar de, comparado ao presente estudo, o estudo de Eluf-Neto ter incluído um número inferior de amostras de câncer cervical, este estudo utilizou como ferramenta de coleta de dados epidemiológico um questionário relativamente semelhante ao utilizado por nós, principalmente quanto ao comportamento sexual das pacientes, servindo portanto, como base de comparação a alguns de nossos achados, além de outros dados presentes na literatura. No estudo em questão, além da presença do HPV, outros fatores foram levantados, como: número de parceiros sexuais, início da atividade sexual, paridade e a realização do exame Papanicolau.

Na literatura, o câncer do colo uterino tem sido associado a baixos índices de desenvolvimento humano (IDH), consequentemente a regiões pobres, caracterizadas por altos índices de analfabetismo e população com comportamento sexual e hábitos de vida associados à multiplicidade de parceiros, ao início precoce da atividade sexual e à multiparidade (Eluf-Neto et al., 1994; Castellsagué et al., 2008; Munoz et al., 2003; de Sanjose et al., 2010). No presente estudo, os principais dados coletados foram: idade da paciente no momento do diagnóstico, tabagismo, grau de escolaridade, renda per capita, início da atividade sexual, número de parceiros, uso de contraceptivo oral e o conhecimento acerca do exame preventivo. Com relação a idade das pacientes, na literatura é descrita que a faixa etária de maior incidência do câncer de colo uterino são mulheres com mais de 45 anos, atingindo o maior pico na média de 50,9 anos (Castellsagué et al., 2008; Munoz et al., 2003; de Sanjose et al., 2010). No presente estudo a idade média foi de 48 anos. Em relação aos fatores socioeconômicos, do total de mulheres, 56,9% tinham no máximo 6 anos de estudo, 60% não desenvolviam atividade remunerada e 75% pertenciam a famílias com renda *per capita* de no máximo 1 salário mínimo. Esses dados estão coerentes com as associações já descritas (Lima et al., 2006; Castellsagué et al., 2007). Sobre o uso tabaco, outro fator constantemente associado a carcinogênese cervical (Munoz et al., 2003), 54% das pacientes incluídas eram fumantes ou ex-fumantes. No trabalho de Eluf-Neto, foi observada uma tendência quanto a associação entre o tabaco e o câncer ($p = 0.055$). Entre os casos de câncer avaliados, foram observadas 111 (55%) mulheres que nunca fumaram e 88 fumantes. Com relação ao comportamento sexual, no estudo de Eluf-Neto (1994) observou-se que a proporção de controles positivos para DNA do HPV aumentou quanto menor a idade da primeira relação sexual, quando comparados os grupos caso/controle. No presente estudo, apenas 28,7% das mulheres relataram o início da atividade sexual até os 15 anos de idade. Quanto ao número de parceiros sexuais, no presente estudo relatamos que 36% pacientes com no máximo 2 parceiros ao longo da vida, até o momento do diagnóstico. Já no trabalho de Eluf-Neto, foi observada uma taxa de 76% (153/199) das pacientes com até dois parceiros. Porém, esta proporções não são passíveis de comparação visto que, no presente estudo, buscamos levantar o número total de parceiros ao longo da vida. Já no trabalho de Eluf-Neto, os autores relacionaram esta questão ao número de parceiros concomitantes. Já em relação ao exame citopatológico, o estudo conduzido por Eluf-Neto apontou uma relação de diminuição no risco ao

desenvolvimento do câncer cervical ($p < 0.0001$). Dos 199 casos, 134 mulheres (67%) relataram nunca terem sido submetidas ao exame Papanicolau. Já no presente estudo, 80,8% das mulheres entrevistadas relataram a realização do exame previamente ao diagnóstico. Apesar desta discrepância das proporções, que podem ser um reflexo temporal entre os dois estudos, alguns dados relativos a esta questão devem ser destacados. Além de 19,2% das pacientes nunca terem sido submetidas ao exame citopatológico, 36,6% o fizeram com intervalos de 3 anos ou mais. E mais, do total de mulheres entrevistadas, 39,9% das mulheres relataram o completo desconhecimento acerca do propósito do exame.

O papel do HPV como agente etiológico do câncer cervical e suas lesões precursoras tem sido bem documentado. As variações nas prevalências do HPV em amostras de câncer cervical invasivo variam de 80% a valores próximos a 100% e, provavelmente, estão associadas às diferentes técnicas de detecção (Walboomers et al., 1999; Schiffman et al., 2010; Rabelo-Santos et al., 2003; Li et al., 2011; Bosch et al., 2002). Dentre elas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado eficiente em estudos de prevalência de DNA de HPV (Saini et al., 2007; Oliveira et al., 2006). Sabe-se também que existem diversas metodologias para conservação e o estudo em amostras de tecidos de pacientes. No presente estudo, como dito anteriormente, as amostras analisadas foram coletadas ao longo do projeto, o que possibilitou a utilização de amostras frescas, armazenadas em freezers a -80°C . Estudos recentes indicam que a utilização deste tipo de material é o mais indicado, quando comparado a outros métodos como tecido fixado em formol ou parafina e também a células esfoliadas (Odida et al., 2010; Snijders et al., 2010). Como consequência, na grande maioria dos casos, obtivemos a partir da extração com o kit comercial específico, um material genético íntegro e com um bom grau de pureza. Isso nos possibilitou a utilização de técnicas de biologia molecular consideradas como padrão ouro para o propósito do projeto, que são as técnicas de PCR e sequenciamento direto. Para ambas as técnicas, utilizamos o par de primers PGMY 09/11 e, nos casos em que houve a necessidade de amplificarmos um fragmento menor, com o par de primers GP5+/6+. Ambos os sistemas se encontram amplamente descritos e utilizados em estudos anteriores para a identificação de HPV (Baay et al., 1996). Em grande parte das amostras coletadas, o DNA do HPV foi detectado (99,3% - 590/594) e destas, 93,8% (554/590) foram perfeitamente genotipadas. Em 16 amostras não foi possível a identificação do HPV presente e em 20 amostras foi detectada a presença de múltipla infecção por mais de um tipo de

HPV, através de um kit de hibridização desenvolvido para tal fim. Este dado será discutido posteriormente.

O HPV 16 é o mais prevalente no câncer cervical em todas as regiões do mundo e o HPV 18 está em segundo lugar. Contudo, a frequência dos demais tipos de HPV encontrados apresenta grande variação conforme a região geográfica da população estudada. Estudos anteriores apontam que os seis tipos de HPV mais prevalentes nas Américas do Sul e Central são o HPV 16, 18, 31, 45, 33 e 58 (Bosch et al., 2008; Li et al., 2011; Clifford et al., 2005). Nossos resultados apresentaram como os 5 tipos mais prevalentes: o HPV 16 (62,2% - 370/594), em segundo lugar encontramos o HPV 18 (13% - 77/594), acompanhado pelo HPV 45 (5,5% - 33/594), seguido pelo HPV 35 (2% - 12/594) e HPV 58 (1,8% - 11/594). Excluindo-se os casos de coinfeções (3,3% - 20/594), os demais tipos encontrados em menor frequência representaram 12,4% do total de amostras (74/594). Comparados a dados do Brasil presentes na literatura, nossos resultados corroboram a variabilidade na prevalência dos diferentes tipos de HPV. Como exemplos comparativos, utilizamos alguns estudos conduzidos no Brasil (tabela 6.1), representando cada uma das regiões.

Quadro 6.1 – Estudos conduzidos no Brasil, representativos de cada uma das 5 grandes regiões macroeconômicas.

Região do Brasil	Sudeste			Norte	Central	Nordeste	Sul
Autor	Presente estudo	Eluf Neto (1994)	Oliveira (2013)	Noronha (1999)	Rabelo-Santos (2003)	Fernandes (2013)	Bosch (1995)
Media de idade	48 anos	51 anos	51,9	51,5	49,1	x	x
Amostras	594	186	170	155	56	98	46
Tipo de amostra	Tumor fresco	Celula esfoliada	Tumor fresco	Parafina	Parafina	Parafina	Parafina
Taxa de detecção	99,3%	84%	99%	70,3%	76%	87,8%	87%
CCE	76%	89,4%	83%	96,8%	85%	x	x
ADC	13,4%	4,5%	14%	3,2%	7,1%	x	x
Método detecção	PCR PGMY/GP	PCR GP5/GP6	Linear Array	PCR MY09/11	PCR GP5/GP6	PCR MY09/11	PCR
Genotipagem	Seq. Sanger	Southern blot	Linear Array Genotyping test	Dot-Blot hybridisation	Dot-Blot hybridisation	Dot-Blot hybridisation	Dot-Blot hybridisation
Prevalencia	16	16	16	16	16	16	16
	18	18	18	18	33	18	18
	45	31/33	31	31, 33, 45, 52, 58, 59, 73	18	51	31
	35	x	33	x	31	31	45
	58	x	35	x	x	58	x
Múltipla infecção	3,3%	4,3%	24,7%	x	x	4,7%	x

No estudo conduzido por Rabelo-Santos et al. (2003), que incluíram 38 amostras de câncer invasivo conservadas em parafina em mulheres de Goiânia, o HPV33 foi o segundo mais prevalente (13,2% - 5/38). Em outro estudo semelhante conduzido por Amaro-Filho (2012) que incluíram 78 amostras de câncer cervical invasivo conservadas em parafina em mulheres do Rio de Janeiro, também apresentou o HPV33 como o segundo mais prevalente (11,2% - 10/78). Já o estudo

conduzido por de Oliveira et al. (2013), utilizando amostras frescas de 170 mulheres diagnosticadas com câncer cervical invasivo e matriculadas em dois hospitais do estado de São Paulo, o HPV 33 foi observado como o quarto mais prevalente (12/170). No presente estudo, o HPV 33 foi detectado em apenas 1,2% do total de amostras (7/594), figurando como o sétimo mais prevalente, junto ao HPV 31. Um outro exemplo a ser destacado é o HPV 45, o terceiro mais prevalente em nossas amostras (5,5% - 33/594). Nos estudos citados anteriormente, somente no estudo conduzido por de Oliveira et al. (2013) o HPV 45 foi observado, sendo o sexto mais prevalente (5,3% - 9/150). Nos estudos de Rebelo-Santos et al. (2003) e Amaro-Filho (2012), o HPV 45 não foi detectado em nenhuma amostra analisada. Já o HPV35, foi apontado como o quarto mais prevalente na nossa população (12,3% - 12/594). No estudo de Amaro-Filho (2012) foi observado como o terceiro mais prevalente (3,9% - 3/78) e no estudo conduzido por de Oliveira (2013) como o quinto mais prevalente (5,9% - 10/170). E por fim, o HPV 18, tido como o segundo mais prevalente no mundo, mesmo resultado observado em nossas amostras (13% - 77/594) e no estudo conduzido por de Oliveira em 2013 (12,3% - 21/170). No estudo de Rebelo-Santos (2003), o HPV 18 encontrado na terceira posição em apenas 5,2% das mulheres (2/38) (3,9% - 3/78) e no estudo de Amaro-Filho (2012) em uma frequência de apenas 1,3% (1/78). Uma possível explicação para estas diferenças pode estar no número de amostras utilizadas nos estudos ou pelos métodos empregados na conservação das amostras e de detecção do DNA viral.

Com relação a idade das pacientes, estudos anteriores descrevem que as mulheres com câncer cervical e infectadas com os tipos HPV16 e HPV18 tendem a ser diagnosticadas em idades mais jovens quando comparadas aos demais tipos (Saraiya et al., 2014; de San Jose et al., 2013). No presente trabalho, conforme a tabela 5.4.3 descrita nos resultados, a média da idade observada para ambos os tipos (48,71 anos para o HPV16 e 46,71 anos para o HPV18) não apresentou tal associação, somente quando comparadas ao HPV58 (58,4 anos).

Diversos estudos têm demonstrado a presença de coinfeções de pelo menos dois tipos de HPVs em uma mesma amostra de câncer cervical. O papel das múltiplas infecções ainda não foi claramente elucidado, entretanto alguns autores as sugerem como um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, através da associação entre o número de tipos virais no local de infecção e o agravamento das neoplasias (Munoz et al., 2003; Soto-De Leon et al.2011; Franco

et al., 1999; Mejlhede et al., 2009). Uma meta-análise conduzida por Munoz e colaboradores em 2003, a partir de onze estudos caso-controle em nove países, reuniu dados de 1918 mulheres com câncer cervical. Os resultados apontaram a presença de infecções por pelo menos dois tipos de HPV em 10,9% das amostras. Em outro trabalho conduzido por Li e colaboradores (2011), os valores apontados foram de 11,2%. No presente estudo, observamos uma taxa inferior a estes dados apresentados, com 3,3% (20/594) das amostras com coinfeção. Provavelmente, em amostras com múltiplas infecções, mas com a carga viral muito discrepantes entre os tipos infectantes, ocorreu algum tipo de amplificação preferencial por PCR do tipo mais predominante e, conseqüentemente, o sequenciamento direto e identificação de somente um tipo. Apenas as amostras que de fato apresentaram eletroferogramas inconclusivos (36/594), interpretamos como possíveis casos de coinfeções, sendo conseqüentemente submetidas ao teste com o kit de hibridização. Provavelmente, as amostras nas quais detectamos a coinfeção, a carga viral dos diferentes tipos de HPV presentes possuíam alguma equivalência, viabilizando a amplificação por PCR dos dois ou mais tipos de HPV. Portanto, o baixo índice de coinfeções aqui apresentado pode ser explicado devido a um viés de amplificação seletiva pela técnica empregada para a genotipagem do HPV e, conseqüentemente, pela limitação do método visual de seleção por nós utilizados, resultando em uma subestimação do real número de casos de coinfeção.

Diversos estudos tem buscado associar as variantes intratipo de HPV16 e HPV18 com a persistência da infecção pelo vírus, o risco do desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical e do câncer cervical invasivo (Burk et al., 2003; Xi et al., 2006; Sichero et al., 2012; Berumen et al., 2001; Chen et al., 2015), indicando diferenças na prevalência dessas linhagens entre as mulheres com características distintas. Em trabalhos anteriores, tanto para HPV 16 (Cornet et al., 2012) quanto para o HPV 18 (Chen et al., 2015), a distribuição das linhagens em todo o mundo é apontada como geograficamente/eticamente específicas. Pelo fato da alta miscigenação presente na população brasileira, além da ausência de um grupo controle com citologia normal ou lesões pré malignas, nossos resultados limitaram-se a uma análise descritiva acerca da incidência destas variantes no grupo de pacientes incluídas, não levando em consideração o papel destas variantes na história natural da infecção ou carcinogênese cervical, assim como sua distribuição quanto a origem étnica e/ou cor autodeclarada das pacientes. Esta questão será discutida posteriormente.

Através de análise filogenética somada a identificação de polimorfismos (SNVs) em sítios específicos da região de LCR e E6, no presente estudo, fomos capazes de identificar a partir de amostras de uma população com um alto grau de miscigenação, praticamente todas as linhagens do HPV16 e HPV18 até então descritas (Burk et al., 2013). A exceção foi a linhagem C do HPV18, descrita como específica para continente africano (Chen et al., 2015).

Para as análises filogenéticas do HPV16, do total de 370 amostras identificadas como HPV 16, foram utilizadas 314 amostras para a caracterização dos haplótipos e análise filogenética. Em 34 amostras, a amplificação por PCR de um ou ambos os fragmentos foi insatisfatória e em 20 amostras, as extremidades das sequências obtidas foram inconclusivas, o que comprometeria identificação dos haplótipos e as análises filogenéticas. Em duas amostras, foi sugerida a coinfeção por mais um tipo de variantes de HPV16. O papel das coinfeções de variantes na carcinogênese, considerado um evento raro, permanece não esclarecido. Em um trabalho conduzido por Sichero e colaboradores em 2007, foram observados 4 casos em 187 infecções por HPV 16. Já no trabalho de Cornet e colaboradores em 2012, foram observados 7 casos em 985 amostras analisadas. Sendo assim, optamos por excluir estas 56 amostras das análises filogenéticas e rede de haplótipos.

Os haplótipos das amostras de HPV16 foram definidos a partir da variação de um único nucleotídeo ao longo da sequência de 1310 pares de base obtidas. No total, foram identificadas 125 haplótipos, sendo 96 presentes em uma única amostra e 29 haplótipos com sequências compartilhadas por dois ou mais pacientes. As análises demonstraram que os quatro haplótipos com maior frequência (Hap09, Hap11, Hap47 e Hap04) compreendem 41% das 314 amostras que foram totalmente sequenciadas para LCR e E6. A análise em rede mostrou que três destes haplótipos (Hap09, Hap11, e Hap47) estão associadas a outros menos frequentes formando uma rede em formato de estrela, sendo a maioria deles diferindo por uma substituição de nucleotídeos de um destes haplótipos três haplótipos. Este padrão sugere uma rápida expansão populacional destes haplótipos, associados ao câncer cervical invasivo devido a eventos históricos-neutros (como efeito fundador e gargalos populacionais) ou exposição a fatores seletivos que favorecem haplótipos específicos, com a seleção atuando sobre regiões LCR ou E6 ou sobre outra região do genoma do HPV. Essas hipóteses são suportadas pelo valor negativo e significativo de teste F_s de Fu (1997) (-23,86, $p = 0,004$). Além disso pode haver a associação destas variantes com um maior risco de desenvolvimento do câncer de

colo do útero, como observado por Chen et al. (2014) para as variantes associadas à sublinhagem B2 de HPV45. Uma análise da prevalência de variantes de HPV16 em mulheres sem lesões cervicais pode nos permitir avaliar essas propostas. Em relação aos haplótipos identificados como pertencentes a linhagem B, estes não formaram um grupo monofilético na construção da árvore filogenética e rede de haplótipos. Os valores de bootstrap indicam baixo suporte na topologia da árvore filogenética, apontando para a necessidade de analisar uma região genômica maior.

Para as análises dos SNVs, as extremidades inconclusivas que anteriormente acarretaram a exclusão de 20 amostras com HPV16 das análises filogenéticas não comprometeram as regiões que incluem os sítios de interesse descritos como contendo assinaturas específicas para determinada linhagem, possibilitando a identificação das variantes nas amostras. Portanto, estas amostras foram novamente incluídas, somando o total de 334 amostras. Utilizando o método descrito por Cornet e colaboradores (2012), os resultados observados confirmaram uma associação quase absoluta com a classificação obtida pelas análises filogenéticas. Cabe ressaltar que o trabalho de Cornet et al. em 2012 utilizou a nomenclatura para identificação das variantes baseada na origem geográfica das amostras. No presente estudo, adaptamos o método utilizando a nova nomenclatura alfanumérica proposta por Burk e colaboradores (2013), assim como as sequências de referência para cada uma das variantes descritas no mesmo trabalho. Além disso, na classificação descrita por Burk (2013), a linhagem Africana 2b proposta por Cornet em 2012 não está mais presente. Com isso, 4 das 46 assinaturas originalmente propostas não foram observadas nas referências utilizadas ou amostras analisadas.

Segundo Cornet et al. 2012, a linhagem A pode ser diagnosticada especificamente por três posições de nucleotídeos em E6 (145G , 286T , e 289A) e três da LCR (7489G , 7764C , 7786C). Entretanto, as sublinhagens A1, A2 e A3 (E) não podem ser diferenciadas por nenhum SNVs diagnóstico. Diversas posições de nucleotídeos que são capazes de distinguir outras sublinhagens de HPV 16, apresentam-se polimórficas na linhagem A nas mais variadas combinações. Entretanto, pelo método proposto, dentro da linhagem A, a sublinhagem A4 (As) pode ser identificada especificamente por dois SNVs diagnósticos em E6 (T178G e T178C) e a combinação de oito SNVs em LCR, sendo seis deles diagnósticos (T177C, T7201C, C7270C, A7287C, G7842A/T e C24T). Nas sequências obtidas a partir das biópsias coletadas, não foram observadas quaisquer destes SNVs diagnósticos para a sublinhagem A4 (Asiática) dentre as identificadas como

pertencentes a linhagem A, sendo portanto, 216 amostras classificadas como pertencentes a linhagem A, sublinhagens A1, ou A2 ou A3. As linhagens B e C (Africanas) podem ser diagnosticadas especificamente pela presença de C143G em E6 e C31T na LCR (Cornet et al., 2012). O estudo também descreve que as linhagens B e C mostram um padrão comum de cinco SNVs em E6 (C143G , G145T , T286A , A289G , e C335T) que levariam a troca de dois aminoácidos Q14D e H78Y. Utilizando-se deste critério, 20 amostras foram classificados como pertencentes a estas linhagens. Entre as linhagens B e C, são sugeridos dois SNVs diagnósticos (G132C e A83C) para as linhagens B e dois para a linhagem C (G132T e A403G). Desta forma, 10 amostras foram classificadas como pertencentes à linhagem B, assim como 10 amostras foram classificados como pertencentes a linhagem C. Já os isolados pertencentes à linhagem D se agrupam em um grande grupo, no entanto, nenhum SNVs na região sequenciada é capaz de, especificamente, identificar esta linhagem. Nas sequências descritas por Cornet et al. 2012, foram observadas um padrão comum de cinco SNVs em E6 (G145T, T286A, A289G, C335T e T350G), e sete SNVs em LCR (A7233C, A7485C, G7489A, C7669T, C7689A, C7764T, C7786T). Nas sequências analisadas no presente estudo, todos os SNVs propostos em E6 foram observados. Entretanto, apenas um SNP (7233 localizado na LCR) foi observado em 100% das amostras classificadas como pertencentes a linhagem D. Em seis SNVs, apresentaram algum grau de discordância (1/42 a 4/42) quanto as substituições observadas por Cornet, em 9 haplótipos (10 amostras) analisados. Vale ressaltar que no trabalho em questão, foram incluídas somente 9 amostras do Brasil. Esse fato sugere que, assim como o próprio artigo também deduz, que com a expansão do número de amostras ao redor do mundo, o número de SNVs diagnósticos tende a diminuir.

A prevalência de linhagens de HPV16 em amostras de câncer cervical invasivo no Brasil também foi analisada por Junes-Gill et al. (2008), em um estudo conduzido em Belém, na Região Norte brasileira (Região Amazônica), no qual foram incluídas 63 mulheres. Os autores encontraram a linhagem D como a mais prevalente (46%), seguido pela linhagem A (41,3%), e as linhagens B/C (3,2%), não considerando as amostras com coinfeção (9,5%). Comparativamente, a maior prevalência de linhagem D em relação ao Rio de Janeiro (46%, Junes-Gill et al. Vs. 29%, nosso estudo), pode ser um reflexo da origem étnica da população de Belém, que tem uma influência maior da população ameríndia (Alves- Silva et al., 2000; Pereira et al., 2012). Outros estudos com foco na diversidade intratipo de HPV16,

avaliaram a prevalência das linhagens em mulheres com lesões pré-cancerosas ou mulheres com lesões de diferentes graus (incluindo cânceres invasivos) (Cruz et al., 2004; Villa et al., 2000; Freitas et al., 2014). Esses estudos relatam uma maior prevalência de HPV16 linhagem A, que vão desde 65,8% a 41% (Freitas et al., 2014; Cruz et al., 2004). Comparando os resultados obtidos com os de Xi et al. (2006) em mulheres norte-americanas (definidas pelo autor como Afro-Americanas, brancas e outros), com citologia normal do colo do útero, LSIL ou HSIL e infectadas com HPV16, os autores também encontraram uma maior frequência da linhagem A tanto em Afro-americanas (66,7%) como em mulheres brancas (86%) e com as linhagens B / C encontradas em 26,5% das mulheres afro-americanas e 4,3% das mulheres brancas. Os resultados de Yamada et al. (1997) para as mulheres com câncer cervical invasivo de oito países latino-americanos (N= 228), foram semelhantes aos resultados aqui apresentados, com 77% de prevalência para linhagem A, 19% para a linhagem D, e 3,5% para a linhagem B + C de HPV16.

Com relação ao HPV18, do total de 77 amostras identificadas, 71 foram submetidas as análises filogenética e de SNVs. Seis amostras foram excluídas devido a amplificação insatisfatória de um ou ambos os fragmentos. Assim como esperado, a topologia gerada formou dois agrupamentos distintos, com haplótipos agrupados junto as sequências de referência descritas para a linhagem A e da linhagem B (Burk et al., 2013). Quanto a análise em dos haplótipos, o teste de Fs de Fu (-4,11, $p = 0,156$) não foi significativo, o que sugere uma história evolutiva distinta. O valor não significativo encontrado, indica que o valor Fs não diferiram entre 0 (zero), sugerindo que os genomas do HPV18 na população estudada estão evoluindo de acordo com um modelo de seleção neutra, e que nenhum evento recente afetou o tamanho da população viral (e consequente diversidade) ocorreu.

Comparado aos dados disponíveis para o HPV16, um número muito inferior de estudos foram realizados descrevendo a frequência de linhagens em câncer cervical invasivo associado à infecção pelo HPV18, sendo que a maioria dos estudos incluíram preponderantemente mulheres com citologia normal ou lesões pré-malignas. Recentemente, Chen et al. (2015) publicou um grande estudo sobre diversidade genética e o risco associado ao desenvolvimento de câncer cervical. O trabalho utilizou 711 amostras positivas para HPV 18 (incluindo biópsias de câncer cervical invasivo, lesões pré malignas, esfriados cervicais e amostras controle), oriundas de 39 países ao redor do mundo e depositadas no biobanco da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Em nossas análises, com base no

método de SNVs proposto para a identificação das variantes, os resultados obtidos foram consistentes com as análises filogenéticas, assim como com os resultados descritos na literatura utilizando metodologia semelhante (Aria Pulido et al., 2006; Chen et al., 2015; Arroyo et al., 2012; Pérez et al., 2014).

Dentre os estudos com variantes de HPV 18, dois foram realizados no Brasil (Villa et al., 2000; Sichero et al., 2007), sendo a prevalência mais elevada detectada (80-90%) da linhagem A seguido da linhagem B. A linhagem C foi relatada apenas por Sichero et al. (2007), com uma frequência de 6,6%. No presente trabalho, encontramos um padrão similar, com uma maior frequência de linhagem A (71,8%), seguido da linhagem B (19,0%). No estudo de Xi et al. (2006), os resultados obtidos para as mulheres norte-americanas (classificadas pelos autores como Afro-americana, brancas, e outras) positivas para HPV18 com citologia normal, lesões de baixo e alto grau, encontrou maior prevalência da linhagem A (71,4%), seguida por linhagens B / C (28,6%). O mesmo estudo observou frequência maior de linhagens B/C entre as mulheres afro-americanas (63%) e uma maior frequência de linhagem A entre as mulheres brancas. Outros dois estudos realizados na Espanha (Arroyo et al., 2012; Pérez et al., 2014) em amostras cervicais de mulheres com citologia normal, lesões do colo do útero e câncer invasivo também encontraram uma frequência maior de HPV18 linhagem A, seguido pela linhagem B e a linhagem C relatada apenas por Arroyo et al. (2012), com uma frequência de ~ 11%. Na Costa Rica, o estudo realizado por Schiffman et al. (2010), incluindo mulheres com citologia normal e lesões cervicais de diferentes graus, também encontrou uma frequência menor da linhagem B (22,6%), com relação as linhagens de A e C (77,4%, em conjunto). Um estudo realizado por Burk et al. (2003) nos Estados Unidos, que incluiu 19 mulheres com diagnóstico de carcinoma *in situ* ou cânceres invasivos, apontaram a linhagem A (9/19 - 47%) como a mais frequente, seguido pela linhagem C (07/19 - 36,8%) e B (3/19 - 15,7%). E por fim, no trabalho conduzido por Chen et al. (2015) com amostras provenientes de diversos países, observou-se que, especificamente para a região da América Sul e Central, do total de 84 amostras incluídas, 73 (86,9%) foram classificadas como pertencentes a linhagem A e 11 (13,1%) a linhagem B.

No presente estudo, relatamos que as linhagens mais prevalentes presentes na população estudada foram as linhagens A e D para HPV16 e a linhagem A para HPV18. Os estudos citados anteriormente mostraram que estas linhagens de HPV são as mais prevalentes em populações de ascendência europeia (linhagens A de

HPV16 e HPV18) e ancestralidade ameríndia (linhagens D de HPV16 e A de HPV18) (Yamada et al., 1997; Ho et al., 1993). Tendo em vista que a base genética da população do Sudeste do Brasil (onde se localiza o Rio de Janeiro) mostra uma população altamente miscigenada, com uma grande contribuição de ascendência europeia e Africano (55% e 31%, respectivamente) e um menor contribuição da ancestralidade ameríndia (14%, com base em marcadores genéticos autossômicos) (Manta et al., 2013), era de se esperar uma maior prevalência de linhagens B e C do HPV16 e linhagens B e C de HPV18, linhagens mais prevalentes no continente Africano. Entretanto, é importante levar em consideração que uma associação direta entre a ancestralidade humana e as linhagens de HPV não são necessariamente esperadas em uma população miscigenada como a do Brasil, com indivíduos tendo as mais variadas proporções quanto à ancestralidade genética. Esse fato foi reportado em um estudo conduzido em uma população da Colômbia por Lopera et al. (2014) no qual, analisando mulheres com câncer do colo uterino, apresentaram uma correlação inversa entre a infecção por HPV 16 linhagem D (linhagem comum na população nativa americana) com uma maior proporção de marcadores de ancestralidade nativa americana.

Com relação aos tipos histológicos tumorais, estudos anteriores demonstram que, além da infecção pelo HPV ser necessária para o desenvolvimento tanto de CCE quanto de ADC, a distribuição dos tipos de HPV observados nestas duas formas da doença diferem. Para HPV16 e HPV18 o tipo mais frequentemente envolvido no desenvolvimento do CCE, e no caso de HPV18 a prevalência de adenocarcinomas é maior que em HPV16 (Burk et al., 2003; Altekruse et al., 2002). No presente estudo, do total de amostras coletadas, foram identificados 454 (76,4%) de carcinomas de células escamosas (CCE) e 80 (13,4%) de adenocarcinomas (ADC). Quando comparados os principais tipos histológicos tumorais com os tipos de HPV detectados observamos que, assim como esperado, houve uma associação entre a presença de HPV18 e o desenvolvimento de ADC ($p < 0,001$). A mesma análise, incluindo os tipos relacionados as mesmas espécies do HPV16 e do HPV 18 também demonstrou esta associação ($p < 0,001$). Alguns estudos também sugeriram que a distribuição de variantes, tanto do HPV16 quanto do HPV18, diferem entre ADC e CCE (Burk et al., 2003). Entretanto, em nossas amostras não observamos diferenças significativas na distribuição entre os tipos histológicos, conforme também já descrito anteriormente (Arias-Pulido, 2005; Chen et al., 2014)

O presente trabalho foi conduzido com um grande número de amostras de mulheres com câncer cervical invasivo matriculadas no INCA, um dos principais centros de excelência em Atenção ao Câncer do Brasil e que concentra a grande parte dos casos tratados na cidade do Rio de Janeiro e adjacências. Isto oferece um fiel panorama epidemiológico da doença na região, somado ao fato de que, apesar do estudo ter como limitação a ausência de amostras normais ou pré malignas como controles, os resultados aqui apresentados são de amostras coletadas entre julho de 2011 a abril de 2014, momento que antecedeu a campanha e implementação da vacina contra o HPV, pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Desta maneira, os dados aqui apresentados poderão servir de base para futuros estudos epidemiológicos acerca do impacto da vacina e da prevalência do tipos de HPV, assim como no desenvolvimento de estratégias para o combate dos tipos de HPV que permanecerem circulantes, e que não foram incluídos nas vacinas atualmente disponíveis. A vacina implementada no sistema publico de saúde do Brasil foi a Quadrivalente (Gardasil; Merck & Co), que oferece alta proteção contra os tipos de alto risco HPV 16 e HPV18 e os de baixo risco HPV 6 e HPV 11 (Garland S, 2007; Block S, 2006). Além disso, ensaios clínicos revelaram relativa proteção cruzada para os tipos de HPV 31, 33, 45, 52 e 58. Entretanto esta proteção cruzada não foi estatisticamente significativa (Wheeler et al., 2010; Brown et al., 2009). Embora os resultados dos ensaios clínicos da vacina terem demonstrado mais de 90% eficácia contra novas infecções, ainda é muito cedo para avaliar o impacto real que a vacina terá sobre a incidência e mortalidade do câncer cervical (Luckett & Feldman, 2015). Mesmo assim, levando em consideração a incidência dos tipos de HPV identificados no presente estudo e incluídos na vacina, a tendência esperada é de que, com a ampla cobertura e adesão da população, o impacto futuro na prevenção seja superior aos 75% para novas infecções. Recentemente, foi aprovado pelo FDA americano em dezembro de 2014 a vacina Nonavalente (Gardasil 9; Merck Sharp & Dohme Corp., Whitehouse Station, New Jersey), que tem como alvo, além dos tipos de HPV 6, 11, 16, 18 já incluídos na vacina Quadrivalente, os tipos 31, 33, 45, 52 e 58 para uso em mulheres com idades entre 9 a 26 anos e homens com idades entre 9 a 15 anos (referencia). Como esta vacina está a pouco tempo disponível no mercado, não há dados de eficácia clínica para avaliar o seu impacto na incidência do HPV na população em geral. Teoricamente, com base nos dados sobre a prevalência de tipos de HPV no presente estudo e na literatura em geral, as vacinas bivalente e Quadrivalente poderiam potencialmente prevenir a aproximadamente

70% dos casos de lesões precursoras do colo do útero e cancer invasivo, enquanto a Nonavalente poderia evitar um adicional de 20% dos casos. Obviamente, esta projeção depende de programas de ampla cobertura na administração da vacina na população alvo, antes do início da vida sexual.

É importante destacar que os papilomavírus são vírus de DNA dupla fita com uma taxa de mutação menor quando comparado aos vírus RNA, o que torna a ocorrência de mutações de escape de vacina improvável (Schiller e Lowy, 2012). Harari e colaboradores (2015), em um estudo realizado na Costa Rica, não encontraram nenhuma diferença na eficácia da vacina bivalente em relação as diferentes linhagens de HPV16 e HPV18. No entanto, os mesmos autores ponderam que esta conclusão não levou em conta a presença de variantes raras ou a diversidade desses HPV encontrados em outras populações. Com base nessa perspectiva e o advento de vacinas profiláticas contra HPV16 / 18 e câncer cervical, tornou-se necessário identificar as variantes genéticas de HPV que estão presentes em populações de interesse para verificar nos próximos anos se a vacinação será eficaz contra todas as variantes de HPV16 e HPV18, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o câncer cervical é um grave problema de saúde pública, e os dados disponíveis sobre a diversidade genética do HPV ainda são limitados.

7. Conclusões

- 1 O tipo mais prevalente foi o HPV16 (62,2% - 370/594), acompanhado pelo HPV18 (13% - 77/594), seguido pelo HPV45 (5,5% - 33/594); HPV35 (2% - 12/594) e HPV58 (1,8% - 11/594).
- 2 A incidência de coinfeções por dois ou mais tipos de HPV foi de 3,3% (20/594), sendo o HPV16 presente em mais de 90% desses casos
- 3 Nossos resultados mostraram que a media de idade das mulheres diagnosticadas com diagnóstico de Câncer do colo do útero foi de 48 anos.
- 4 O HPV58 foi associado a mulheres mais velhas (58 anos) quando comparado aos outros 5 tipos mais prevalentes. A associação anteriormente descrita entre o HPV16/18 em mulheres mais novas não foi observada.
- 5 Com relação as variantes de HPV16, os resultados mostraram uma maior prevalência da linhagem A, seguida da linhagem D, e as linhagens B e C.
- 6 Para as variantes de HPV18, os resultados mostraram uma maior prevalência da linhagem A, seguida da linhagem B. .
- 7 A diversidade genética de HPV16 indica uma recente expansão de variantes específicas ou uma vantagem seletiva associada a estas variantes em amostras de câncer invasivo, um padrão não observado para HPV18.

8. Referencias

- ALTEKRUSE, S. F. et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 3, p. 657–663, mar. 2003.
- ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **American journal of human genetics**, v. 67, p. 444–461, 2000.
- AMARO-FILHO, S. M. et al. A Comparative Analysis of Clinical and Molecular Factors with the Stage of Cervical Cancer in a Brazilian Cohort. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.
- ARIAS-PULIDO, H. et al. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 22–34, 20 jul. 2005.
- 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, 2006.
- ARROYO, S. L. et al. Human papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. **Virology journal**, v. 9, p. 258, jan. 2012.
- BAAY, M. F. D. et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 745–747, 1996.
- BACHMANN, M. F. et al. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. **Science (New York, N.Y.)**, v. 262, n. 5138, p. 1448–1451, 1993.
- BADARACCO, G. et al. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. **Journal of medical virology**, v. 67, n. 4, p. 574–82, ago. 2002.
- BARTOLI, J. et al. The normal uterus on magnetic resonance imaging and variations associated with the hormonal state. **Surgical Radiologic Anatomy**, v. 13, p. 213–220, 1991.
- BERGVALL, M.; MELENDY, T.; AR. THE E1 PROTEINS. **virology**, v. 141, n. 4, p. 520–529, 2013.
- BERNARD, B. A et al. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. **Journal of virology**, v. 63, n. 10, p. 4317–24, out. 1989.
- BERNARD, H.-U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071–6, 1 mar. 2006.
- BERUMEN, J. et al. and Risk for Cervical Cancer : a Case – Control Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 17, p. 1325–1330, 2001a.
- BERUMEN, J. et al. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case–Control Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 17, p. 1325–1330, 2001b.

- BIDUS, MA, Elkas JC. Cervical and Vaginal Cancer. 935 ed2007. 1403-53 p
- BOBEK, V. et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2010.
- BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33–39, 2011.
- BOSCH, F.; MANOS, M. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, 1995.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 55, p. 244–265, 2002.
- BOSCH, F. X. et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v. 26 Suppl 1, p. K1–16, 19 ago. 2008.
- BOSCH, F. X.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE SANJOSÉ, S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? **British journal of cancer**, v. 98, n. 1, p. 15–21, 15 jan. 2008.
- BOUKAMP PETRA; PETRUSSEVSKA RULE; BREITKREUTZ DIRK; HORNING JIRGEN; MARKHAM ALEX; FUSENIG NORBERT E. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. v. 106, n. March, p. 761–771, 1988.
- BROWN, D. R. et al. Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 9, p. 1183–1186, 2001.
- BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.
- BURK, R. D. et al. Distribution of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Variants in Squamous Cell Carcinomas and Adenocarcinomas of the Cervix Distribution of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Variants in Squamous Cell Carcinomas and Adenocarcinomas of the Cervix. **Cancer research**, p. 7215–7220, 2003.
- BURK, R. D. et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: General features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. **Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 20, n. 3, p. 113–123, 2011.
- BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v. 12, n. 5-6, p. 281–290, 2009.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 232–43, out. 2013.
- CAMBRUZZI, E.; ZETTLER, C. G.; ALEXANDRE, C. O. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma . **Pathol Oncol Res** , v. 11 , n. 2, p. 114–120, 2005.
- CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 110, n. 3 Suppl 2, p. S4–7, set. 2008.
- CAVALCANTI, S. M. B. et al. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **Journal of Infection**, v. 40, n. 1, p. 80–87, 2000.

- CERQUEIRA, D. M. et al. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. **Virus Genes**, v. 37, n. 2, p. 282–287, 2008.
- CHAKRABARTI, O. et al. Human Papillomavirus Type 16 E6 Amino Acid 83 Variants Enhance E6-Mediated MAPK Signaling and Differentially Regulate Tumorigenesis by Notch Signaling and Oncogenic Ras. **Journal of virology**, v. 78, n. 11, p. 5934–5945, 2004.
- CHAN, S. Y. et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. **Journal of virology**, v. 66, n. 4, p. 2057–2066, 1992.
- CHEN, A. A. et al. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. **Journal of Virology**, v. 88, n. 8, p. 4514–4521, 2015.
- CHEN, A. A. et al. Human papillomavirus 45 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. **Journal of virology**, v. 88, n. 8, p. 4514–21, abr. 2014.
- CHEN, Z. et al. Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. **Journal of virology**, v. 79, n. 11, p. 7014–7023, 2005.
- CHEN, Z. et al. Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. **Journal of virology**, v. 83, n. 3, p. 1443–55, fev. 2009.
- CHEN, Z. et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20183, jan. 2011.
- CHEUNG, J. L. K. et al. Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. **Gynecologic Oncology**, v. 131, n. 2, p. 374–379, 2013.
- CHRISTENSEN, N. D.; KREIDER, J. W. Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. **Virus Research**, v. 21, n. 3, p. 169–179, 1991.
- CIAPPONI, A. et al. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–15, 2011.
- CLIFFORD, G. M. et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: A pooled analysis. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 991–998, 2005.
- CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. **Journal of virology**, v. 86, n. 12, p. 6855–61, jun. 2012.
- CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. **Infectious agents and cancer**, v. 8, n. 1, p. 4, jan. 2013a.
- CORNET, I. et al. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. **British journal of cancer**, v. 108, n. 1, p. 240–4, 15 jan. 2013b.
- CRUZ, M. R. et al. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. May, p. 281–2, 2004.
- CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 21–34, out. 2013.

- DALING, J. R. et al. The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 5, n. 7, p. 541–548, 1996.
- DAVID, M. P. et al. Long-term persistence of anti-HPV-16 and -18 antibodies induced by vaccination with the AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: Modeling of sustained antibody responses. **Gynecologic Oncology**, v. 115, n. 3 SUPPL., p. S1–S6, 2009.
- DAY, P. M. et al. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 142–50, 1998.
- DE ARAUJO SOUZA, P. S. et al. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. **BMC cancer**, v. 8, p. 246, 2008.
- DE ARAUJO SOUZA, P. S.; SICHERO, L.; MACIAG, P. C. HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer. **Future oncology (London, England)**, v. 5, n. 3, p. 359–70, 2009.
- DE BOER, M. A et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. **Gynecologic oncology**, v. 94, n. 2, p. 488–94, ago. 2004.
- DE BOER, M. A. et al. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 3, p. 422–425, 2005.
- DE OLIVEIRA, C. M. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC cancer**, v. 13, p. 357, 2013.
- DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The lancet oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–56, nov. 2010.
- DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004.
- DE VILLIERS, E.-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 2–10, out. 2013.
- DE VINCENZO, R. et al. HPV vaccine cross-protection: Highlights on additional clinical benefit. **Gynecologic oncology**, v. 130, n. 3, p. 642–51, set. 2013.
- DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 99–114, out. 2013.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, maio 2006.
- DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 80–98, out. 2013.
- DOORBAR, J.; MEDCALF, E.; NAPHTHINE, S. Analysis of HPV1 E4 Complexes and Their Association with Keratins in Vivo. **Virology**, v. 126, n. 218, p. 114–126, 1996.
- DUENSING, S.; MÜNGER, K.; MU, K. Oncoprotein Can Induce Abnormal Centrosome Duplication through a Mechanism Independent of Inactivation of Retinoblastoma Protein Family Members Human Papillomavirus Type 16 E7

Oncoprotein Can Induce Abnormal Centrosome Duplication through a Mechanism Ind. v. 77, n. 22, p. 22–27, 2003.

DYSON, N. et al. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. **Journal of virology**, v. 66, n. 12, p. 6893–902, 1992.

EIFEL, P. J. T. W. B. M. M. AND T. L. Adenocarcinoma as an independent Risk Factor for disease recurrence in Patients with Stage IB Cervical Carcinoma.pdf. **Gynecologic oncology**, v. 59, 1995.

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

FAUQUET, CM; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned unassigned species. **Virology journal**, v. 10, p. 1–10, 2005.

FERENCZY, A. et al. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 169, n. 5, p. 431–434, 2003.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 1, p. 11–16, 2002.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893–2917, 2010.

FERLAY, J; FORMAN, D; MATHERS, BRAY, F. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. **The Lancet**, v. 378, n. 9801, p. 1461–1484, 2011.

FERNANDES, J. et al. Prevalence of human papillomavirus type 58 in women with or without cervical lesions in northeast Brazil. **Annals of medical and health sciences research**, v. 3, n. 4, p. 504–10, 2013.

FERNANDES, J. V. et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 6, p. 1321–1326, 2011.

FERNANDES, J. V et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil . **BMC Res Notes** , v. 3 , p. 96, 2010.

FLORIN, L. et al. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. **Virology**, v. 295, n. 1, p. 97–107, 30 mar. 2002.

FRANCO, E. L. et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1415–1423, 1999.

FREITAS, L. B. et al. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e100746, jan. 2014.

FUESSEL HAWS, A. L. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of virological methods**, v. 122, n. 1, p. 87–93, 1 dez. 2004.

GARFIELD, E. All Sorts of Warts-Separating fact from Fiction. Part 1. Etiology, biology and Research Mikstones. **Science Literacy, Policy, Evaluation, and other Essays**, v. 11, n. 9, p. 3–11, 1988.

GARLAND, S. M. et al. Noninferiority of antibody response to human papillomavirus type 16 in subjects vaccinated with monovalent and quadrivalent L1 virus-like particle vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 6, p. 792–795, 2007.

GHEIT, T. et al. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 20, n. 7, p. 1315–21, jul. 2011.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 4, p. 1310–1313, 1976.

GRAVITT, P. E. et al. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 3020–3027, 1998.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357–61, jan. 2000.

GRODZKI, M. et al. Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16 {E6-350G} Variant. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 4, p. 820–822, 2006.

GUAN, P. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, n. 10, p. 2349–59, 15 nov. 2012.

GUIMERA, N. et al. The Occasional Role of Low-risk Human Papillomaviruses Laser Capture Microdissection / PCR Methodology. **Am J Surg Pathol**, v. 37, n. 9, p. 1299–1310, 2013.

GUIMERA, N. et al. Laser capture microdissection shows HPV11 as both a causal and a coincidental infection in cervical cancer specimens with multiple HPV types. **Histopathology**, v. 63, n. 2, p. 287–292, 2013.

GUVEN, S. et al. The underlying cause of cervical cancer in oral contraceptive users may be related to cervical mucus changes. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 3, p. 550–552, 2007.

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

HARARI, A. et al. Cross-protection of the Bivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Against Variants of Genetically Related High-Risk HPV Infections. **Journal of Infectious Diseases**, p. jiv519, 2015.

HARPER, D. M. et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet (London, England)**, v. 364, n. 9447, p. 1757–65, 2004.

HARPER, D. M. et al. Sustained efficacy up to 4??5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1247–1255, 2006.

HAUSEN, H. Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. **Cancer research**, 1976.

HERFS, M. et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 10516–21, 26 jun. 2012.

HILDESHEIM, A et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British journal of cancer**, v. 84, n. 9, p. 1219–1226, 2001.

HINES J F, S.J. GHIM, N.D CHRISTENSEN, JW KREIDER, W.A BARNES, R. SCHLEGEL, A. . J. Role of Conformational Epitopes Expressed by Human Papillomavirus Major Capsid Proteins in the Serologic Detection of Infection and Prophylactic Vaccination.pdf. **Gynecologic oncology**, v. 55, p. 13–20, 1994.

HO, L. et al. Sequence Variants of Human Papillomavirus Type-16 in Clinical-Samples Permit Verification and Extension of Epidemiologic Studies and Construction of a Phylogenetic Tree. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 9, p. 1765–1772, 1991.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **Journal of virology**, v. 16, p. 6413–6423, 1993.

HOPKINS, M. P. A Comparasion of Adenocarcinoma and Squamous Cell CArcinoma of the Cervix .pdf. **Obstetrics and Gynecology**, v. 77, n. 6, p. 6, 1991.

IARC. Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed. **International Agency for Research on Cancer, World Health Organization**, n. December, p. 2012–2014, 2013.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

JACKSON, SARA; HARWOOD, CATHERINE; THOMAS, M. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p. 3065–3073, 1 dez. 2000.

JIANG, M. et al. Identification of recombinant human papillomavirus type 16 variants. **Virology**, v. 394, n. 1, p. 8–11, 2009.

JUNES-GILL, K. et al. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. May, p. 1639–1645, 2008.

KABSCH, K.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 (HPV-16) E5 protein sensitizes human keratinocytes to apoptosis induced by osmotic stress. **Oncogene**, v. 21, n. 6, p. 947–953, 2002.

KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 12180–4, 15 dez. 1992.

KIYONO, T. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**, v. 396, n. 6706, p. 84–88, 1998.

LEE, K. B. et al. What is the difference between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix? A matched case-control study. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 4, p. 1569–1573, 2006.

LEHN, H. et al. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. **J Gen Virol**, v. 69 (Pt 1), p. 187–196, 1988.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 4, p. 927–935, 2011.

LICHTIG, H. et al. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. **Virology**, v. 350, n. 1, p. 216–27, 20 jun. 2006.

LOPERA, E. A. et al. Unexpected inverse correlation between Native American ancestry and Asian American variants of HPV16 in admixed Colombian cervical cancer cases. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 339–348, 2014.

LUCKETT, R.; FELDMAN, S. Impact of 2-, 4- and 9-valent HPV vaccines on morbidity and mortality from cervical cancer. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 5515, n. November, 2015.

MANAVI, M. et al. Human papillomavirus DNA integration and messenger RNA transcription in cervical low- and high-risk squamous intraepithelial lesions in Austrian women. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 18, n. 2, p. 285–294, 2008.

MANTA, F. S. DAS NE et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

MARSH, M. Original_Site_of_Cervical_Carcinoma__Topographical.15[1].pdf. **Obstetrics and Gynecology**, v. 7, n. 4, 1956.

MATSUKURA, T.; SUGASE, M. Pitfalls in the epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer using polymerase chain reaction: driver and passenger. **International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 18, n. 5, p. 1042–50, 2008.

MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 57–79, out. 2013.

MEJLHEDE, N.; BONDE, J.; FOMSGAARD, A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. **Apmis**, v. 117, n. 2, p. 108–114, 2009.

MÜNGER, K. The role of human papillomaviruses in human cancers. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 7, n. November 2014, p. d641–d649, 2002.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. **Journal of virology**, v. 78, n. 21, p. 11451–11460, 2004.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518–527, 2003.

NEAD, M.; BAGLIA, L.; ANTINORE, M. Rb binds c-Jun and activates transcription. **The EMBO ...**, v. 17, n. 8, p. 2342–2352, 1998.

NISHIMURA, A. et al. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. **Journal of virology**, v. 74, n. 8, p. 3752–60, 2000.

NORONHA, V. et al. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 3, p. 235–240, 1999.

ODIDA, M. et al. Comparison of human papillomavirus detection between freshly frozen tissue and paraffin embedded tissue of invasive cervical cancer. **Infectious agents and cancer**, v. 5, p. 15, 2010.

OLIVEIRA, L. H. S. et al. Human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 279–85, 2006.

OLSSON, S.-E. et al. Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with serological evidence of prior vaccine type HPV infection. **Human vaccines**, v. 5, n. 10, p. 696–704, 2009.

ONG, C. K. et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. **Journal of virology**, v. 67, n. 11, p. 6424–31, nov. 1993.

ORTH, G. Identification of Human Papillomaviruses in Butchers' Warts.pdf. **The journal of investigative dermatology**, v. 76, n. 2, 1981.

PAAVONEN, J. et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9580, p. 2161–2170, 2007.

PAPANICOLAOU, G. A new procedure for staining vaginal smears. **Science**, v. 95, n. 2469, p. 438–439, 1942.

PEREIRA, R. et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

PÉREZ, S. et al. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 lineages in Galicia, Spain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–10, 2014.

PEYTON, C. L. et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 11, p. 1554–1564, 2001.

PINHEIRO, N. A.; VILLA, L. L. Low frequency of p53 mutations in cervical carcinomas among Brazilian women. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 727–733, 2001.

PIROG, E. C. et al. Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Different Histological Subtypes of Cervical Adenocarcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 4, p. 1055–1062, 2000.

PITTA, D. R. et al. [Prevalence of HPV 16, 18, 45 and 31 in women with cervical lesions]. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia: revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 315–20, 2010.

- RABELO-SANTOS, S. H. et al. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181–184, 2003.
- RABELO-SANTOS, S. H. et al. Human papillomavirus-specific genotypes in cervical lesions of women referred for smears with atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ. **Int J Gynecol Pathol**, v. 28, p. 272–278, 2009.
- RIBEIRO, A. A. Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal. **Universidade Federal de Goiás**, 2009.
- RICHARD, C. et al. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 23, p. 3435–45, 10 jun. 2010.
- ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 138–68, out. 2013.
- ROSA, M. I. DA et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953–964, 2009.
- SAINI, R.; SHEN, T. H. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) Method and Hybrid Capture II (HCII) Assay for the Detection of Human Cervical Scrapings Papillomavirus. **Medical Journal Of Malaysia**, v. 62, n. 3, p. 206–209, 2007.
- SARAIYA, M. et al. Type-specific HPV and Pap test results among low-income, underserved women: Providing insights into management strategies. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 211, n. 4, p. 354.e1–354.e6, 2014.
- SCHIFFMAN, M. et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus (HPV) variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer research**, v. 70, n. 8, p. 3159–3169, 2010.
- SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. **JNCI Monographs**, v. 20852, n. 31, 2003.
- SERRANO, B. et al. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). **Cancer Epidemiology**, v. 38, n. 6, p. 748–756, 2014.
- SHANG, Q. et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in identification of cervical carcinomas in patients in northeast China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2656–2663, 2011.
- SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–8, 15 abr. 2007.
- SICHERO, L.; SOBRINHO, J. S.; VILLA, L. L. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. **Virology**, v. 432, n. 1, p. 127–32, 10 out. 2012.
- SMITH, A.; SHERMAN, M. Review of the Bethesda System Atlas Does Not Improve Reproducibility or Accuracy in the Classification of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Smears. **Cancer cytopathology**, n. December 1988, 2000.
- SNIJDERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **Apmis**, v. 118, n. 6-7, p. 520–528, 2010.

SOTO-DE LEON, S. et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

SPANGLE, J. M.; MÜNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. **Journal of virology**, v. 84, n. 18, p. 9398–407, 2010.

STÖPPLER, H. et al. The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. **Oncogene**, v. 17, n. 10, p. 1207–14, 1998.

STRAIGHT, S.; HINKLE, P. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. **Journal of virology**, v. 67, n. 8, p. 4521–4532, 1993.

TANG, S. et al. oncoprotein is translated from spliced E6* I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16-or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. **Journal of virology**, v. 80, n. 9, p. 4249–4263, 2006.

TAVARES, M. C. M. et al. Chlamydia trachomatis infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. **Molecular Biology Reports**, p. 1–10, 2014.

TENTI, P. et al. Human papillomavirus types 16 and 18 infection in infiltrating adenocarcinoma of the cervix: PCR analysis of 138 cases and correlation with histologic type and grade. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 106, n. 1, p. 52–56, 1996.

THIERRY, F.; YANIV, M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. **The EMBO journal**, v. 6, n. 11, p. 3391–7, 1987.

TRAUT, H.; PAPANICOLAOU, G. CANCER OF THE UTERUS: THE VAGINAL SMEAR IN ITS DIAGNOSIS. **California and western medicine**, p. 121–122, 1943.

TSAO, S.-W. et al. Characterization of Human Ovarian Surface Epithelial Cells Immortalized by Human Papilloma viral oncogenes. **Experimental cell research**, v. 218, 1995.

VELDMAN, T.; HORIKAWA, I. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **Journal of virology**, 2001.

VILLA, L. L. et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **British journal of cancer**, v. 95, n. 11, p. 1459–1466, 2006.

VILLA, L.; SICHERO, L. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **Journal of General Virology**, p. 2959–2968, 2000.

VIZCAINO A, PALOMA, MORENO,VICTOR; BOSCH,F. XAVIER; MUNOZ, NUBIA; BARROS-DIOS, X. M. P. AND D. M. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and Adenosquamous Cell Carcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 545, n. October 1997, p. 536–545, 1998.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

- WANG, S. S. et al. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, p. 20–30, 2009.
- WANG, X. et al. Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 16, p. 8080–92, 2011.
- WERNESSE, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4951, p. 76–9, 1990.
- WHEELER, C. M. HPV genotypes: implications for worldwide cervical cancer screening and vaccination. **The lancet oncology**, v. 11, n. 11, p. 1013–4, nov. 2010.
- WOODMAN, C. . et al. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. January, p. 11–22, 2007.
- WU, Y. et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 5, p. 1181–1188, 2006.
- XI, L. F. et al. Genomic Variation of Human Papillomavirus Type 16 and Risk for High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Long. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 11, 1997.
- XI, L. F. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 15, p. 1045–52, 2 ago. 2006.
- XI, L. F. et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 1, p. 4–10, 2007.
- YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **Journal of virology**, v. 71, n. 3, p. 2463–2472, 1997.
- ZEHBE, I. et al. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 94, n. 5, p. 711–716, 2001.
- ZEHBE, I. et al. Human Papillomavirus 16 E6 Variants Differ in their Dysregulation of Human Keratinocyte Differentiation and Apoptosis. **virology**, v. 383, n. 1, p. 69–77, 2010.
- ZERFASS, K. et al. Cell cycle-dependent disruption of E2F-p107 complexes by human papillomavirus type 16 E7. **The Journal of general virology**, v. 76 (Pt 7), p. 1815–1820, 1995.
- ZERFASS, K.; SCHULZE, A.; SPITKOVSKY, D. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. **Journal of ...**, v. 69, n. 10, p. 6389–6399, 1995.
- ZHANG, B.; SPANDAU, D. F.; ROMAN, A. E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. **Journal of virology**, v. 13, n. 1, p. 220–231, 2002.
- ZUNA, R. E. et al. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 11, p. 2609–2613, 2009.

ZUNA, R. E. et al. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. **Infectious agents and cancer**, v. 6, p. 19, jan. 2011.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. **Cancer Research**, v. 36, n. 794, p. no pagination, 1976.

ZUR HAUSEN, H. PAPILLOMAVIRUSES AND CANCER: FROM BASIC STUDIES TO CLINICAL APPLICATION. **Nature Publishing Group**, v. 2, n. May, p. 342–350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 32, p. 5798–5808, 2009.

ZUR HAUSEN, HARALD; DE VILLIERS, E.-M. Human papilloma viruses. **Retrovirology**, v. 9, n. 108, p. l23, 1994.

9. Apendices

9.1. Artigo publicado, como primeiro autor, em periódico indexado com índice de impacto Qualis B1 da área Medicina I da CAPES

Journal of Medical Virology

Genetic Diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian Patients With Invasive Cervical Cancer

Joao Paulo C.B. Vidal,¹ Shayany Pinto Felix,¹ Cláudia B.P. Chaves,¹ Patrícia Patury,² Vanessa F. Franco,² Evaneide A. de Moraes,² Neile A. de Carvalho,³ Aurenice C.L. Carvalho,³ Olimpio F. Almeida Neto,² Lina Maria T.M. Vieira,² Flavia Miranda Correa,² Luis Felipe Leite Martins,³ Antonio Negrão,³ Liz Maria de Almeida,³ and Miguel Angelo Martins Moreira^{1*}

¹Genetics Program, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, Brazil

²Gynecologic Oncology Department, Cancer Hospital II, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, Brazil

³Populational Research Department, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, Brazil

Genetic Diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian Patients With Invasive Cervical Cancer

João Paulo C.B. Vidal,¹ Shayany Pinto Felix,¹ Cláudia B.P. Chaves,¹ Patrícia Patury,² Vanessa F. Franco,² Evaneide A. de Moraes,² Neile A. de Carvalho,² Aurenice C.L. Carvalho,³ Olimpio F. Almeida Neto,² Lina Maria T.M. Vieira,² Flavia Miranda Correa,² Luis Felipe Leite Martins,³ Antonio Negrão,³ Líz Maria de Almeida,² and Miguel Angelo Martins Moreira^{1*}

¹Genetics Program, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, Brazil

²Gynecologic Oncology Department, Cancer Hospital II, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, Brazil

³Populational Research Department, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, Brazil

Cervical cancer is the fourth most common cancer among women, and ~70–80% of these cancers are associated with two human papillomavirus types: HPV16 and HPV18. Several studies have reported that intra-type diversity is associated with the progression of infection to invasive cancer. Herein, we report the genetic diversity of HPV16 and HPV18 in a cohort of 594 Brazilian women with invasive cervical cancer and describe the prevalence of lineages and intra-type diversity prior to the implementation of the public immunization program in Brazil. HPV detection and genotyping were performed using PCR, PGM/GP primers, and DNA extracted from fresh tumors. The HPV16 (378 women) and HPV18 (80 women) lineages were identified by PCR and sequencing of the LCR and E6 fragments, followed by SNV comparison and phylogenetic analysis. In our cohort, was found a higher frequency of the lineage A (in 217 women), followed by lineage D (in 97 women) and lineages B and C (in 10 women each) for HPV16; and a higher frequency of lineage A (in 56 women) followed by lineage B (in 15 women) in HPV18. The genetic diversity of HPV16 indicated a recent expansion of specific variants or a selective advantage that is associated with invasive cancer; this pattern was not observed for HPV18. *J. Med. Virol.* © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HPV genetic diversity; human papillomavirus type 16; human papillomavirus type 18; HPV lineages

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer among women worldwide; 527,624 new cases occur each year, and this cancer exhibits a mortality rate of 265,672/year. In developing countries, this cancer ranks second after breast cancer in women (Globocan 2012, IARC, <http://globocan.iarc.fr>). In Brazil, ~15,590 new cases of invasive CC were expected in 2014, with an estimated incidence of 15.33 cases per 100,000 women (INCA, 2014).

Human papillomavirus (Family: *Papillomaviridae*) (HPV) presence is considered necessary but not sufficient for cervical cancer development (Bosch et al., 2002). Papillomaviruses are classified based on L1 gene divergence. More than 200 HPV genomes have been completely sequenced (Human Papillomavirus Reference Center, <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>), and papillomavirus type is defined by sequence differences in the L1 region of greater than 10% (De Villiers, 2013). Burk et al. (2013) proposed a classification and a nomenclature (adopted herein) for intratype diversity based on the divergence of complete HPV genome sequences into

Grant sponsor: INCT for Cancer Control; Grant sponsor: Pan-American Health Organization (PAHO/OMS); Grant sponsor: Ministry of Health; Grant sponsor: The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil); Grant sponsor: Carlos Chagas Filho Research Support Foundation (FAPERJ, Brazil)

Conflicts of interest: None.

*Correspondence to: Miguel Angelo Martins Moreira, Genetics Program, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva, André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20231-050 E-mail: miguelm@inca.gov.br

Accepted 19 December 2015

DOI 10.1002/jmv.24458

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

lineages (with 1–10% divergence) and sublineages (with 0.5–1% divergence).

An epidemiological classification has been proposed based on the association of different HPV types with the risk of cervical cancer development. This classification groups HPVs as follows: (i) oncogenic (or high risk HPV), including types that are more frequently associated with cancer; (ii) probably/possibly oncogenic (or low risk HPV), including types that are more frequently associated with benign epithelial proliferations in the genital area and less frequently associated with cancer; and (iii) undefined risk HPV, including viruses with incomplete epidemiological data for defining risk with respect to association with cervical cancer [Muñoz et al., 2003]. Fifteen genotypes are classified as oncogenic. Among these types, HPV16 (Family: *Papillomaviridae*; Genus: *Alphapapillomavirus*; Species: 7) and HPV18 (Family: *Papillomaviridae*; Genus: *Alphapapillomavirus*; Species: 9) are found in ~70% of all cervical cancer cases worldwide [Bosch et al., 2008]. Oncogenic HPV types 16 and 18 are highly prevalent not only in cancer patients but also in women with normal cervical cytology and cervical lesions [Bruni et al., 2010].

A small proportion of oncogenic infections are persistent and progress to invasive cancer; however, the factors associated with progression are poorly understood. One important hypothesis suggested by several studies relates to intra-type diversity [Sichero et al., 2007; Gheit et al., 2011; Smith et al., 2011; Arroyo et al., 2012; Cornet et al., 2013; Chen et al., 2014]. These studies suggested that intra-type lineages differ in their biological characteristics and pathogenicity. For example, the sublineage B2 of HPV45 is associated with a higher risk for cervical cancer development than other sublineages [Chen et al., 2014].

Previous studies have suggested the existence of four major lineages of HPV16 and HPV18, which were initially named based on their frequencies in different human populations [Ho et al., 1993; Ong et al., 1993; Yamada et al., 1997]. Burk et al. [2013] modified this nomenclature by grouping HPV16 variants into four major lineages: A, formerly named the European and Asian (EAS) lineage; B, formerly named the African 1 (AF1) lineage; C, formerly named the African 2 (AF2) lineage; and D, encompassing the formerly named North-American and Asian-American (NA and AA, respectively) lineages. Burk et al. [2013] grouped HPV18 variants into three lineages: A, encompassing the previously named Asian-American and European lineages; and B, and C (both including the formerly African lineage, Af).

Few Brazilian studies have studied HPV16 and HPV18 intra-type variants [Villa et al., 2000; Cruz et al., 2004; Sichero et al., 2007; Cerqueira et al., 2008; Jones-Gill et al., 2008; Sichero et al., 2012; Freitas et al., 2014], and almost no studies have investigated samples obtained from invasive cancer [Jones-Gill et al., 2008]. Interest in HPV16 and HPV18 intra-type diversity has been increasing in

recent years due to reports suggesting an interaction between host and viral characteristics influencing the natural history of infection and the prognosis of lesions at different stages [de Araujo Souza et al., 2008, 2009; Lopera et al., 2014].

It is important to underline that the papillomaviruses are a double-strand DNA viruses with a lower mutation rate when compared to RNA viruses, which makes the occurrence of vaccine escape mutations improbable [Schiller and Lowy, 2012]. Additionally, Harari et al. [2015], in a study carried out in Costa Rica, did not find differences in the bivalent vaccine efficacy in respect to different lineages of HPV16 and HPV18. However, the same authors ponder that this conclusion did not take into account the presence of rare variants and the HPV diversity found in other populations. Based on this perspective and the advent of prophylactic vaccines against HPV16/18 and cervical cancer, it has become necessary to identify the HPV genetic variants that are present in populations of interest to verify in the coming years if vaccination will be effective against all lineages and variants of HPV16 and HPV18. This is particularly true in developing countries, where cervical cancer is a serious public health problem, and limited data are available regarding HPV genetic intra-type diversity.

Here, we studied the genetic diversity of HPV16 and HPV18 associated with invasive cervical cancer. We describe the prevalence of lineages and intra-type diversity based on the genetic variability of two genomic regions: E6 and the long control region (LCR). The study examined a cohort of 594 women who were diagnosed with cervical cancer and enrolled between July 2011 and April 2014 for treatment at the Instituto Nacional de Câncer (Brazil) before the implementation of the HPV vaccination program by the Brazilian Public Health System in March 2014.

METHODS

Subjects and Samples

This study was approved by the local Ethics Committee, and all participants signed an informed consent form. Patients included in this study comprised a cohort of 594 women who were diagnosed with invasive cervical cancer and enrolled consecutively at the Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, between July 2011 and March 2014. Of these women, 456 (76%) were identified as being infected with HPV16 and HPV18. In the HPV16+ group, 37% of the patients were residents of the City of Rio de Janeiro and 63% lived in adjacent regions within the state; the mean age of the patients was 48 years (range 19–93 years). In the HPV18+ group, 31.6% were residents of the City of Rio de Janeiro and 68.4% lived in adjacent regions; the mean age was 46 years (range 21–77 years).

Fresh tumor biopsies (stages 1B to 4) were stored in RNA-Later at -80°C . Total DNA was isolated using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

according to the manufacturer's instructions, eluted in 200 µl AE buffer, and stored at -80°C.

HPV Detection and Genotyping

HPV DNA presence was detected using the polymerase chain reaction (PCR) with the primer set PGMY09/11 [Gravitt et al., 2000]. When this reaction yielded negative results, HPV DNA presence was detected using nested PCR with the primer sets PGMY09/11 (first round PCR) and GP5+/GP6+ (second round PCR, Fuessell Haws et al. [2004]); these primers amplify a segment of the *L1* gene. DNA samples from Caski and HeLa cells were used as positive controls. PCR products amplified using PGMY09/11 or GP5+/GP6+ were purified using the GFX PCR and DNA Band Purification kit (GE Healthcare), labeled using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), and analyzed using an ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All sequences were edited and analyzed using 4Peaks Software (Nucleobytes, Amsterdam, Netherlands). HPV genotypes were identified using the BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

LCR and E6 Amplification and DNA Sequencing

To characterize the HPV16 and HPV18 lineages, the contiguous *LCR* and *E6* genomic regions of the HPV genome were analyzed using overlapping PCR products along a region of ~1,300 bp. DNA samples were subjected to PCR amplification of the *LCR* and *E6* regions using HPV type-specific primers for each region (Table I). PCR reactions were performed in 25 µl mixtures containing 1×PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 µM of each dNTP, 100 pmol/l of each primer, 50–100 ng of DNA, and 2.5 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies). Amplifications were performed as follows: 95°C for 10 min; followed by 40 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at the annealing temperature (T_m, see Table I), and 1 min at 72°C; followed by a final extension at 72°C for 15 min. The resulting PCR products were subsequently purified and sequenced as described above. The consensus sequences were assembled using Geneious software (Biomatters Ltd.), and all sequences were aligned with lineage-specific reference sequences [Burk et al.,

2013] using MEGA (version 6: www.megasoftware.net). All sequences were deposited in GenBank under accession numbers KP965018–KP965162 for HPV16 and KP965163–KP965195 for HPV18.

Lineage Identification, Phylogenetic Analysis, and Haplotype Characterization

The HPV16 and HPV18 lineages were identified based on sequences obtained from high-quality *LCR* and *E6* electropherograms. Two strategies were employed. First, HPV16 lineages were identified based on single nucleotide variants (SNVs) at specific *LCR* and *E6* sites according to the method of Cornet et al. [2012], and HPV18 lineages were characterized by identifying lineage-distinctive SNVs [Arias-Pulido et al., 2005; Arroyo et al., 2012]. Second, a phylogenetic reconstruction was performed using a dataset of 1,300 bp *LCR* + *E6* sequences, including the reference sequences proposed by Burk et al. [2013]. Haplotype identification was performed using DNAsp version 5, maximum likelihood analysis was carried out using PHYLML 3.0 [Guindon et al., 2010], and the general time reversible model GTR+I+G was inferred using the software package ModelGenerator v.0.85 [Kearse et al., 2006]. Group support was estimated by bootstrap estimates based on 10,000 replicates. The reference sequences were as follows: K02718 (REF-SEQ, lineage A), AF536179 (lineage A), HQ644236 (lineage A), AF534061 (lineage A), AF536180 (lineage B), HQ644298 (lineage B), AF472509 (lineage C), HQ644257 (lineage D), AY686579 (lineage D), and AF402578 (lineage D) for HPV16; and AY262282 (REF-SEQ, lineage A), EF202146 (lineage A), EF202147 (lineage A), EF202151 (lineage A), GQ180787 (lineage A), EF202152 (lineage B), EF202155 (lineage B), KC470225 (lineage B), and KC470229 (lineage C) for HPV18.

Median-joining (MJ) network topologies were constructed using NETWORK 4.6.1.1 [Bandelt et al., 1999]. Molecular diversity indices (haplotype diversity and nucleotide diversity) estimates and Fu's F_s test for selective neutrality were performed using Arlequin 3.5 [Excoffier and Lischer, 2010].

RESULTS

The study population comprised 594 women who were diagnosed with invasive cervical carcinoma and

TABLE I. Primers Used for PCR Amplification of *LCR* and *E6* Regions of HPV16 and HPV18, the Respective Annealing Temperatures, and Annealing Positions at the Genomic Reference Sequences

Primer	Sequence (5'-3')	T _m	Ref. Seq	Genomic position
LCR F HPV 16	CACCCACCACTCATCTACC	56°C	K02718.1 HPV16	7100–7120
LCR R HPV 16	CACACACCATGTGTCAGTTT			7835–7855
E6 F HPV 16	CACATATTTTGGCTTGT	50°C		7701–7720
E6 R HPV 16	GGAGATACACCTACATTGCATGAA			570–592
LCR F HPV 18	TCTAAACCTGCCAAGCGTGT	56°C	AY262282 HPV18	7095–7115
LCR R HPV 18	ATGTGATGCCCAACCTATTT			7825–7845
E6 F HPV 18	GTTCCTTTGGCTTATGCTCTG	56°C		7468–7488
E6 R HPV 18	TTGCCTTATGGTCCATGCATAC			587–607

attending the Department of Gynecology of the Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, between June 2011 and March 2014. After the patients signed informed consent forms and answered an epidemiological questionnaire, tumoral biopsies were collected and identified with respect to HPV type using PCR and *LI* genomic region sequencing. HPV16 was the most frequent viral genotype and was identified in 378 samples (63.6%); the next most frequent genotype was HPV18 (80 samples, 13.4%). HPV45, HPV35, HPV68, HPV52, HPV73, HPV31, HPV33, HPV59, HPV39, HPV26, HPV51, HPV56, HPV68, and HPV83 were also identified in the cohort. Multiple infections were detected in 4% of cases, being 13 samples co-infected with both HPV16 and HPV18. These samples were not used in the present study and these data will be published elsewhere.

HPV16 Variant Characterization

To identify HPV16 variants, a 1,310bp region of the HPV16 genome was sequenced based on two overlapping PCR products (from nucleotides 7,157 to 559) corresponding to *LCR* and *E6*. The *LCR* and *E6* regions were completely or partially sequenced in 334 samples. Coinfection by two HPV16 lineages was detected by the overlapping of sequence peaks at specific nucleotide positions (SNV signatures) in two samples (both co-infected with lineages A and D), and PCR amplification was unsuccessful for one or both regions in 42 samples, probably due to failed primer annealing or to a small proportion of HPV DNA in the sample. Data from these 44 samples were excluded from subsequent analyses.

Identification of the HPV16 lineages was based on nucleotide signatures resulting from single nucleotide variants (SNVs) at 46 specific genomic sites as proposed by Cornet et al. [2012]. Of the 334 samples, 306 fell within the nine 46-nucleotide signatures proposed by Cornet et al. [2012]. However, 28 samples were not strictly concordant with any nucleotide signature proposed by these authors and exhibited a minimal amount of discordance ranging from 1/46 to 6/46 positions. Despite these discordances, 334 samples were allocated to one of the four HPV16 major lineages based on the nucleotides present at the diagnostic positions and on the overall similarity with any of the nine signatures. Lineage A was the most frequent lineage (217 samples, or ~57% of the HPV16 samples), followed by lineages D (97 samples, or ~25%), and B and C (10 samples each, or ~5%) (Table II).

Patients sharing HPV16 haplotypes were identified by haplotyping 314 of the 334 samples. HPV16 sequences from 20 patients were excluded because data regarding the ends of *LCR* and/or *E6* were unreliable. A total of 125 haplotypes were identified (Supplemental Table S1a), including 96 variants present in single patients and 29 variants shared by at least two patients. The four most frequent haplotypes, which were present in approximately 40% of

TABLE II. Number of Samples Identified for Lineages of HPV16 and HPV18 in Respect to Tumor Histological Type

LINEAGES	SCC	ADC	Others	Total (%)
HPV16				
A	175	24	18	217 (57.4)
B	10	0	0	10 (2.6)
C	9	1	0	10 (2.6)
D	78	15	4	97 (25.5)
ND	31	7	6	45 (11.9)
HPV18				
A	33	17	5	55 (70)
B	7	5	4	16 (18.7)
ND	6	2	1	9 (11.3)

SCC, squamous cell carcinoma; ADC, adenocarcinoma; Others, other histological types; ND, lineages not determined.

the samples, were Hap09 (from lineage A; 68 patients), Hap11 (from lineage D; 40 patients), Hap47 (from lineage A; 12 patients), and Hap04 (from lineage D; 11 patients) (Supplemental Table S1a).

A maximum likelihood (ML) topology tree was constructed based on the 125 haplotypes (Supplemental Fig. S1a) and the reference sequences for each lineage proposed by Burk et al. [2013]. Most haplotypes were grouped consistently with their lineage identification based on the SNV signatures proposed by Cornet et al. [2012]; the exceptions were the haplotypes allocated in lineages B and C. These 20 haplotypes do not form two monophyletic groups respective to lineages B and C.

The network arrangement (Fig. 1) was also in agreement with the ML topology and SNV signatures and showed that the three most frequent haplotypes occupied a central position with a star-like pattern in lineages A (Hap09 and Hap47) and D (Hap11). Most of the other, less frequent haplotypes diverged from these central haplotypes by one and two nucleotide substitutions. Haplotypes from lineages B and C did not exhibit a star-like pattern, indicating a larger divergence between haplotypes. The molecular diversity indices (haplotype diversity and nucleotide diversity) and Fu's F_s [Fu, 1997] test based on 314 samples are shown in Table III. The Fu's F_s test (-23.85 , $P=0.004$) suggests that the HPV16 viral population associated with invasive cancer had undergone a recent population expansion or that specific haplotypes were subject to positive selection.

E6 contained 19 amino acid changes with respect to the prototype sequence (Supplemental Table S1c), seven of which have previously been described. The twelve novel amino acid substitutions were D25G, D25A, E29A, D65Y, D64N, S71C, D98H, H126P, N127K, R131L, S138F, and R144T. The variant L83V of HPV16 E6 was shared by all haplotypes of lineage D and by 31 haplotypes of lineage A (14%).

HPV18 Variant Characterization

Of the 80 HPV18 samples, nine were excluded from the analyses due to the unsuccessful PCR amplification of *LCR* and/or *E6*. For the remaining 71 samples,



Fig. 1. Network topology of the 125 HPV16 haplotypes. Lineages are indicated using the following colors: orange, lineage A; light green, lineage B; dark green, lineage C; and blue, lineage D. Each circle corresponds to one of the 125 haplotypes, and the circle diameter is proportional to the number of samples sharing each haplotype. The lines connecting the circles indicate at least

one nucleotide substitution. Haplotypes that differ by more than one substitution are indicated by a number (corresponding to the number of substitutions) written beside the connecting line. The three more frequent haplotypes are indicated: Hap09 ($n = 68$), Hap11 ($n = 40$), and Hap47 ($n = 12$). All haplotypes from lineages B and C were indicated.

lineage identification was based on an approach similar to that used for HPV16; that is, based on sequencing a region encompassing *LCR* and *E6* and identifying nucleotide signatures based on the SNVs described by Arias-Pulido et al. [2005] and Arroyo et al. [2012]. Fifty-five samples (~70 % of the HPV18

samples) were identified as belonging to lineage A and 16 samples (~19 % of the HPV18 samples) were identified as belonging to lineage B (Table II). The HPV18-distinctive SNVs for lineages A, B, and C affected nine nucleotide positions in *LCR* (A7152G, C7161T, C7164G, C7185T, C7496G, G7512A, T7530C, T7651C, and T7704C) and three nucleotide positions in *E6* (T251C, G374A, and A548G). Additionally, a 7-bp deletion in the *LCR* region was shared by all haplotypes of lineages B and C (Supplemental Table S1b).

Thirty-three haplotypes were identified among the 71 samples; of these, 15 occurred in at least two patients ($n = 53$ patients) and 18 occurred in 18 patients. The most frequent haplotype was Hap22 (from HPV18 lineage A; 10 patients), followed by Hap12 (from HPV18 lineage A; 6 patients), and Hap33 (from HPV18 lineage B; 6 patients). These

TABLE III. Molecular Diversity Indexes Estimated for HPV16 and HPV18

	HPV16	HPV18
Number of samples	314	71
Number of haplotypes	125	33
Haplotype diversity	0.932	0.958
Nucleotide diversity	0.084	0.01
Fu's F_s test	-23.86 ($P = 0.004$)	-4.11 ($P = 0.156$)

three haplotypes were present in ~31% of the patients (Supplemental Table S1b).

The ML phylogenetic analysis was consistent with the identification based on SNV signatures and showed haplotype groupings in two lineages (Supplemental Fig. S1b): lineages A and B. This analysis indicated that lineages A and B formed two well-supported groups, each showing a maximum divergence of 2% between haplotypes.

The network median-joining topology (Fig. 2) showed that the most frequent haplotypes occupied a central, star-like position surrounded by less frequent haplotypes, but in a configuration that was not as evident as that observed for HPV16. The molecular diversity indices (haplotype diversity and nucleotide diversity) and Fu's F_s test based on the 71 samples are shown in Table III. The Fu's F_s test was negative but not significant (Fu's $F_s = -4.11$; $P = 0.156$) and provided

no evidence of recent viral population expansion or positive selection.

E6 contained two previously described amino acid substitutions with respect to the prototype sequence: Y72H in one haplotype [Wang et al., 2009] and N129K in all of the B and C haplotypes [De Boer et al., 2004]. Additionally, four previously undescribed amino acid substitutions were found: H80Y (in one haplotype), H133P (in two haplotypes), Y134F (in one haplotype), and R144Q (in one haplotype) (Supplemental Table S1d).

DISCUSSION

Several reports have associated population origin, persistence of infection, risk of cervical intraepithelial neoplasia, and risk for cervical invasive cancer with specific HPV16 and HPV18 lineages [Berumen et al., 2001; Burk et al., 2003; Xi et al., 2006; Sichero et al.,



Fig. 2. Network topology of the 33 HPV18 haplotypes. Lineages are indicated using the following colors: orange, lineage A and green, lineage B. Each circle corresponds to one of the 33 haplotypes, and the circle diameter is proportional to the number of samples sharing each haplotype. The lines connecting

the circles indicate at least one nucleotide substitution. Haplotypes that differ by more than one substitution are indicated by a number (corresponding to the number of substitutions) written beside the connecting line. The three more frequent haplotypes are indicated: Hap22 ($n = 10$), Hap12 ($n = 6$), and Hap33 ($n = 6$).

2012], indicating different prevalences of these lineages among populations. In this study, HPV16 lineages A and D and HPV18 lineage A were the most prevalent. Previous reports showed that these HPV lineages are the most prevalent lineages in European populations (HPV16 lineage A and HPV18 lineage A) and in populations of Amerindian ancestry (HPV16 lineage D), being lineages B and C from HPV16 and HPV18 most prevalent in African continent [Ho et al., 1993; Ong et al., 1993; Yamada et al., 1997]. The genetic background of the Rio de Janeiro metropolitan region population is highly mixed, mostly of European and African ancestry (55% and 31%, respectively) with a lower proportion of Amerindian ancestry (14% based on autosomal genetic markers, Manta et al. [2013]). Taking into account the contribution of these population-groups to the formation of the current population of the Rio de Janeiro metropolitan region, we expected a larger prevalence of HPV16 B and C lineages and HPV18 B and C lineages. However, it is important to take into account that a direct association between the human ancestry and HPV lineage is not necessarily expected in a population with ethnic admixture and with individuals having different proportions of genetic ancestry. This fact was reported by Lopera et al. [2014] analyzing women with cervical cancer that presented an inverse correlation between infections by HPV16 lineage D (common in Native American population) with the higher proportion of informative genetic markers (AIMs) from Native American ancestry. To better understand this finding it is required to analyze the prevalence of these lineages in women without cancer, because the current prevalence in invasive cancer might be associated with differences of their carcinogenic potential in the studied population.

The prevalence of HPV16 lineages in invasive cervical cancer in Brazil was also analyzed by Junes-Gill et al. [2008] in 63 women from Belém in the Brazilian Northern Region (Amazonia). These authors found lineage D to be the most prevalent (46%), followed by lineage A (41.3%) and B/C (3.2%), not considering samples with co-infection (9.5%). The higher prevalence of lineage D in this region than in Rio de Janeiro (46% in Junes-Gill et al. vs. 29% reported in the present work) might reflect the influence of the Amerindian ethnic background in Belém [Alves-Silva et al., 2000; Pereira et al., 2012]. The only other study reporting the prevalence of HPV16 lineages in women with invasive cervical cancer in Latin America (based on data from eight countries, Yamada et al. [1997]) showed results similar to those reported here; that is, a higher prevalence of lineage A (77%), followed by lineages D (19%) and B/C (~4%). Other studies performed in Brazil focusing on HPV16 intra-type diversity analyzed the prevalence of lineages in women with precancerous lesions [Villa et al., 2000] or with lesions of different grades (including invasive cancers) [Cruz et al., 2004; Freitas et al., 2014]. These studies also reported a higher prevalence of HPV16 lineage A,

ranging from 65.8% [Freitas et al., 2014] to 41% [Cruz et al., 2004].

HPV18 lineage A was the most frequent in the studied cohort, followed by lineage B; lineage C was not detected. The paucity of studies on HPV18 lineages makes the drawing of comparisons difficult. Most studies included mainly women with normal cervical cells, LSIL, and HSIL, including two studies performed in Brazil [Villa et al., 2000; Sicheiro et al., 2007] that showed a higher prevalence of lineage A (80–90%) and a lower prevalence of lineage B. Lineage C was reported by only Sicheiro et al. [2007], at a frequency of 6.6%. Studies performed in other countries also reported a higher frequency of HPV18 lineage A. Xi et al. [2006] found HPV18 lineage A in 71.4% of women with normal cervical cells, LSIL, and HSIL followed by lineages B/C (28.6%) in the US. In Spain, studies performed by Arroyo et al. [2012] and Pérez et al. [2014] based on normal cervical cells, cervical lesions, and invasive cancer also found a higher frequency of HPV18 lineage A, followed by lineage B; lineage C was only reported by Arroyo et al. [2012] at a frequency of ~11%. In Costa Rica, Schiffman et al. [2010] evaluated women with normal cervical cells and women with cervical lesions of various grades and showed a lower frequency of HPV18 lineage B (22.6%) than that of lineages A and C (77.4%).

Hap09, Hap11, Hap47, and Hap04 were the most frequent HPV16 haplotypes in the 314 samples analyzed, altogether accounting for 41% of the total. The network arrangement showed that three of these haplotypes (Hap09, Hap11, and Hap47) were associated with less frequent haplotypes in a star-like configuration, most of which differed by one nucleotide substitution. This pattern suggests a rapid population expansion of HPV16 haplotypes associated with invasive cancer due to historical-neutral events or exposure to selective factors favoring specific haplotypes, with selection acting over *LCR* or *E6* regions or over another HPV genomic region resulting in genetic hitchhiking. These possibilities were supported by the negative and significant value obtained using Fu's F_s test (-23.86 ; $P = 0.004$). This result might also indicate the association of specific variants with a higher risk of cervical cancer, similar to what was observed for HPV45 sub-lineage B2 variants [Chen et al., 2014]. Analysis of the prevalence of HPV16 variants in women without cervical lesions might enable us to evaluate these proposals. The Fu's F_s test result (-4.11 ; $P = 0.156$) was not significant for HPV18, suggesting a different evolutionary history. The non-significance found, indicating that the F_s value did not differ from 0 (zero), implies that the HPV18 genomes in the studied population are evolving in accord to a selective neutral model, and that no recent event affecting viral population size (and consequently HPV18 diversity) occurred.

It is necessary to underline that the haplotypes placed in lineage B of HPV16 by SNV analysis did

not form a monophyletic group in the ML topology (Supplemental Fig. S1) and in the Network arrangement (Fig. 1), in spite of the two reference sequences of lineage B were grouped together in the ML topology. The arrangement observed for these haplotypes in the ML topology were low supported by the bootstrap analysis, pointing to the requirement of a larger genomic region to be analyzed to increase the support for the presented topology or for an alternative topology.

In conclusion, the results obtained here show that women diagnosed with invasive cervical cancer associated with HPV16 and HPV18 in the Brazilian Southwestern Region showed a higher frequency of the HPV lineages that are most prevalent in Europe and North America (HPV16 lineage A and HPV18 lineage A). The genetic diversity of HPV16 indicated a recent expansion of specific variants or a selective advantage associated with invasive cancer; this pattern was not observed for HPV18. HPV diversity data are important for the development of HPV diagnostics, vaccines, and therapeutic approaches to monitoring virus-induced diseases. The major limitation of this study was the absence of a control group with women infected with HPV but without invasive cancer. This is the largest study to investigate the genetic diversity of HPV16 and HPV18 related to invasive cervical cancer conducted in Brazil prior to the implementation of the immunization program against cervical cancer by the Brazilian Public Health System (initiated in March 2014). All patients included between July 2011 and March 2014 resided in the second largest metropolitan region of the country (Rio de Janeiro State); this population is economically and educationally diverse. These data provide a baseline for future studies evaluating the genetic diversity of these HPV lineages after implementation of the immunization program.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Hector Seunax for critically revising the manuscript. We are also indebted to Luiz Figueiredo Mathias (MD), Chief of the Gynecologic Oncology Department, Instituto Nacional de Câncer, deceased in 2014.

REFERENCES

- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444–461.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Tuerz-Martínez N, Andersen DN, Wheeler CM. 2005. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology* 338:22–34.
- Arroyo SL, Basarua M, Arrese E, Hernández S, Andía D, Esteban V, García-Etxebarria K, Jugo BM, Cisterna R. 2012. Human papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virol J* 9:258.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.
- Berumen J, Ordóñez RM, Lázcano E, Salmeron J, Galván SC, Estrada RA, Yunes E, García A, González-Lira G, Madrigal-de la Campa A. 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: A case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93:1325–1330.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N. 2008. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26:K1–K16.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer GJLM, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–265.
- Bruni L, Díaz M, Castellagui X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. 2010. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 202:1789–1799.
- Burk RD, Terao M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. 2003. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 63:7215–7220.
- Burk RD, Harari A, Chen Z. 2013. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445:232–243.
- Corqueira DM, Rasil T, Vêras NM, von Gail Milanese N, Amaral FA, de Macedo Brígido M, Martins CR. 2008. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. *Virus Genes* 37:282–287.
- Chen A, Heideman DAM, Beem D, Gheit T, Snijders PJF, Tommasino M, Franceschi S, Clifford GM. 2014. Human papillomavirus 45 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. *J Virol* 88:4514–4521.
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylva BS, Tommasino M, Clifford GM. 2012. Human papillomavirus type 16 genetic variants: Phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86:6855–6861.
- Cornet I, Gheit T, Iannace MR, Vignat J, Sylva BS, Del Mistro A, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM. 2013. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer* 108:240–244.
- Cruz MR, Corqueira DM, Cruz WS, Camara GNL, Brígido MM, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CR. 2004. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:281–282.
- de Araujo Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB, Petal-Erlar ML, Franco EL, Villa LL. 2008. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMJ Cancer* 8:245.
- de Araujo Souza PS, Sichero L, Maciag PC. 2009. HPV variants and HLA polymorphisms: The role of variability on the risk of cervical cancer. *Future Oncol* 5:329–370.
- De Boer MA, Peters LAW, Aziz MF, Singar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Lipke S, Fleuren GJ. 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol* 94:488–494.
- De Villiers EM. 2013. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445:2–10.
- Excoffier L, Lischer HELL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- Freitas LJ, Chen Z, Maqui EF, Boldrini NAT, Miranda AE, Spano LC, Burk RD. 2014. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS ONE* 9:e100746.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Fuossel Haws AL, He Q, Rody PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stiller K, König R, Tying SK. 2004. Nested PCR with the PGM09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 122:87–93.
- Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Itner T, Munk C, Tommasino M, Kjaer SK. 2011. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:1315–1321.

- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38:357–361.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321.
- Harari A, Chen Z, Rodríguez AC, Hildesheim A, Porras C, Herrero R, Wacholder S, Panagiotou OA, Bofano B, Burk RD, Schiffman M. Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) group. 2015. Cross-protection of the bivalent human papillomavirus (HPV) vaccine against variants of genetically related high-risk HPV infections. *J Infect Dis* Epub ahead of print; DOI: 10.1093/infdis/jiv519.
- Ho L, Chan S, Burk R, Das B. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 67:6413–6423.
- INCA-Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva 2014. Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, p 124.
- Jones-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, Villa LL. 2008. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol* 80:1639–1645.
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6:29.
- Lopera EA, Balsa A, Flores V, Montiel J, Duque C, Ramirez T, Borrero M, Córdoba CM, Rojas F, Paraja R, Bedoya AM, Bedoya G, Sanchez GI. 2014. Unexpected inverse correlation between Native American ancestry and Asian American variants of HPV16 in admixed Colombian cervical cancer cases. *Infect Genet Evol* 28:339–348.
- Manta PSN, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmao L, Carvalho EF. 2013. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol* 40:94–98.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518–527.
- Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Lekakopoulou V, Pfister H, Tay SK, Meulen J, Villa LL. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: An ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 67:6424–6431.
- Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SEB, Amorim A, Carracedo A, Gusmao L. 2012. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS ONE* 7:e29684.
- Pérez S, Cid A, Biazres A, Pato M, Lamas MJ, Couso B, Gil M, Alvarez MJ, Rey S, López-Miragaya I, Melón S, de Oña M. 2014. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 lineages in Galicia, Spain. *PLoS ONE* 9:1–10.
- Schiffman M, Rodríguez AC, Chen Z, Wacholder S, Hildesheim A, Desalle R, Bofano B, Yu K, Safaeian M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE, Burk RD. 2010. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus (HPV) variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 70:3159–3169.
- Schiller JT, Lowy DR. 2012. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol* 10:681–692.
- Sichero L, Ferreira S, Trutler H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPV's 16 and 18. *Int J Cancer* 120:1763–1768.
- Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. 2012. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology* 432:127–132.
- Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, Desalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T, Burk RD. 2011. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS ONE* 6:e21375.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 81:2959–2968.
- Wang SS, Bratti MC, Rodríguez AC, Herrero R, Burk RD, Porras C, González P, Sherman ME, Wacholder S, Lan Z, Schiffman M, Chanock SJ, Hildesheim A. 2009. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. *J Infect Dis* 199:20–30.
- Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky L. 2006. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: Race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 98:1045–1052.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Virol* 71:2463–2472.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

9.2. Quadro com os tipos histológicos dos tumores incluídos no estudo, com a classificação definida como “outros”.

Tipo Histologico	Idade da paciente	Tipo de HPV detectado
Carcinoma	47	HPV 59
Carcinoma	66	HPV 16
Carcinoma	39	HPV 73
Carcinoma	61	HPV 16
Carcinoma	39	HPV 45
Sarcoma	56	HPV 16
Carcinoma	63	HPV 16
Carcinoma	63	HPV 16
Neoplasia maligna	93	HPV 16
Carcinoma	49	HPV 18
Carcinoma	24	HPV 16
Carcinoma	54	HPV 18
Carcinoma	39	HPV 18
Carcinoma	68	HPV 18
Carcinoma	51	HPV 18
Carcinoma	32	HPV 16
Carcinoma	55	HPV 35
Inconclusivo	45	HPV 18
Carcinoma	73	HPV 16
Carcinoma	54	HPV 16
Neoplasia maligna	75	HPV 16
Inconclusivo	50	HPV 16
Neoplasia maligna	50	HPV 18
Carcinoma	40	HPV 16
Carcinoma	39	HPV 18
Carcinoma	76	HPV 16
Carcinoma adenoescamoso	43	HPV 16
Carcinoma de celulas claras	35	HPV 16
Carcinoma	62	HPV 16
Carcinoma de celulas claras	47	HPV 16
Carcinoma adenoescamoso	70	HPV 16
Carcinoma	53	HPV 16
Carcinoma	57	HPV 16
Carcinoma	67	HPV 18
Carcinoma	47	HPV 45
Carcinoma adenoescamoso	49	HPV 16
Carcinoma adenoescamoso	31	HPV 16
Carcinoma	31	HPV 39
Carcinoma	58	HPV 16
Sarcoma	65	HPV 16
Carcinoma	54	HPV 45
Carcinoma adenoescamoso	55	HPV 16
Carcinoma	43	HPV 16
Carcinoma	33	HPV 18
neoplasia maligna	66	HPV 16
Carcinoma adenoescamoso	48	HPV 16
neoplasia maligna	64	HPV 18
carcinoma	51	HPV 16
carcinoma	73	HPV 16
carcinoma	33	HPV 18
Sarcoma	65	HPV X
carcinoma	36	HPV 18
Neoplasia	27	HPV 18
carcinoma	45	HPV 16
carcinoma	34	HPV 18
carcinoma	50	HPV 16
Neoplasia maligna	65	HPV X
Neoplasia maligna	67	HPV X

10. Anexos

10.1. Artigo publicado em periódico indexado com índice de impacto Qualis B2 da área Medicina I da CAPES

de Sousa *et al.* *BMC Urology* (2015) 15:13
DOI 10.1186/s12894-015-0007-8



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects

Isaura Danielli Borges de Sousa¹, Flávia Castello Branco Vidal^{1,2*}, João Paulo Castello Branco Vidal³, George Castro Figueira de Mello⁴, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento¹ and Luciane Maria Oliveira Brito^{1,5}

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects

Isaura Danielli Borges de Sousa¹, Flávia Castello Branco Vidal^{1,2*}, João Paulo Castello Branco Vidal³, George Castro Figueira de Mello⁴, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento¹ and Luciane Maria Oliveira Brito^{1,5}

Abstract

Background: The human papillomavirus (HPV) prevalence in males has been reported to be between 3.6% and 84%, depending specially on the socioeconomic status. HPV infection has been related as a risk factor for penile cancer. This is a rare tumor, and other risk factors include lack of personal hygiene and men who have not undergone circumcision. Penile cancer is less than 1% of cancers in men in the United States, however, is much more common in some parts of Asia, Africa, and South America, where it accounts for up to 10% of cancers in men. This study aimed to determine the prevalence of HPV-DNA in penile cancers in São Luís, Brazil and to correlate the virus presence to histopathological factors.

Methods: Tumor paraffin samples of 76 patients with penile carcinoma were tested in order to establish the prevalence and distribution of genotypic HPV using PCR/Nested and automated sequencing. To evaluate the association between HPV types and other clinical and morphological variables, a nonparametric ANOVA was performed using a Kruskal Wallis test, and statistical significance was determined to a value of $p < 0.05$.

Results: The average age of patients at the time of diagnosis was 66 years $\pm$ 17.10. Regarding location, 65.79% of the tumors were located in the glans, and the most common types were vegetative (34.21%) and squamous (98.68%). Most of the lesions ranged in size from 2.1 to 5.0 cm, presenting Jackson I stage and Broders II degree. It was observed that 32 patients had at least one invaded and/or infiltrated structure. Lymph node involvement was observed in 19.76% of the patients, and 21.05% showed an inflammatory process. In the molecular evaluation, HPV infection was observed in 63.15% of the lesions, and the most common type was HPV 16.

Conclusions: From the statistical analysis, it can be verified that the variables were not associated with infection by the HPV virus. Although penile cancer can result from various risk factors that act in synergy, an HPV virus infection is important for the development of such neoplasm.

Keywords: Papillomavirus infections, Penile Neoplasms, Association, Men's health

* Correspondence: f.vidal@hotmail.com

¹Tumors and DNA Bank of Maranhão, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil

²Department of Morphology, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 de Sousa et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The human papillomavirus (HPV) is a DNA-virus from the Papoviridae family - genre Papillomavirus, with more than 100 types currently recognized, 20 of which can infect the genital tract; the man is the main disseminator [1,2].

Penile infection by HPV may be clinical, subclinical or latent. In clinical presentation, the diagnosis is simpler, because it is determined from a good clinical examination to uncover existing lesions. In subclinical and latent forms, other methods, such as peniscopy, are necessary to aid in detection, as it is not possible to detect changes (i.e., diagnosis) with the naked eye. In men, there is a higher frequency of the subclinical form [2].

Penile cancer mainly affects men over 50 years old, but approximately 19% of patients are 40 years of age or younger, and 7% are below the age of 30 [3]. The major risk factors of the disease are associated with hygiene, phimosis, smegma retention, inflammation process, and HPV infection [4].

The prevalence of the virus in males has been reported to be between 3.6% and 84%, depending on socioeconomic status [5,6]. Penile cancer represents 0.4% to 0.6% of all malignant tumors in developed countries, such as the United States and European countries, and more than 10% of all malignant tumors in developing countries, such as those in Asia, Africa and South America [3,4].

According to Nardi et al. [7] the highest incidence rates of penile carcinoma were found in Maranhão. Maranhão is a city situated in the Northeast of Brazil. Favorito et al. [8] observed a predominance of reports of penile cancer in the North and Northeast (53.02%), which are regions with lower human development indexes. The understanding of HPV prevalence and knowledge of the viral subtype distribution constitute important epidemiological information that can assist the development of local or regional public policies to prevent HPV and of new vaccines.

The aims of this study were to detect and perform HPV genotyping in biological specimens of penile tumors and to determine the existing associations between viral presence and histopathological clinical aspects.

Methods

Enrollment

This was a retrospective study performed in paraffined penile tumors collected at two public reference hospitals in Maranhão. A total of 76 samples were included in the study from patients diagnosed with penile cancer between the years 2001 and 2011. Patient information as well as the histopathological characteristics of the tumors obtained from medical records. As the samples consisted in paraffined tumours, there was no written informed consent from the patients. The patient identity was not disclosed in this research. This work was approved by the Ethics in Research Committee of the

University Hospital of the Federal University of Maranhão (HU/UFMA).

Inclusion criteria

Paraffin blocks and histological slides of penile tumors as a result of biopsy or surgical treatment, with or without lymphadenectomy at any follow-up in the archives of the Pathology Services.

Exclusion criteria

Histological slides and/or paraffined blocks not found in the archives of the Pathology Services of referral hospitals and reports did not provide complete information.

HPV analysis

The samples were reviewed by the pathologist, and blocks with tumor representativeness (over 50% of the total area of the fragment) were selected. After microtomy, sections suffered a process of deparaffinization. The sections were stored at 4°C, awaiting DNA extraction.

The extraction of the genomic DNA from the samples was performed using the QIAamp DNA FFPE Tissue Purification Kit (QIAGEN®) according to the extraction protocol suggested by the manufacturer.

The Nested PCR reactions were performed by using primers PGMY09 and PGMY11 for the first round, and primers GP + 5 and GP + 6 for the second round [9].

The sequencing reactions were performed in the Laboratory of Genetics of the National Cancer Institute (INCA) with ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare, UK) according to the manufacturer's suggested protocol.

Statistical analysis

All data were collected and prospectively input in an EpiInfo 3.4.3 and Microsoft Office 2007® were used for the statistical analysis.

To evaluate the association between HPV types and other clinical and morphological variables, a nonparametric ANOVA was performed using the Kruskal Wallis test with a statistical significance level of 5% probability ($p < 0.05$).

Results and discussion

Tumor biopsies of penile cancer were evaluated in 76 patients aged 26 to 97 years with a mean of 60.7 years and standard deviation of ± 17.10 , presenting a higher prevalence in the over 66 age group. The clinical representation and pathologic characteristics distribution is shown on Table 1.

These results correspond with those obtained in the literature [10-14]. The average age of the patients at diagnosis predominates in advanced age (>50 years), which suggests that men seek health services very late in

Table 1 Age, clinical presentation and pathologic characteristics from 76 patients diagnosed with penile cancer

Age at diagnosis	N	%
Average age	60.6 ± 17.10	-
26-45	16	21.05
46-55	12	15.79
56-65	16	21.05
66-97	32	42.11
Lesion area		
Glans and other regions	50	65.79
Foreskin	08	10.53
Corpus	03	3.95
Non evaluable	15	19.74
Predominant morphology		
Ulceration	17	22.37
Vegetating	26	34.21
Ulceration and Vegetating	17	22.37
Nodule and Vegetating	01	1.32
Non evaluable	16	21.05
Size of the lesion (cm)		
≤0.5	00	00
0.6-2.0	20	26.32
2.1-5.0	40	52.63
≥5.1	14	18.42
Non evaluable	02	2.63
Staging of Jackson 1966		
Stage I	33	43.42
Stage II	16	21.05
Stage III	11	14.48
Stage IV	16	21.05
Broders' Classification		
Grade I	26	34.21
Grade II	36	47.37
Grade III	06	7.89
Non evaluable	08	10.53
Invasion		
Present	18	23.69
Absent	58	76.31
Infiltration		
Corpus and other regions	24	31.58
Perineural	01	1.32
Urethra	03	3.95
Stroma	03	3.95
Urethra and Stroma	01	1.32
Absent	44	57.89

Table 1 Age, clinical presentation and pathologic characteristics from 76 patients diagnosed with penile cancer (Continued)

Lymph node involvement		
Present	15	19.73
Absent	61	80.27
Lymphatic embolization		
Present	04	5.26
Absent	72	94.74
Inflammatory process		
Present	16	21.05
Absent	60	78.95

life [15]. Younger individuals are also affected, but in smaller percentages [7].

Regarding the location of the lesions, the glans, in an isolated form or associated with other regions, was the most affected structure as in the research by Delgado et al. [10], Wanick et al. [11] and Favorito et al. [8].

Studies have shown that the lesions on the glans are directly linked to poor hygiene. This occurs due to the formation of a mass, called smegma, followed by likely irritation of the site and onset of injury, facilitating various infections and future neoplasia if left untreated [10].

Regarding the clinical morphology, the predominantly found lesion was the vegetating type followed by ulceration. The occurrence of both types of lesions in the same patient was observed in 22.37% of the cases. In a study performed in Spain, researchers observed that the vegetative lesion was also more present, in 66% of the cases [12]. On the other hand, in another research conducted in Rio de Janeiro [10], a larger number of lesions was detected in the form of ulcerations, nearly 55.88% of the studied cases.

The dimensions of the lesions were similar to those observed in the Wanick et al. results [10], with a larger number of cases: 52.63% of the cases, with size between 2.1 and 5.0 cm.

Unlike other studies, the moderately differentiated tumors (grade II) identified in this work, according to

Table 2 HPV prevalence and distribution according to oncogenic risk in 76 patients diagnosed with penile cancer

HPV	n	%
HPV +	48	63.15
HPV -	28	36.85
Oncogenic risk		
High risk	17	35.42
Low risk	6	12.50
Indeterminate	25	52.08

Table 3 Association of clinical presentation and pathologic characteristics data with HPV infection patients with penile cancer

	HPV +	HPV -	p-values*
Lesion area			0.543
Glans and other regions	31	19	
Foreskin	4	4	
Corpus	2	1	
Non evaluable	11	4	
Predominant morphology			0.377
Ulceration	11	06	
Vegetating	17	09	
Ulceration and Vegetating	09	07	
Nodule and Vegetating	01	00	
Non evaluable	10	06	
Size of the lesion (cm)			0.352
06-2.0	13	07	
2.1-5.0	23	17	
≥5.1	11	03	
Non evaluable	01	01	
Histologic type			0.285
Squamous	47	28	
Adenocarcinoma	01	00	
Staging of Jackson 1966			0.381
Stage I	21	12	
Stage II	07	09	
Stage III	07	04	
Stage IV	13	03	
Broders' Classification			0.352
Grade I	20	06	
Grade II	21	15	
Grade III	02	04	
Non evaluable	05	03	
Invasion			0.578
Present	10	08	
Absent	38	20	
Infiltration			0.535
Corpus and other regions	15	9	
Perineural	0	1	
Urethra	3	0	
Stroma	3	0	
Urethra and Stroma	1	0	
Absent	26	18	

Table 3 Association of clinical presentation and pathologic characteristics data with HPV infection patients with penile cancer (Continued)

Lymph node involvement			0.285
Present	09	06	
Absent	39	22	
Lymphatic embolization			0.285
Present	04	00	
Absent	44	28	
Inflammatory process			0.285
Present	10	06	
Absent	38	22	

*Estimated by univariate logistic regression analysis;

P = Statistical significance, 95% CI = 95% confidence interval.

Broder's classification, were the most prevalent. Fonseca et al. [13] identified a greater number of cases classified as well differentiated (grade I). However, Scheiner et al. [14] observed higher incidence of grade III (undifferentiated) tumors, which can be explained by the greater presence of stage III and IV patients.

The findings indicated that invasion was present in 23.68%, and infiltration occurred in at least one of the structures, with the highest prevalence in the corpus cavernosum. Kofman et al. [15] reported the presence of invasion of the spongiosum or cavernous corpus in 41.3% of the patients.

Regarding lymph node involvement, a percentage of 19.73% was observed. According to Sacoto et al. [12], patients with more advanced disease and positive lymph nodes at the time of diagnosis had a worse survival rate than those with localized stages.

The DNA of the HPV was detected in 63.15% (48/76) of the samples. The oncogenic risk distribution is shown on Table 2. This percentage is within the range reported in the literature, which shows that the rate of HPV infection in penile malignant tumors may vary from 20 to over 75% of cases [16]. According to a systematic review of the prevalence of HPV in invasive tumors of the penis, 48% of the samples presented HPV infection [17]. A Belgian study by D'Hauwers et al. [18], which had the same number of patients as in this study, revealed that 70.9% of the tumors had the HPV virus. However, a survey conducted in Vietnam demonstrated that only 23% of tumors had HPV infection [19]. A study conducted in Brazil showed that 75% of invasive penile tumors were infected by HPV [14]. These variations may be due to different techniques used for viral detection, regional differences or histological type of the analyzed tumor.

In our study, among the high-risk viral types present were the 16, 18, 45 and 69 types. The HPV of type 11 was the only low oncogenic risk found. Type 16 was the most prevalent, found in 10 cases, followed by type 11 of

low risk with 6 cases, type 18 with 4 cases, type 69 with two cases and type 45 with 1 case. The automated sequencing technique was not effective for viral genotyping, because in more than 50% of the samples it was not possible to achieve. This may be due to the presence of co-infections in these samples, which prevents the device from detecting the virus, as described by Gharizadeh et al. (2005) and Verteramo et al. (2009) [20,21]. The most common viral type found in this study was HPV 16, high-risk type. This virus type was also the most found in other studies such as those developed by Do et al. [19] (89%), D'Hauwers et al. [18] (48.3%) and Heidman et al. [16] in (52%).

As shown in Table 3, no association was found ($p < 0.05$) between infection with HPV virus and clinical and histopathological and clinical variables, as was the case in the research by Do et al. [19], Fonseca et al. [22] and Scheiner et al. [14].

Infections by HPV are strongly associated with the development of penile cancer; however, the role of viruses in the etiology is not very clear [21]. Although the etiology is still unknown, approximately 40% of all penile tumors are related to HPV infection [22].

Conclusion

HPV DNA was found in 48 of the 76 analyzed samples (63.15%). The high-risk type HPV 16 was observed in 21.28% (10/48) of the lesions followed by low-risk type HPV 11 in 12.76% (6/48) and high-risk types HPV 18 in 8.51% (4/48), HPV 69 in 4.25% (2/48) and HPV 45 in 2.13% (1/48). In 51.06% of the cases, genotyping was indeterminate, suggestive of co-infection.

The average age of the patients in the study was 60.6 years old. Prevalent lesions were larger than 2 cm, in the glans region, in general vegetating, and with Broder's grade II (moderately differentiated). The clinical and histopathological variables did not tend to have an association with infection by the HPV virus.

Abbreviations

HPV: Human papillomavirus; HUJUFMA: University Hospital of the Federal University of Maranhão; INCA: National Cancer Institute.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IDBS, FCBV and JPCBV performed the experiments under the supervision of MDSBN and LMOB. GCFM was the pathologist responsible for penile cancer identification. All the authors analyzed and interpreted the data. IDBS and FCBV wrote the manuscript draft, which was read and edited by all the authors. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Ministério da Saúde, Brasil, and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA).

Author details

¹Tumors and DNA Bank of Maranhão, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil. ²Department of Morphology, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil. ³José Alencar Gomes da Silva National Cancer Institute, Department of Genetics, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Maranhão State Institute of Oncology Aldemara Bello (IMOB), São Luís, MA, Brazil. ⁵Department of Medicine II, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil.

Received: 20 October 2014 Accepted: 11 February 2015

Published online: 24 February 2015

References

1. Lito MGP, Júnior GFS, Porto AM, Tomimori J. Infecção pelo papillomavirus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):11.
2. Rosenblatt C, Lucan AM, Pereira EAG, Finnott JA, Arap S. Papillomavirus humano em homens - "star ou não star" - Uma revisão crítica. 2004;23(2):212-6.
3. Pao-Sang M, Adigunza J. HPV infection and the risk of penile cancer. *J Andrological Sci*. 2009;161-6.
4. Mosconi AM, Rola F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;53(2):145-77.
5. Chaves JHB, Vieira TKB, Ramos JS, Boeira APS. Pericopia no rastreamento das lesões induzidas pelo papillomavirus humano. *Revista Brasileira de Clínica Médica*. 2011;9(1):30-5.
6. Soles PE, Horenbias S, Pagliaro LC, Biagioli MC, Cook J, Clark PE, et al. Current concepts in penile cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(5):677-24.
7. Nardi AC, Gilma S, Favorto LA. Estudo epidemiológico sobre câncer de pênis no Brasil. *Int Braz J Urol*. 2007;33 Suppl 1:1-7.
8. Favorto LA, Nardi AC, Ronessa M, Zegui SC, Sempalo FJB, Gilma S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *Int Braz J Urol*. 2008;34(5):987-91.
9. Gault PE, Peyton GL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2002;58(1):357-61.
10. Denigado MS, Martins FA, Marquer GP, Gonçalves BB, Cosano AZ, Amadeu RL. Câncer de pênis: uma revisão de 18 casos. *Actas Urol Esp*. 2009;27(10):797-802.
11. Wianicki FB, Teichner TC, Silva R, Magnanini MMF, Azevedo LMS. Carcinoma espinocelular do pênis: estudo clínico-patológico de 34 casos. *An Bras Dermatol*. 2011;86(5):1082-91.
12. Sacoto CDP, Mello SL, Solchaga GFL, Alba AB, Moreno LP, Cruz JF. Câncer de pênis. Nuestra experiencia en 15 años. *Actas Urol Esp*. 2008;33(2):143-8.
13. Fonseca AG, Pinto JPSA, Marques MC, Drososki PS, Neto LORF. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará. *Brasil Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2010;1(2):85-90.
14. Scheiner MA, Campos MM, Omellas AA, Chin EW, Omellas MH, Andrade-Serpe MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *Int Braz J Urol*. 2008;34(4):467-74.
15. Koffman L, Viles AJ, Koffman N, Carvalho JP, Omellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol*. 2011;37(2):291-40.
16. Heidman DA, Wasserboer T, Powilla M, Dells-van Diemen P, Nindl I, Leijte JA, et al. Human papillomavirus 16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(29):4550-6.
17. Backes DM, Kuman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control*. 2009;20(4):449-57.
18. D'Hauwers KM, Depuydt CE, Bogers JJ, Noel JC, Delkenne P, Marbaix E, et al. Human papillomavirus, lichen sclerosis and penile cancer: a study in Belgium. *Vaccine*. 2012;30(40):673-7.
19. Do HT, Kariyama C, Khan NA, Higashi M, Kato T, Le NT, et al. The etiologic role of human papillomavirus in penile cancers: a study in Vietnam. *Br J Cancer*. 2013;108(1):229-33.
20. Gharizadeh B, Ogilioni M, Zheng B, Akom E, Pourmand N, Ahmadian A, et al. Type-specific multiple sequencing primers: a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. *J Mol Diagn*. 2005;7(2):198-205.

21. Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, et al. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. *BMC Infect Dis*. 2009;9:16.
22. Fonseca AG, Soares FA, Burbano RR, Silvestre R, Pinto LG. Human Papilloma Virus: prevalence, distribution and predictive value to lymphatic metastasis in penile carcinoma. *Int Braz J Urol*. 2013;39(4):540–50.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



10.2. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



A(o): Dra. Liz Maria Almeida
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2011.

Registro CEP nº 156/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)

Título do Estudo: Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres matriculadas no INCA

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo a composição do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer que analisou e aprovou o estudo acima especificado.

<i>Adriana Scheliga</i>	<i>Médica Oncologista Clínica HC I – Coordenadora</i>
<i>Alessandra Oliveira Marins</i>	<i>Enfermeira do Serv. de Pesq. Clínica - CGTC</i>
<i>Ana Lúcia Amaral Eisenberg</i>	<i>Médica Patologista – DIPAT</i>
<i>Ana Valéria Paranhos Miceli</i>	<i>Psicóloga do Serviço de Psicologia - HC I</i>
<i>André Marcelo Machado Soares</i>	<i>Teólogo / Filósofo Extra INCA</i>
<i>Carlos Henrique D Silva</i>	<i>Médico HC IV – Coordenador Substituto</i>
<i>Célia Helena Fernandes Costa</i>	<i>Enfermeira da Oncologia – HC I</i>
<i>Cláudio Gustavo Stefanoff</i>	<i>Coordenador do Laboratório do BNT - CGTC</i>
<i>Cristiano Guedes Duque</i>	<i>Médico Oncologista - HCI</i>
<i>Danielle Nogueira Ramos</i>	<i>Doutora em Epidemiologia e Bioestatística - CONPREV</i>
<i>Eliana Teixeira Maranhão</i>	<i>Fisioterapeuta do Serviço de Fisioterapia – HC I</i>
<i>Héilton Spindola Antunes</i>	<i>Dentista do Serviço de Pesquisa Clínica - CGTC</i>
<i>Ivan da Costa Marques</i>	<i>Matemático Extra INCA</i>
<i>Maria de Fátima Batalha de Menezes</i>	<i>Enfermeira da Divisão de Enfermagem – HC I</i>
<i>Michele Quarti</i>	<i>Enfermeira - Extra INCA</i>
<i>Paulo Alexandre Mora</i>	<i>Médico Oncologista - HCII</i>
<i>Rosane Vianna Jorge</i>	<i>Doutora em Química Biológica da Divisão de Farmacologia - CGTC</i>
<i>Urquilei dos Santos Pinheiro</i>	<i>Representante de Usuários – CES/RJ</i>
<i>Walter Esteves Piñeiro</i>	<i>Advogado Extra INCA</i>
<i>Wilza Barbosa Felipe</i>	<i>Enfermeira da Comissão de Infecção Hospitalar - HC III</i>

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

10.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero em mulheres matriculadas no INCA

Nome do Voluntário: _____

Você está sendo convidada a participar de um estudo que tem por objetivo descrever as características biológicas do câncer do colo do útero e que envolve a coleta de material para a realização de uma biópsia (análise de pequenas amostras de tecido para o diagnóstico do tipo do tumor) e a coleta de uma pequena quantidade de sangue (5mL ou o equivalente a uma colher de chá).

O Câncer do colo do útero é o segundo tipo de tumor mais comum em mulheres. Sabe-se que sua origem está associada ao um vírus (HPV). Conhecer as características desse vírus e do tumor que ele originou é importante para compreender melhor a doença, o tratamento e as maneiras de prevenir o aparecimento desse tumor, como o desenvolvimento de vacinas.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo identificar os diferentes tipos de HPV presentes nos tumores do colo do útero de pacientes atendidas no Instituto Nacional de Câncer e associar as características do tumor com as características do tipo de vírus presente.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra do tumor para a realização da biópsia (exame que diagnostica o tipo de tumor) ou uma amostra do mesmo no caso de você ser submetida a uma cirurgia, como parte do tratamento. A coleta de material para a biópsia será feita por uma médica(o) pesquisadora(or) participante desse estudo. Também serão coletados 5mL de sangue através de uma punção com agulha de uma veia de seu braço. Essas amostras serão levadas ao laboratório onde será isolado o DNA da biópsia do tumor e do sangue para ser submetido a procedimentos que permitirão identificar o vírus associado ao desenvolvimento do tumor. Você também responderá a um questionário com perguntas sobre hábitos de vida, atividade sexual e uso de hormônios ao longo de sua vida. O DNA isolado das amostras de tumor e sangue será armazenado no Banco Nacional de Tumores após a utilização do mesmo para os procedimentos relacionados ao presente projeto. O material armazenado no BNT será guardado, sob a responsabilidade do INCA, para estudos futuros e você terá o direito de decidir sobre a participação em outros estudos que eventualmente venham a ser realizados a partir deste material. Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa os pesquisadores participantes também consultarão seus registros médicos para obter dados que podem ser importantes para compreender o câncer do colo do útero.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Sua participação nesse estudo é totalmente voluntária. Você não é obrigada a participar do estudo. Se você não concordar em fornecer uma amostra de sangue, permitir a biópsia de seu tumor e responder ao questionário, você não participará desse estudo.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. É importante que você saiba dos riscos implicados na coleta de uma amostra do tumor e na coleta do sangue. Esses dois procedimentos não fazem parte do tratamento usual para pacientes com esse tipo de tumor. A coleta da biópsia de seu tumor pode causar sangramento no local. Caso isso aconteça, esse sangramento será controlado pela médica(o) que realizará a coleta. Se você for submetida a uma cirurgia, como parte do tratamento, a coleta de uma amostra do tumor se dará a partir do material tumoral retirado durante a cirurgia e não haverá risco adicional. A coleta de sangue pode causar dor no local da punção, ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses.

BENEFÍCIOS

Você não terá benefícios com os resultados dessa pesquisa. Entretanto os resultados gerados por ela poderão ajudar a compreender melhor o câncer do colo do útero e auxiliar na prevenção e no tratamento do mesmo, no futuro, para outras mulheres.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

É importante que você saiba que o seu tratamento será o mesmo, caso aceite ou não participar desse projeto. É que você tem direito de saber qualquer informação gerada nessa pesquisa relacionada a sua doença. Essa pesquisa é coordenada pela Dr. Liz Maria de Almeida, e qualquer dúvida que tenha respeito pode ser sanada entrando em contato pelo telefone 21 3970-7409.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA) e equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

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

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

(Nome do Paciente – letra de forma)

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

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

10.4. Ficha Clínica

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

Nome da unidade de saúde:

Nº do prontuário/registro na unidade de saúde: |__|__|__|__|__|__|__|

IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE

Nome da entrevistada:

10.4.1.1.1.1. Endereço:

Bairro: cep: |__|__|__|__|__| -
|__|__|__|

10.4.1.1.1.2. Tel. Residencial: Celular:

10.4.1.1.1.3. Tel. Comercial: CPF:

10.4.1.1.1.4. Cidade onde nasceu: UF:

10.4.1.1.1.5. Nome da
mãe:

TIPO DE ENTREVISTA

1.|__| Realizada Totalmente 2.|__| Realizada Parcialmente 3.|__| Não
Realizada

1|__|Recusa

2|__|Outro

especificar o outro motivo de não realização da entrevista:

Data de realização da entrevista: __ / __ / ____

EQUIPE

ENTREVISTADORA:

_____ |__|__|

SUPERVISOR

_____ |__|__|

DIGITADOR

_____ |__|__|

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

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

1. Qual a data do seu nascimento?

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

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

2.Quantos anos a senhora tem?

1|_|_| anos

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

Entrevistador: Leia as alternativas.

1 |_|| Branca

2 |_|| Preta

3 |_|| Amarela

4 |_|| Parda

5 |_|| Indígena

6 |_|| Outra

4. Qual é a sua situação conjugal?

Entrevistador: Leia as alternativas.

1|_|| Solteira

2|_|| Casada/união consensual

3|_|| Divorciada/desquitada/separada

4|_|| Viúva

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

Série ou Período	10.4.1.1.2. Grau de Escolaridade
(00) (07)	(00) Nenhum
(01) (08)	(01) Alfabetização de adultos
(02) (09)	(02) Antigo primário/elementar
(03) (10)	(03) Antigo ginásio
(04) (11)	(04) 1º grau/ensino fundamental
(05) (12)	(05) Antigo clássico/normal/científico/2º grau/ensino médio
(06) (99) NS/NR	(06) Superior (3º grau) - incompleto
	(07) Superior (3º grau) - completo
	(08) Educação infantil
	(99) NS/NR

|_|_| Série OU |_|_| Período

|_|_| Grau

10.4.2.

10.4.3.

6. Qual a sua religião?

1|_|_| Eu não tenho religião

2|_|_| Católica

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

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

5|_|_| Espiritismo Kardecista

6|_|_| Budista

7|_|_| Judaica

8|_|_| Mulçumana

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

10.4.4.

7. Quantos cômodos existem na sua casa?

|_|_|_| cômodos

10.4.5.

8. Quantos cômodos da casa são usados

permanentemente para dormir?

|_|_|_| cômodos

9. Quantas pessoas moram na sua casa?

|_|_|_| pessoas

10. Atualmente a Sra. /você tem um trabalho ou atividade remunerada?

1 |_|_| Sim 2 |_|_| Não (*passe 12*)

11. Qual é a sua principal ocupação? Por exemplo: Empregada doméstica, recepcionista, professora, auxiliar de pesquisa, contadora etc.

_____|_|_|_|

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

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

99999,99 |_|_| NS/NR (*passe 14*)

00000,00 |_|_| Não tem renda (*passe quadro 2*)

10.4.6.

13. No total, quantas pessoas dependem

economicamente desta renda familiar?

|_|_|_| pessoas

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

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

99999,99 |_|_| NS/NR

00000,00 |_|_| Não tem renda

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

10.4.8.

15. De um modo geral, em comparação a pessoas da

sua idade, como Sra. considera o seu próprio estado de saúde?

10.4.8.1.1.1.1.1.1.1.

Entrevistador: Leia as alternativas.

1|__| Excelente

2|__| Muito bom

3|__| Bom

4|__| Regular

5|__| Ruim

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

10.4.10.

10.4.11. 16. Você sabe para que serve o exame preventivo?

1|__| Sim

2|__| Não (*passa e leia o Quadro 4*)

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

1 Câncer do colo do útero

1|__| sim

2|__| não

2 Inflamações

1|__| sim

2|__| não

3 Infecções

1|__| sim

2|__| não

4 Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs)

1|__| sim

2|__| não

5 Outros _____

1|__| sim

2|__| não

especifique

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

1|__| Sim

2|__| Não

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

|__|__| anos

99|__| NS/NR

10.4.12.

20. De quanto em quanto tempo você costumava fazer

o exame preventivo?

1|__| Mais de uma vez por ano

2|__| Todo ano

3|__| De 2 em 2 anos

4|__| De 3 em 3 anos

5|__| Com intervalo de mais de 3 anos

6|__| Sem regularidade

9|__| Não sabe/Não respondeu

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

```
1|  | Conseguia logo marcar a consulta
```

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

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

4 | | Outra

situação,

qual?

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

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

| | | anos

99 | | NS/NR

23. Você tem ou já teve atividade sexual?

1 | | Sim

2 | Não (passe quadro 10, pág. 13)

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

| | | anos

99 | | NS/NR

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

| | | parceiros

99 | | NS/NR

26. Atualmente, você tem atividade sexual?

1 | | Sim (**passee 57**)

2 | | Não

27. Há quanto tempo você não tem atividade sexual?

1 | | dias

2 | | semanas

3 | | meses

4 | | | anos

99 | | NS/NR

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

1			Sim, uso
---	--	--	----------

2 | | Sim, já usei

(*passé 60*)

especifique

29. Qual (is)?

Entrevistador: Leia as alternativas.

TEMPO DE USO

- | | | | | |
|------------------------------|------------|------------|-------------|--------------|
| 1. Pilulas Anticoncepcionais | 1 __ Sim | 2 __ Não | __ __ Anos | __ __ Meses |
| 2. Injeções | 1 __ Sim | 2 __ Não | __ __ Anos | __ __ Meses |
| 3. Diu (com progesterona) | 1 __ Sim | 2 __ Não | __ __ Anos | __ __ Meses |
| 4. Camisinha/ preservativo | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 5. Camisinha feminina | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 6. Diafragma | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 7. DIU de cobre | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 8. Ligadura de trompas | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 9. Anel | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 10. implantes | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
| 11. Coito interrompido | 1 __ Sim | 2 __ Não | | |
- (passe 60)

30. Você já ficou grávida alguma vez, incluindo gravidez tubária, possíveis abortos ou gravidez atual?

1	Sim	2	Não (quadro 10, pág. 13)
---	-----	---	--------------------------

31. Quantas vezes você ficou grávida, incluindo gravidez tubária, possíveis abortos ou gravidez atual?

			vezes	99			NS/NR
--	--	--	-------	----	--	--	-------

32. Quantos partos você teve?

			partos	00			nenhum (<i>passe 67</i>)	99			NS/NR
--	--	--	--------	----	--	--	-----------------------------------	----	--	--	-------

33. Você tem ou teve filhos nascidos vivos?

1 | | Sim 2 | | Não (**passa 67**)

34. Quantos filhos nascidos vivos você teve?

1	1	1	filhos nascidos vivos
---	---	---	-----------------------

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

35. Qual era a sua idade quando nasceu o seu primeiro filho?

|__|__|anos ou |__|__|__|__|Ano da primeira gravidez ou |__|__|Idade do filho mais velho

99 |__| NS/NR

9999 |__| NS/NR

99 |__| NS/NR

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

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

99 |__| NS/NR

9999 |__| NS/NR

99 |__| NS/NR

38. Você já abortou ou perdeu bebê?

1|__| Sim

2|__| Não (*passa para o quadro 10*)

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

|__|__| abortos

99 |__| NS/NR

10.4.15. Agora farei algumas perguntas sobre menopausa

40. Você sabe o que é menopausa?

1 |__| Sim (*passa 70*)

2 |__| Não (*ler o texto abaixo*)

10.4.16.

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

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

1|__| Sim

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

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

42. Com que idade você entrou na menopausa?

|__|__| anos

99 |__| NS/NR

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

- 1|__| Sim, usa atualmente
2|__| Sim, já usou
3|__| Nunca usou (**Agradeça e finalize a entrevista**)

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

- 1 |__|__| dias
2 |__|__| semanas
3 |__|__| meses
4 |__|__| anos
99|__|__| NS/NR

USO DE TABACO

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

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

DIARIAMENTE |__| 1 → PASSE 48
MENOS QUE DIARIAMENTE ... |__| 2
NÃO FUMA |__| 3 → PASSE 47

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

SIM |__| 1 → PASSE 48
NÃO |__| 2 → PASSE 48

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

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

DIARIAMENTE |__|
MENOS QUE DIARIAMENTE ... |__|
NUNCA FUMOU |__| 3 → Agradeça e finalize a entrevista

48. Com que idade você começou a fumar?

|__|__| 99|__|__| Não sabe/não respondeu

[FUMANTE DIÁRIO]

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

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

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

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

[FUMANTE OCASIONAL]

50. Em média, quantos dos seguintes produtos você fuma por semana?

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

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

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

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

Entrevistador: Leia as alternativas.

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

Agradeça e finalize a entrevista

[EX-FUMANTE ATUAL]

52. Há quanto tempo você parou de fumar?

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

MARQUE A UNIDADE E REGISTRE O NÚMERO.

ANOS	☐			
MESES	☐			
SEMANAS	☐			
DIAS	☐			

10.5.

10.6.

Agradeça e finalize a entrevista

Observações:

[illegible]